

Aus der Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Abteilung für Allgemeine Chirurgie, Visceral-,  
Thorax- und Gefäßchirurgie

(Direktor Univ.- Prof. Dr. C.- D. Heidecke)

der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema:

**Charakterisierung der monozytären HLA- DR Expression und des  
Aktivierungszustandes von T- Lymphozyten nach großen visceralchirurgischen  
Eingriffen**

Inaugural- Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst- Moritz- Arndt- Universität

Greifswald

20.02.2009

vorgelegt von:

Alexander-Konstantin Hegenbart:

geb. am: 09.06.1978

in: Potsdam- Babelsberg

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Stefan Maier

2. Gutachter: Priv.- Doz. Dr. med. Klaus Emmanuel

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum Innere Medizin B

Tag der Disputation: 12.11.2009

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1 Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Einführung	6
1.1.2 Definitionen des ACCP/ SSCM	6
1.1.2.1 Bakteriämie	7
1.1.2.2 Sepsis	7
1.1.2.3 Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)	7
1.1.2.4 Schwere Sepsis	8
1.1.2.5 Septischer Schock	8
1.1.2.6 Multiorganversagen	8
1.1.3 Biphasisches Sepsismodell	9
1.1.4 Epidemiologie der Sepsis	9
1.2 Das Immunsystem	10
1.2.1 Immunsystem im Überblick	10
1.3 HLA– DR Expression auf Monozyten	12
1.4 individuelle Disposition des Patienten	13
1.4.1 chirurgische Hochrisikopatienten in Abhängigkeit von Nebenerkrankungen	13
1.4.2 Ernährungszustand	15
1.4.3 Alter	16
1.4.4 maligne Erkrankungen	16
1.5 Arbeitshypothese und Fragestellung	16
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 Patienten	19
2.2 Material	20
2.2.1 Verwendete Geräte/Materialien	20
2.2.1.1 Instrumente	20
2.2.1.2 PC Programme und Online- Datenbank	21
2.2.1.3 Material	21
2.2.2 Chemikalien und Pufferlösungen	22
2.2.2.1 Reagentien	22
2.2.2.2 Puffer und Lösungen	23

---

2.2.2.3 Kits	24
2.2.2.4 Magnetische Microbeads	24
2.2.2.5 Antikörper	25
2.3 Methoden	25
2.3.1 Durchflusszytometrie	25
2.3.1.1 Die Funktion eines Durchflusszytometers	25
2.3.1.2 Indirekte Immunfluoreszenz	27
2.3.1.3 FACS Analyse der HLA- DR Expression auf Monozyten	28
2.3.1.4 Isolation von T- Zellen und Monozyten aus peripherem Blut	28
2.3.1.5 Datendarstellung FACS	29
2.3.2 Microarray Analyse	29
2.3.2.1 Einführung	29
2.3.2.2 Präparation von Gesamt- RNA	31
2.3.2.3 RNA Amplifikation	31
2.3.2.4 Labeling der aRNA und Hybridisierung	31
2.3.2.5 MWG- 40K oligonukleotid Arrayanalyse	32
2.4 Datenanalyse	33
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1 Demographie	34
3.2 Ergebnisse der klinischen Beobachtungen	36
3.2.1 Nebenerkrankungen	37
3.2.2 Einteilung der Patienten nach der ASA Klassifikation	39
3.2.3 Chirurgische Hochrisikopatienten in Abhängigkeit von Nebenerkrankungen	39
3.2.4 Modifizierte Risikostratifizierung	40
3.2.5 Zusammenfassung	41
3.3 Ergebnisse der HLA- DR Expressionsanalyse von Monozyten	41
3.3.1 Vergleich von großen chirurgischen Eingriffen mit kleineren Eingriffen	41
3.3.2 Untersuchung des Einflusses von operativem Trauma	42
3.3.3 Ergebnisse der einzelnen Operationsgebiete	42
3.3.4 Einfluss von postoperativen Komplikationen	43
3.3.5 Alter und BMI	46
3.3.6 Einteilung der Patienten nach der ASA Klassifikation	47

---

3.3.7 Chirurgische Hochrisikopatienten in Abhängigkeit von Nebenerkrankungen	48
3.3.8 Korrigierte Risikostratifizierung	48
3.3.9 Neoadjuvante Therapie	49
3.3.10 Dignität des Grundleidens	50
3.3.11 Zusammenfassung	50
3.4. Genexpressionsanalyse der T- Lymphozyten mittels cDNA Microarrays	51
3.4.1 Zusammenfassung	52
<b>4 Diskussion</b>	<b>53</b>
4.1 Epidemiologie	53
4.2 HLA- DR Expression auf Monozyten	55
4.3 Einteilung der schweren Sepsis in Typ A und B	58
4.4 Genexpressionsanalyse der T- Lymphozyten	59
4.5 Patientenabhängige Risikofaktoren	60
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>6 Anhang</b>	<b>68</b>
6.1 Literaturverzeichnis	68
6.2 Abkürzungsverzeichnis	79
6.3 Tabellenverzeichnis	81
<b>7 Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>84</b>
<b>8 Danksagung</b>	<b>85</b>
<b>9 Lebenslauf</b>	<b>86</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Der Begriff „Sepsis“ stammt aus dem Griechischen (= Gärung, Fäulnis), er umschreibt ursprünglich eine in der Regel letal verlaufende mikrobielle Erkrankung und wird heute als eine schwere systemische Entzündungsreaktion des Organismus bei der Auseinandersetzung mit einer bakteriellen Infektion verstanden. Die Sepsis, die schwere Sepsis, der septische Schock und das Multiorganversagen sind aufgrund ihrer hohen Inzidenz und vor allem der weiterhin sehr hohen Mortalität ein zentrales Forschungsgebiet der Medizin.

Nachdem erst 1973 begonnen wurde, Patienten mit septischem Multiorganversagen zu beschreiben [1], wurden in den Folgejahren zunächst Patienten mit schweren Infektionen, zumeist mit gram- negativen Erregern, untersucht [2-5]. Es gab verschiedene uneinheitliche Definitionen zu den verschiedenen Entitäten dieses Krankheitsbildes. Die Begriffe Sepsis, Septikämie und septisches Syndrom waren nicht klar definiert, was zu widersprüchlichen Ergebnissen in klinischen Studien führte [6]

R.C. Bone definierte 1991 erste Eckpunkte einer neuen Sepsisklassifikation. Dieser Ansatz wurde von den Gesellschaften des „American College of Chest Physicians“ und der „Society of Critical Care Medicine“ (ACCP/ SSCM) aufgegriffen und erweitert. Um vergleichbare Studien durchführen zu können wurden 1992 verbindliche, präzise Klassifizierungen für die unterschiedlichen Krankheitsbilder der Sepsis etabliert [7].

### 1.1.2 Definitionen des ACCP/ SSCM

In der 1992 einberufenen Konsensus Konferenz wurden die Krankheitsbilder: Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock, Multiorganversagen und das Systemic inflammatory response Syndrom definiert [7]. Folgende Definitionen wurden erarbeitet:

### **1.1.2.1 Bakteriämie**

Anwesenheit von Erregern in der Blutbahn ohne systemische Entzündungszeichen.

### **1.1.2.2 Sepsis**

Nach den ACCP/ SSCM Kriterien ist eine Sepsis durch die unkontrollierte systemische Ausbreitung einer ursprünglich lokal begrenzten Infektion charakterisiert [7]. Somit versteht man heute unter Sepsis: die Summe lebensbedrohlicher Krankheitssymptome und pathophysiologischer Veränderungen, verursacht durch pathogene Keime und ihre Produkte, die aus einem Infektionsherd in die Blutstrombahn eindringen, durch die Bildung von endogenen Mediatoren (Zytokinen) die Entzündungskaskade aktivieren und zu einer nicht mehr kontrolliert ablaufenden systemischen Entzündungsreaktion führen.

Neben der Sepsis wurden weitere Krankheitsbilder wie das „Systemic Inflammatory Response Syndrom“, die schwere Sepsis und der septische Schock abgegrenzt [7].

Der mit einer Entzündungsreaktion einhergehende klinische Symptomkomplex wird als Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) bezeichnet [7]. Die Kombination aus einem Systemic Inflammatory Response Syndrome und einer klinisch oder mikrobiologisch nachgewiesenen Infektion wird als Sepsis bezeichnet.

### **1.1.2.3 Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)**

Das „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ wurde als eine systemische Entzündungsreaktion als Antwort auf eine Vielzahl verschiedener Noxen definiert [7]. Neben pathogenen Erregern können das auch andere pathogenetische Mechanismen wie z. B. Verbrennungen, schweres Trauma oder bestimmte Toxine sein. Eine auf diese Art zustande kommende systemische Reaktion ist klinisch nicht von einer Sepsis zu unterscheiden, da die einmal aktivierte Entzündungskaskade unabhängig von der Ursache abläuft. Ein SIRS liegt vor, wenn zwei oder mehr der folgenden Bedingungen erfüllt sind [7]:

- Temperatur größer 38,0 C° oder kleiner 36 C°
- Herzfrequenz größer 90 Schläge/min
- Atemfrequenz größer 20 Atemzüge/min oder PaCO<sup>2</sup> kleiner 33 mmHg (kleiner 4,3 kPa)
- Leukozytenzahl größer 12000 Zellen/mm<sup>3</sup> oder kleiner 4000 Zellen/mm<sup>3</sup> oder kleiner 10% unreifer Formen

In der Folgezeit wurde eine hohe Inzidenz des Syndroms festgestellt [8, 9]. Das Auftreten eines SIRS korrelierte mit der Mortalität und dem Auftreten von Infektionen, der Länge des stationären Aufenthaltes und mit dem Outcome der Patienten [8]. Es bestand ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen der Mortalität der schweren Sepsis und der Zunahme der erfüllten SIRS Kriterien [8-11].

#### **1.1.2.4 Schwere Sepsis**

Von einer schweren Sepsis spricht man bei Vorliegen einer Sepsis mit Zeichen eines Endorganversagens (Nierenversagen, respiratorische Insuffizienz, Leberversagen, Herzinsuffizienz, disseminierte intravasale Koagulopathie) [7].

#### **1.1.2.5 Septischer Schock**

Als septischer Schock wird eine Sepsis mit unzureichender Gewebepfusion trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr bezeichnet [7].

#### **1.1.2.6 Multiorganversagen**

Gleichzeitig oder rasch aufeinander folgendes Versagen von zwei oder mehr vitalen Organfunktionen. Der Schweregrad korreliert mit der Anzahl und dem Schädigungsausmaß der betroffenen Organe [7].



### 1.1.3 Biphasisches Sepsismodell

Nachdem zunächst mit einer ungerichteten exzessiven systemischen Inflammation auf verschiedenen Noxen reagiert wird (SIRS) kommt es zu einer kompensatorischen antiinflammatorischen Antwort, dem „Compensatory anti-inflammatory response syndrome“, CARS [12] (Abbildung 1). Nach der initialen Aktivierung des angeborenen Immunsystems werden antiinflammatorischen Zytokine, wie IL-4, -10, -11 und -13 ausgeschüttet [12-19]. Weiterhin resultiert eine Deaktivierung von Makrophagen, ein T- Zellen Funktionsverlust, sowie der schnelle apoptotische Verlust von Lymphozyten [20]. Diese Immunsuppression wurde als Immunparalyse [21], als Fenster der Immundefizienz [22], oder als Anergie bezeichnet [23-25]. So ist erklärbar, dass trotz einem nachweisbaren Monozytenanstieg die Immunabwehr bei gestörter Funktion nur unzureichend funktioniert [24, 26]. Häufig liegt überlappend neben einem SIRS auch ein CARS vor, dieser Zustand wird als „Mixed Antagonistic Response Syndrome“ (MARS) bezeichnet [12].

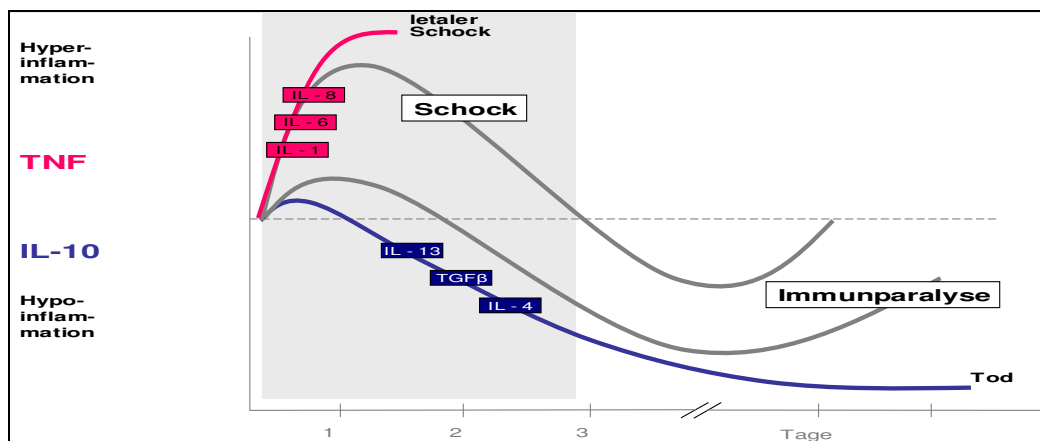


Abbildung 1: Darstellung des biphasischen Verlaufes der Sepsis. Überarbeitet nach Hotchkiss et al. [25]

### 1.1.4 Epidemiologie der Sepsis

In einer großen Multicenterstudie wurden von Angus et al. 2001 mehr als 6 Millionen Krankenhausfälle (n= 6,621,559) in sieben verschiedenen Staaten der USA anhand von ICD 9 Kriterien untersucht [27]. Es wurden 751.000 Patienten, entsprechend 2,26 Fällen pro 100 Krankenhausfälle, mit schwerer Sepsis identifiziert. Von diesen Patienten musste mehr als die Hälfte auf Intensivstationen behandelt werden, 215.000 Patienten verstarben. Damit

verursachte die Sepsis pro Patient Kosten in Höhe von 22100 Dollar und die jährlichen Ausgaben für die USA beliefen sich auf 16,7 Milliarden Dollar. Die Gruppe Alberti et al. untersuchte die Epidemiologie der Sepsis für europäische, kanadische und israelische Kliniken in dem Zeitraum von 1997 bis 1998 [11], dabei wurden 28 Intensivstationen eingeschlossen. Von den 14364 untersuchten Patienten erfüllten 1531 die Kriterien einer Sepsis, von diesen wurden 167 Patienten mit schwerer Sepsis identifiziert. Die Mortalitätsrate betrug in Abhängigkeit der Erkrankungsschwere in diesem Patientenkollektiv 25% bis 60% [11]. Die schwere Sepsis war die führende Todesursache auf nichtkardiologischen Intensivstationen [28, 29].

Ein besonderes Problem der Erkrankung ist die hohe Inzidenz auf Intensivstationen [30, 31]. Zudem wurde von einem Anstieg der Septikämieinzidenz berichtet, schon 1990 veröffentlichte das National Center for Disease Control (CDC) eine Zunahme der Sepsisfälle in den USA von 1979- 1987 um 139% [32]. Wie Martin et al. 2003 berichtete setzt sich diese Entwicklung fort, es wurde bei fallender Mortalitätsrate eine steigende Inzidenz, von 1977- 2000 jährlich um 8,7%, und ein Anstieg der an Sepsis verstorbenen Patienten beobachtet [29].

## **1.2 Das Immunsystem**

### **1.2.1 Immunsystem im Überblick**

Zur Abwehr von pathogenen Keimen stehen dem Organismus verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Das ist zum einen die Haut als physikalische Barriere, diese wird besonders bei intensivmedizinischer Behandlung, oder durch Wunden und Verbrennungen beeinträchtigt. Falls das Pathogen diese erste Hürde überwunden hat und in den Kreislauf gelangt ist, wird das Immunsystem aktiviert.

Das Immunsystem setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, dem angeborenen und dem adaptiven. Mit diesen beiden Komponenten können Pathogene als Reize erfasst, mit einer spezifischen Immunantwort bekämpft und das Ereignis gespeichert werden.

Das angeborene Immunsystem stellt die erste „Verteidigungslinie“ gegenüber Infektionen dar [33]. Dabei wird die Abwehr gegen pathogene Keime ohne Induktion gestartet, sie begrenzt

die Infektion für 4- 5 Tage und aktiviert dabei die erworbene Immunität [34]. Es wird zwischen dem humoralen und zellulären Anteil des angeborenen Immunsystems unterschieden. Dabei stellt das Komplementsystem einen wichtigen Anteil der humoralen Abwehr dar, Monozyten und polymorphkernige Granulozyten repräsentieren die zelluläre Komponente. Nach Entstehung eines Infektionsherdes ist es die Aufgabe der zellulären Anteile Mikroorganismen zu erkennen, zu phagozytieren, Antigene den Lymphozyten zu präsentieren und Zytokine freizusetzen [34-37]. Eine entscheidende Rolle kommt hierbei den Monozyten zu, sie erkennen und phagozytieren nicht nur die Pathogene, sie stellen gleichzeitig einen sehr effektiven Aktivierungsimpuls für die T- Lymphozyten [38] dar.

Das adaptive Immunsystem, dass auch spezifisches Immunsystem bezeichnet wird, wird durch B- und T- Lymphozyten vermittelt. Charakteristisch für dieses System ist die gezielte Beseitigung von Pathogenen durch antigenspezifische Effektorzellen. Dabei werden nach Antigenpräsentation durch das angeborene Immunsystem [34, 35] auf MHC Molekülen der Klasse zwei die B- und T- Lymphozyten aktiviert.

Die B- Zellen sind für die Erkennung und Abwehr von überwiegend extrazellulären Pathogenen, wie Bakterien verantwortlich. Sie produzieren gegen diese Pathogene gerichtete Antikörper, die entweder auf der Zelloberfläche gebunden oder löslich im Serum vorkommen können. Die humorale Immunantwort wird durch T- Lymphozyten vermittelt, diese exprimieren einen membranständigen Rezeptor, den TCR, der sowohl intrazelluläre Pathogene, über MHC I gebundenen Peptide, als auch extrazelluläre, v. a. phagozytierte Proteine auf MHC II erkennt. An der Erkennung sind noch weitere Co- Rezeptoren beteiligt, zu diesen zählen die CD4/CD8 Oberflächenrezeptoren, die zur Unterscheidung von T- Zell Subpopulationen herangezogen werden.

T- Lymphozyten, die in etwa 75% der Lymphozytenpopulation darstellen und die mit ihren unterschiedlichen Subpopulationen einen Anteil von 20- 30% an den Leukozyten haben, spielen eine entscheidende Rolle bei der antigenspezifischen Immunantwort. Sie erkennen Peptidantigene die nach Antigenprozessing auf der Zelloberfläche von Antigen-Präsentierenden Zellen (APC) dargestellt werden.

Im Unterschied zum angeborenen Immunsystem bilden sich im Rahmen der adaptiven Immunantwort Gedächtniszellen, die einer erneuten Infektion mit dem Organismus vorbeugen

können. Die wesentlichen Unterschiede zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Eigenschaften	angeborenes Immunsystem	adaptives Immunsystem
<b>Spezifität</b>	nur für bestimmte Molekülmuster Pathogen und andere nichtmikrobielle Antigene	für Antigene die in verschiedenen Pathogengruppen Vorkommen
<b>Mannigfaltigkeit</b>	limitiert	sehr groß
<b>Gedächtnis</b>	nein	ja
<b>Erkennung von „eigen“</b>	ja	ja, Fehler sind möglich
<b>Komponenten</b>		
<b>Physikalische und chem. Barrieren</b>	Haut, Epithelien, antimikrobielle Agenzien	Lymphozyten in Epithelzellschicht sezernierte Antikörper auf Epitheloberfläche
<b>Plasmaproteine</b>	Komplement	Antikörper
<b>Zellen</b>	Phagozyten (Makrophagen, Neutrophile), Dendritische Zellen	Lymphozyten

**Tabelle 1: Vergleich der Eigenschaften von Komponenten des angeborenen und des adaptiven Immunsystems [39]**

Normalerweise verteidigt das Immunsystem den Wirt vor pathogenen Mikroorganismen. Nur in bestimmten Fällen, beispielsweise bei einer überschießenden Reaktion der angeborenen Immunität in der Sepsis, kann es dem Organismus Schaden zufügen.

### 1.3 HLA– DR Expression auf Monozyten

Mit zunehmenden Verständnis der Pathophysiologie des septischen Krankheitsbildes werden Biomarker zur genauen Identifizierung des Immunstatus immer wichtiger [40]. Dabei zeigte sich die HLA- DR Oberflächen Aktivität von Monozyten als ein guter Marker für die individuelle Immunkompetenz [41].

Eine reduzierte Expression wurde nach kardiopulmonalen- [42], neurochirurgischen- [43] und visceralchirurgischen- Operationen [44], nach Traumen [45], in der späten Phase der Sepsis [46], bei septischem Schock [47], bei hochdosierter Immunsuppression nach Organtransplantationen [48-51], oder bei Pankreatitis gefunden [52, 53].

## 1.4 individuelle Disposition des Patienten

Neben dem Immunsystem spielt die individuelle Disposition für postoperative Komplikationen für das Outcome des Patienten eine entscheidende Rolle. Folgende verschiedene Stratifizierungen und Komorbiditätsfaktoren werden verwendet.

### 1.4.1 chirurgische Hochrisikopatienten in Abhängigkeit von Nebenerkrankungen

Eines der bekanntesten Systeme zur Risikostratifizierung von Patienten ist das System der American Society of Anesthesiologists (ASA) [54-56]. Die 1963 vorgeschlagene Methode bewertet Patienten präoperativ anhand von Funktionseinschränkungen einzelner Organsysteme, anhand von Vorerkrankungen und des Allgemeinzustandes (Tabelle 2).

ASA	Definition
<b>I</b>	<b>Gesunde und Fit erscheinende Patienten</b>
	z. B. lokalisierte Infektion ohne Fieber, Gutartige Tumoren und Weichteildefekte ohne Störungen
<b>II</b>	<b>Leichte Allgemeinerkrankung ohne Leistungseinschränkung</b>
	z. B. Patienten mit Herzerkrankungen, die nicht oder nur wenig leistungsmindernd sind, mäßiger Hypertonus, chronische Bronchitis, mäßiger insulinpflichtiger Diabetes mellitus, hohes Alter, Fettsucht über 30% vom Normalgewicht, akute und chronische Infektionen im Rachenbereich
<b>III</b>	<b>Schwere Allgemeinerkrankung mit Leistungseinschränkung</b>
	z. B. kompensierte und dekomensierte Herzinsuffizienz, Angina pectoris, Emphysem, Ileus, lokale Peritonitis, Immobilisation, schwerer Diabetes mellitus, Leberzirrhose, chronische Niereninsuffizienz, Patienten sind dabei nicht überwiegend Bettlägerich
<b>IV</b>	<b>Schwere Allgemeinerkrankung, die mit oder ohne Operation das Leben des Patienten gefährdet</b>
	z. B. schwere dekomensierte Herzinsuffizienz, akute Myokarditis, Schock verschiedener Ursachen, längerdauernder Ileus, respiratorische Insuffizienz, fortgeschrittene Leber, Nieren und endokrine Insuffizienz
<b>V</b>	<b>Moribund, mit oder ohne Operation ist der Tod innerhalb er nächsten 24 Stunden zu erwarten, sowie Notfälle die anderweitig in Klasse I oder II eingeordnet würden</b>
<b>VI</b>	<b>Hirntoter Patient</b>

Tabelle 2: ASA Klassifikation aus [54-56].

Die ASA Klassifikation wird heute flächendeckend zur präoperativen Beurteilung von Patienten eingesetzt. Dabei korreliert das Outcome der Patienten mit der Schwere der Nebenerkrankungen und der Höhe der ASA Klassifikation [57]. Die ASA Klassifikation wird u. a. verwendet, um eine Prognose zum Ausgang von Operationen abzuschätzen und die Komplikationsrate eines Krankenhauses im Rahmen der Qualitätssicherung zu bestimmen und mit anderen Kliniken zu vergleichen.

Eine weitere Einteilungsmöglichkeit besteht in der Unterscheidung von Hochrisikopatienten und Patienten mit normalem Risiko. In unserer Studie wurde die Charakteristik des chirurgischen Hochrisikopatienten modifiziert nach den Kriterien von Wilson et al. [58] und Shoemaker et al. [59, 60] verwendet. Diese Gruppen analysierten insbesondere den Einfluss der Hämodynamik auf das Outcome nach großen chirurgischen Operationen, dafür wurden chirurgische Patienten untersucht. Die Risikofaktoren beinhalten das Vorliegen von kardiorespiratorischen Begleiterkrankungen, chronischen Funktionsstörungen der Leber und Niere, sowie das Risiko eines ausgedehnten Eingriffes mit zu erwartendem größerem Blutverlust. Bei Vorliegen von mindestens zwei der im folgenden genannten Kriterien wird von einem chirurgischen Hochrisikopatienten ausgegangen.

Kriterien eines Hochrisikopatientens (modifiziert nach Wilson [58] und Shoemaker [59, 60])

Alter über 65 Jahre

Koronare Herzkrankheit (Z. n. AMI, ACVB, PTCA oder Stenteinlage, relevante KHK)

Behandlungspflichtige Herzrhythmusstörungen (Dauermedikation)

Zerebrovasculäre Insuffizienz (Z. n. TIA, Insult)

schwerer Hypertonus (Dauermedikation)

Herzinsuffizienz

Periphere arterielle Verschlusskrankheit

Insulinpflichtiger Diabetes mellitus

Chronische Niereninsuffizienz (Stadium der kompensierten Retention)

COPD, Asthma bronchiale (Dauermedikation)

Lebererkrankungen

Tumorkachexie (Gewichtsverlust  $\geq 10$  kg/Jahr, Hypoproteinämie)

Zu erwartender Blutverlust  $> 2$  l, zu erwartende Operationsdauer  $> 6$  Stunden)

Mehrere Organe infiltrierender Tumor

### 1.4.2 Ernährungszustand

Eine krankhafte Zunahme des Körperfettes, die zur gesundheitlichen Beeinträchtigung führt ist als Adipositas definiert. Von der WHO wurde der BMI als einfache Messung für Adipositas und Übergewicht vorgeschlagen [61], zurzeit ist es das am häufigsten genutzte Klassifikation in epidemiologischen und klinischen Studien. Der BMI wird aus dem Quotienten: Körpergewicht (Kilogramm)/ Körpergröße (Meter<sup>2</sup>) bestimmt. Der Normalwert eines Erwachsenen wurde für Männer und Frauen auf 18,5- 24,99kg/m<sup>2</sup> festgelegt (Tabelle 3) [61], dabei ist für die Interpretation des BMI das Alter einer Person zu berücksichtigen. Neben dem Alter spielt auch das Geschlecht eine wichtige Rolle. Männer haben in der Regel einen höheren Anteil von Muskelmasse an der Gesamtkörpermasse als Frauen. Deshalb sind die Unter- und Obergrenzen der BMI-Wertklassen bei Männern etwas höher als bei Frauen.

BMI kg/m <sup>2</sup>	Klassifikation
<18,5	Untergewicht
18,5- 24,9	Normalgewicht
≥25,0	Übergewicht
25,0– 29,9	Präadipositas
30,0– 34,9	Adipositas Grad 1
35,0- 39,9	Adipositas Grad 2
≥ 40,0	Adipositas Grad 3 (morbide Adipositas)

**Tabelle 3: Klassifikation Adipositas nach WHO [61]**

Die Adipositas ist in allen Industrieländern weit verbreitet und zeigt trotz langjähriger Kampagnen und vielfältiger Interventionsmaßnahmen eine weiter steigende Inzidenz [62]. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der BMI ein guter Indikator für Über- oder Untergewicht ist, weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen dem Body Mass Index und der Mortalität und Morbidität hergestellt [63-72]. Da in den nächsten Jahren eine weitere starke Zunahme der Inzidenz von Adipösen Patienten zu erwarten ist, wird diese Bevölkerungsgruppe in zunehmendem Maße operativen Strategien beeinflussen.

### **1.4.3 Alter**

Aufgrund des demographischen Wandels werden immer mehr alte Patienten behandlungspflichtig [73-77], so wird zum Beispiel für die USA von einer Verdoppelung der Patienten zwischen 65 und 80 bis zum Jahre 2030 ausgegangen [78]. Damit wird es in den nächsten Jahren zu einer Zunahme der Inzidenz von älteren Patienten auf Intensivstationen kommen [79, 80]. Mit zunehmenden Alter werden die verschiedenen Komorbiditäten zu einer wichtigen Komponente des Gesundheitsstatus [81-83]. So konnte zum Beispiel ein Einfluss des Alters auf das Herz-Kreislaufsystem [84], auf die Nierenfunktion und auf das Respirationssystem [85] nachgewiesen werden. Insbesondere die Auswirkungen auf das Immunsystem sind umstritten.

### **1.4.4 maligne Erkrankungen**

Die Interaktionen zwischen dem Immunsystem und malignen Tumoren sind sehr komplex. Es konnte eine Suppression der zellvermittelten Immunität bei Patienten mit malignen Erkrankungen nachgewiesen werden [86-88]. Kolorektale Tumoren hatten ebenfalls Auswirkungen auf die Immunfunktion von Patienten [89]. Dabei kam es bei diesen Patienten zu einem Anstieg von anti- und proinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und IL-6 und zu einem signifikantem Abfall der HLA-DR Expression, die Leukozytenzahlen veränderten sich dabei nicht.

## **1.5 Arbeitshypothese und Fragestellung**

In den vergangenen 20 Jahren wurden wichtige Erkenntnisse zur Pathogenese der Sepsis gesammelt. Im Gegensatz zu dem stark gewachsenen Wissen über die Mediatorvorgänge dieses Krankheitsbildes stehen die relativ geringen Erfolge der bisher daraus hervorgegangenen Interventionsstudien. Dies lässt vermuten, dass viele dieser Studien der Komplexität des Krankheitsbildes nicht gerecht werden. Indem nur ein oder wenige Mediatoren direkt beeinflusst wurden, oder außer acht gelassen wurde ob sich der Patient in einer pro-, oder eher anti-inflammatorischen Lage befand. Hauptaugenmerk wurde auf die Mediatorenseite gelegt. Ziel zukünftiger Studien sollte die Erarbeitung eines vollständigeren



Bildes der immunologischen Situation des Patienten sein. Eine zentrale Bedeutung kommt in diesem Fall der Immundiagnostik unter Nutzung von Biomarkern zu [40].

Eine besondere Stellung in der Immunabwehr nehmen die Monozyten ein. Durch ihre antigenpräsentierenden Eigenschaften und die Ausschüttung von Sauerstoffradikalen stellen sie das Bindeglied der angeborenen Abwehr mit dem adaptiven Immunsystem dar. Als ein Marker zur Monozytenaktivität hat sich die Bestimmung der HLA-DR Oberflächenmoleküle etabliert. In unserer Studie wurde untersucht, ob diese Unterschiede, im Sinne einer genetischen Disposition schon präoperativ Bestand hatten und ob die postoperative Immunsuppression von dem Operationsausmaß beeinflusst wird. Der Nachweis einer präoperativ bestehenden verminderten Immunkompetenz anhand von Monozyten-Markern könnte dem Kliniker wichtige Anhaltspunkte für ein erhöhtes individuelles Sepsis Risiko des Patienten geben.

Weiterhin sollte ein möglicher Trauma-Dosis-Effekt in Abhängigkeit von der Größe des Eingriffes untersucht werden. Hierzu wurden neben Patienten mit großen visceralchirurgischen Eingriffen auch Patienten mit kleineren, zum Teil laparoskopischen Operationen verglichen. In der Vergangenheit konnte bereits ein Einfluss von Operationen auf das Immunsystem nachgewiesen werden, bislang wurde aber die frühe postoperative Phase nur zum Teil und nicht vollständig dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die ersten 72 Stunden nach der Operation untersucht. Diese Daten wurden auch auf ihre Dynamik im Verlauf untersucht, um so wichtige Anhaltspunkte zur postoperativen immunadaptierten Behandlung der Patienten geben zu können.

Eine weitere entscheidende Bedeutung für die Immunfunktion besitzen die T-Lymphozyten als zentraler Bestandteil der adaptiven Abwehr. Im Verlauf einer Sepsis kommt es bei diesen Zellen zu einer Anergie und zur Apoptose. Deshalb war ein Ziel dieser Studie die Genexpressionsanalyse von T-Lymphozyten. Die durch chirurgische Eingriffe ausgelösten Veränderungen auf zellulärer Ebene wurden untersucht. Zum anderen wurde analysiert ob schon zu diesem frühen postoperativen Zeitpunkt zwischen Patienten mit septischen Komplikationen und Patienten ohne Komplikationen unterschieden werden kann.

Neben der Analyse der Immunfunktion chirurgischer Patienten wurde der Einfluss von patientenabhängigen Risikofaktoren, wie Gewicht, Alter und neoadjuvanter Therapieschemata auf den klinischen Verlauf ausgewertet.

Zur präoperativen Risikostratifizierung wurden verschiedene Scoresysteme wie die ASA Klassifikation genutzt, diese wurden auf ihre Aussagekraft für Komplikationshäufigkeit und Mortalität ausgewertet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Die vorliegende Studie wurde im Zeitraum von April 2003 bis April 2004 in der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums der Ernst- Moritz- Arndt Universität Greifswald durchgeführt. Zur prospektiven Datenerfassung wurde präoperativ, 24h, 48h, und 72h postoperativ Blut entnommen. Dabei wurden mindestens 18 jährige Patienten mit elektiven Eingriffen und einem ASA Score von maximal 3 eingeschlossen. Akut entzündliche Erkrankungen sowie rein palliative Eingriffe wurden ausgeschlossen. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von jedem Patienten vor Beginn der Untersuchungen eingeholt. Die Zustimmung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Greifswald zur Durchführung der Studie lag vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit visceralchirurgischen und thorakalen Eingriffen untersucht. Die aufgenommenen Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt: zum einen Patienten mit größeren chirurgischen Eingriffen („major surgery“) und zum anderen Patienten mit kleineren Eingriffen („minor surgery“).

In der Gruppe der „major surgery“ wurden Patienten mit folgenden Eingriffen untersucht:

Thoraxchirurgie	Pneumonektomie, Lobektomie, Keilresektion, Segmenresektion
Ösophagektomien	
Magenchirurgie	totale-, subtotale Gastrektomie
Kolorektale Chirurgie	Hemikolektomie, Sigmarektion, anteriore Rektumresektion, Operation nach Miles
Leberchirurgie	Segmentresektion
Pankreaschirurgie	Whippleoperation, Operation nach Traverso, Duodenumhaltende Pankreaskopfresektion,

In dieser Gruppe wurde ein Großteil der Patienten aufgrund eines malignen Grundleidens behandelt (80%). Insbesondere in der Gruppe der Kolorektalen Chirurgie wurde ein signifikanter Teil der Patienten mit einer neoadjuvanten Therapie vorbehandelt.

Zu den „minor surgery“ Operationen zählten:

Cholezystektomien

Strumektomien

Herniotomien

„Minor surgery“ Operationen zeichneten sich durch eine kurze Eingriffsdauer aus. Diese Patientengruppe diente zur Illustration eines womöglich vorhandenen Trauma- Dosis-Effektes nach chirurgischen Operationen.

## 2.2 Material

### 2.2.1 Verwendete Geräte/Materialien

#### 2.2.1.1 Instrumente

Detektionssystem:

Analytical balance

Sartorius AG

Black-Quarz-Küvette

Hellma GmbH & Co KG

Cell Counter K-4500

Sysmex Deutschland GmbH

Zentrifugen:

Biofuge fresco

Heraeus Instruments

Multifuge 3 S-R

Heraeus Instruments

EBA 12 R

Hettich Centrifugen GmbH & Co KG

Vacuum- Zentrifuge

Johan GmbH

Digital Grafikdrucker UP-D890

Sony

FACSCalibur

Becton Dickinson GmbH

FACScan

Becton Dickinson GmbH

Kühlschrank:

(-20°C)

Liebherr-International AG

(-80°C)

Forma Scientific, Thermo Electron Corporation

Gel Electrophoresis Chamber	BioRad
Hot block (QBT1)	Grant Instruments
Inkubator	Heraeus Instruments
Laminar Flow Station	Nunc GmbH
Magnetic stirrer	Heidolph Instruments
Micropipette	Eppendorf
Multistep-Pipette	Eppendorf
Multi-channel pipette	Brand
MiniMACS™ Separator	Mitenyi Biotech GmbH
P <sub>H</sub> -meter	Hanna Instruments
Fotometer (GeneQuant)	Amersham Pharmacia Biotech
Scanner (Genepix 4000B)	Axon Instruments
Shake incubator	New Brunswick Scientific
Shaker	Vibrax, Janke&Kunkel
Thermal cycler	Biometra
Vortexer (Genie 2)	Scientific Industries
Gel Documentation System	MWG Biotech AG
Wasserbad:	
RM6 Lauda	DRR Wober GmbH & Co
Julabo SW21	Seelbach

### 2.2.1.2 PC Programme und Online- Datenbank

ABI PRISM® 7000 Software	Applied Biosystems
Genepix 4 software	Axon Instruments
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
TallyCal Software	DAKO cytometry
Primer Express® Software v2.0	Applied Biosystems
EndNote v9.0.1	Thomson Corporation

### 2.2.1.3 Material

20 G Nadel	Disped, Witt oHG
ABI PRISM Optical tubes and caps	Applied Biosystems

Adhesive film for PCR Plate	ABgene House
Blood collection tube (Vacutainer, EDTA)	BD biosciences
Centrifuge tube (15 ml, 50 ml)	Falcon BD GmbH
Cover glasses (24 × 60 mm)	Erie Scientific
Leukocyte separation tubes (50 ml)	Greiner Bio-One GmbH
MiniMacs Separation Column	Miltenyi Biotec GmbH
PCR Tubes	PEQLAB biotechnologie GmbH
RNase free reaction tube (0.5 ml, 1.5 ml)	Eppendorf
TruCount Tubes	BD Biosciences

## 2.2.2 Chemikalien und Pufferlösungen

### 2.2.2.1 Reagentien

5- (3- aminoallyl)-UTP	Ambion
7- AAD	BD Biosciences
Ammonium Chloride Lysing Reagent	Becton Dickinson GmbH
Bromo Phenol Blue	SERVA GMBH
BSA	Sigma-Aldrich
Calcium Binding Buffer	Becton Dickinson GmbH
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Promega
DEPC	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
DNA 100 bp ladder	MBI Fermentas GmbH
DNA 1kb ladder plus	MBI Fermentas GmbH
Ethidium bromide	Boehringer
FACS lysing Lösung	Becton Dickinson GmbH
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma-Aldrich
Ficoll density 1.077	Biochrom AG
Fragmentation Puffer	Ambion
Glycogen	Roche Applied Science
Hybridisation Puffer	Ambion
MOPS (10x Puffer)	Ambion
NHS-Cy3	Amersham Bioscience

NHS-Cy5	Amersham Bioscience
PBS (phosphate buffered saline)	BioChrom AG
RNA ladder	Boehringer
TÜRK's Lösung	Merck

## **2.2.2.2 Puffer und Lösungen**

### **2.2.2.2.1 Isolation von T- Lymphozyten und Monozyten**

Phosphat Buffered Salin (PBS) Acid (0,1% NaN<sub>3</sub>)- Pufferlösung

Erythrozyten- Lyse- Lösung (FACS Lysing Solution, Becton Dickenson ®)

Isotonischer Phosphatpuffer, Phosphat-buffered Saline 1 molar (PBS- Acid, ph 7,4)

Albumine bovine fraction Lösungen in PBS zu 1%

Türks Lösung ( Merck Diagnostica®,) zur Zellzahlbestimmung

Fluorosphere beads (DAKO Cytomation)

### **2.2.2.2.2 Chemikalien zur Genexpressionsanalyse**

cDNA Synthese

T7 Oligo(dT) Primer

Reverse Transcriptase

RNase Inhibitor

dNTP Mix

DNA Polymerase

RNase H

Control RNA

1.75 ml Nuclease-freies Wasser

In vitro Transkription

T7 Enzym Mix

T7 10X Puffer

UTP Lösung (50 mM)

aaUTP Lösung (50 mM)

5-(3-amino allyl)-UTP

ATP, CTP, GTP Mix (25 mM each nucleotide) DNase I

cDNA Puffer  
aRNA Puffer  
aRNA Collection Tubes  
Nuclease-freies Wasser  
4M Hydroxylamine  
DMSO

### 2.2.2.3 Kits

Ambion hybridisation Puffer II	Ambion
Annexin V : FITC Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences
Fluorochrome coupled calibration beads	DAKO cytometry
GoTaq <sup>®</sup> DNA polymerase	Promega
Human 40K whole genome array	MWG Biotech
MessageAmp <sup>™</sup> aRNA Kit	Ambion
Pan T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotech GmbH
Qiagen OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN GmbH
qPCR <sup>™</sup> Mastermix Plus for SYBR Green I	Eurogentec Deutschland GmbH
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	QIAGEN GmbH
TaqMan Reverse Transcription reagents	Applied Biosystems

### 2.2.2.4 Magnetische Microbeads

Anti- human CD14	Miltenyl Biotech GmbH
Anti- human CD3	Miltenyl Biotech GmbH
Anti- human CD4	Miltenyl Biotech GmbH
Anti- human CD8	Miltenyl Biotech GmbH



### 2.2.2.5 Antikörper

Spezifität	Format	Hersteller
anti- huCD14	PE-Cy5	Caltag laboratories
anti- huHLA-DR	FITC	BD biosciences
anti- huCD3	PerCP	BD biosciences
anti- huCD4	FITC	BD biosciences
anti- huCD8	PE	BD biosciences
anti- huCD3	PE	BD biosciences
anti- huCD45	FITC	BD biosciences
anti- huCD45	PerCP	BD biosciences
anti- huCD4	PE	BD biosciences
anti- huCD8	FITC	BD biosciences

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Durchflusszytometrie

#### 2.3.1.1 Die Funktion eines Durchflusszytometers

Ein Durchflusszytometer ist ein optisches System, in dem einzelne Partikel in einem Flüssigkeitsstrom fokussiert werden und mithilfe von Streulicht und Fluoreszenzsignalen analysiert werden können. Mit der FACS Analyse (fluorescence- aided cell sorting) der Flusszytometrie- assoziierten Zellsortierung, können grundsätzlich Zellen jeglicher Herkunft analysiert werden, solange sie als Suspension vorliegen.

Zur Analyse passieren die Zellen einer Einzelzellsuspension eine Kanüle, werden durch einen Mantelstrom hydrodynamisch fokussiert und treten durch die Kapillare (250µm x 250 µm) einer Flusszelle aus Quarzglas. Durch diese hydrodynamische Fokussierung wird der Durchmesser des Probenstroms, in dem sich die Blutzellen befinden auf etwa 5 µm reduziert. Dadurch treten die Blutzellen einzeln nacheinander, wie auf einer Perlenkette aufgereiht, durch die Foci mehrerer Laserstrahlen (Abbildung 2). Die Durchflusszytometrie ermöglicht dabei eine sehr große Anzahl von mehr als 100000 Zellen, eine nach der anderen, pro Minute in Echtzeit zu analysieren.

Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserimpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. In der Durchflusszytometrie werden meist Argonionen Laser und Helium Neon Laser verwendet (Wellenlänge des Argon Lasers= 488 nm, Wellenlänge des Helium Neon Lasers= 633 nm).

Streulicht entsteht wenn eine Zelle Licht einer Wellenlänge aufgrund ihrer Eigenschaften mit unterschiedlicher Qualität und Quantität bricht. Somit lassen sich Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) durch unterschiedliche Lichtstreuung darstellen. Da das Licht nicht gleichmäßig streut, wird es als Vorwärtsstreulicht, Forward Angle Light Scatter (FSC), und zum geringen Teil als Seitwärtsstreulicht, Side Scatter (SSC) erfasst (Abbildung 2). Das Vorwärtsstreulicht reflektiert die Größe, das Seitwärtsstreulicht die Granularität der untersuchten Zellen. Bereits anhand dieser beiden Parameter lassen sich die wichtigsten Leukozytenpopulationen, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten, voneinander unterscheiden. Die im Flüssigkeitsstrom gestreuten Signale werden in einem optischen System dem Durchflusszytometer verarbeitet.

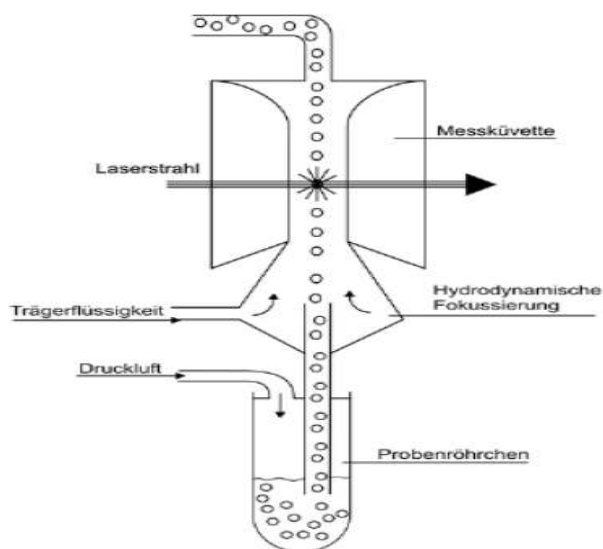


Abbildung 2: vereinfachtes Prinzip der FACS Analyse, aus: Betriebsanleitung des FACSScan®

### 2.3.1.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Neben dem Streulicht erfasst das Durchflusszytometer auch die Fluoreszenzemission jeder einzelnen Zelle. Dabei haben verschiedene fluoreszierende Farbstoffe (Fluorochrome) unterschiedliche Frequenzbereiche als Anregungsspektrum. Diese Wirkungsweise wird bei der indirekten Immunfluoreszenz genutzt. Bei dieser werden Oberflächenantigene durch die Bindung von für das jeweilige Antigen spezifischen monoklearen Antikörper an der Zelloberfläche nachgewiesen. Dieser spezifische Antikörper wird dann in einem zweiten Schritt durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Fluorochrom) detektiert. Fluoresceinisothiocyanat- (FITC, Fluoreszin) markierte Zellen leuchten in gelb grünen Licht bei ca. 515 nm (Maximum des Fluoreszenzspektrums), während R- Phycoerythrin- (PE) markierte Zellen rot- oranges Licht bei ca. 580 nm ausstrahlen. Um eine Unterscheidung der Fluorochrome durch das Gerät zu ermöglichen muss neben dem gemeinsamen Anregungsbereich eine deutliche Unterscheidung der einzelnen Emissionsmaxima (Tabelle 4) gegeben sein. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch den Photodetektor registriert wird, verhält sich hierbei proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/ Zelle. Da eine Überlappung der verschiedenen Fluoreszenzfarben in ihren Wellenlängen nicht auszuschließen ist, ist mitunter eine Korrektur (Kompensation) der Messung notwendig (Abbildung 3).

Farbstoff	Abkürzung	Anregungsmaximum	Emmissionsmaximum
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	488 nm	530 nm
Propidiumiodid	PI	488 nm	620 nm
Phycoeritin	PE	488 nm	580 nm

Tabelle 4: Farbstoffe zur Anwendung in der Durchflusszytometrie

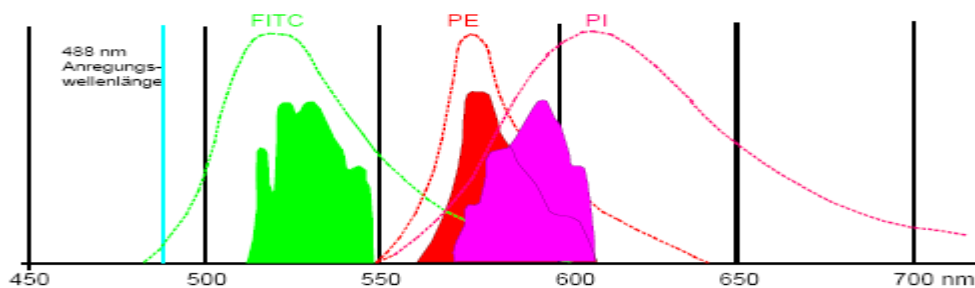


Abbildung 3: Darstellung verschiedener häufig genutzter Fluorochrome

### 2.3.1.3 FACS Analyse der HLA- DR Expression auf Monozyten

Hierbei wird die Expressionsdichte (Anzahl der Antigenmoleküle pro Einzelzelle) nachgewiesen. Bei sättigender Antikörperfärbung ist dabei die Fluoreszenzintensität proportional der gebundenen Antikörper-/ Fluorochrommoleküle. Die Kalibrierung des Durchflusszytometers erfolgte mit Fluorochrome coupled calibration beads (DAKO Cytomation), es wurde eine Kalibrierungskurve erstellt und aus dieser wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten in MEF- Werte (Molecules of Equivalent Fluorochrome) umgerechnet. Diese repräsentieren die Absolutzahl gebundener Fluorochrommoleküle je Einzelmonozyt. Das Patientenblut wurde dabei mit dem CD 14 Antikörper, als „TriColor“-Konjugat und mit HLA- DR Antikörper, als FITC- Konjugat angefärbt. Nach Antikörperfärbung, Erythrozytenlyse und anschließend verschiedenen Waschrufen wurde die Analyse der HLA- DR Expression mittels Durchflusszytometrie vorgenommen. Monozyten wurden entsprechend ihrem forward- und side scatter Profil sowie der positiven Färbung mit Antikörpern gegen CD 14 identifiziert und die HLA- DR Expression detektiert.

### 2.3.1.4 Isolation von T- Zellen und Monozyten aus peripherem Blut

Aus 10 ml heparinisertem EDTA Blut wurden Blut Monozyten (PBMC) unter Verwendung einer Ficol- Dichtegradienten- Zentrifugation isoliert. Das Vollblut wurde mit PBS zentrifugiert (RT, 1500 x g). Das PBS verhindert die Aktivierung der Zellen während der Präparation. In der Zentrifuge trennen sich die Blutzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen spezifischen Dichte. Mononukleäre Zellen liegen als Ring auf dem Ficol, überschichtet mit Thrombozytenreichen Plasma, Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren. Der MHC Ring wurde in ein neues Steriles Röhrchen überführt und erneut zwei mal gewaschen, anschließend erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl [90]. Nach Lösung in MACS Puffer wurden den Zellen Anti- human CD14 Microbeads nach der Vorschrift der Firma Miltenyl Biotech GmbH zugefügt und bei 4°C auf dem Vortex für 5 min. inkubiert. Die Separation der CD 14 positiven Zellen erfolgte mit Hilfe von MiniMacs- Separator- Säulen (Miltenyi Biotec GmbH). Nach dem Beladen wurden die Säulen 2mal mit MACS Puffer gewaschen. Zur Elutierung der Säulen wurden diese von dem Magneten entfernt. Das Elutat wurde erneut auf dem Vortex gemischt, erneut 2 mal gewaschen und mit MACS Puffer elutiert. Dem ersten Elutat wurden Anti- human CD3 Microbeads hinzugefügt und inkubiert. Zur Separation der

T- Zellen (CD 3 positiv) wurden wie bei den CD 14 positiven Zellen verschiedene Waschschrirte und Elutierungen durchgeföhrt.

### 2.3.1.5 Datendarstellung FACS

Zunächst wurden die Zellpopulationen im Vorwärts und Seitwärtsstreulicht FSC bzw. SSC betrachtet, in diesem Streulichthistogramm ist die Qualität einer Probe beurteilbar. Partikel die sehr klein sind kommen ganz links zur Darstellung, sie werden als Verschmutzung angesehen und durch Setzen einer Grenzlinie von der Auswertung ausgeschlossen (Threshold). Beispielhaft wurden die Färbung CD45 gegen CD3 dargestellt (Abbildung 4). Im ersten Bild sind die Zellen vor der Reinigung mit noch deutlichem Threshold und einem Monozytenanteil von 41,4% abgebildet. Nach Reinigung der Probe sind 97,5% der dargestellten Zellen CD3 positive T- Lymphozyten.

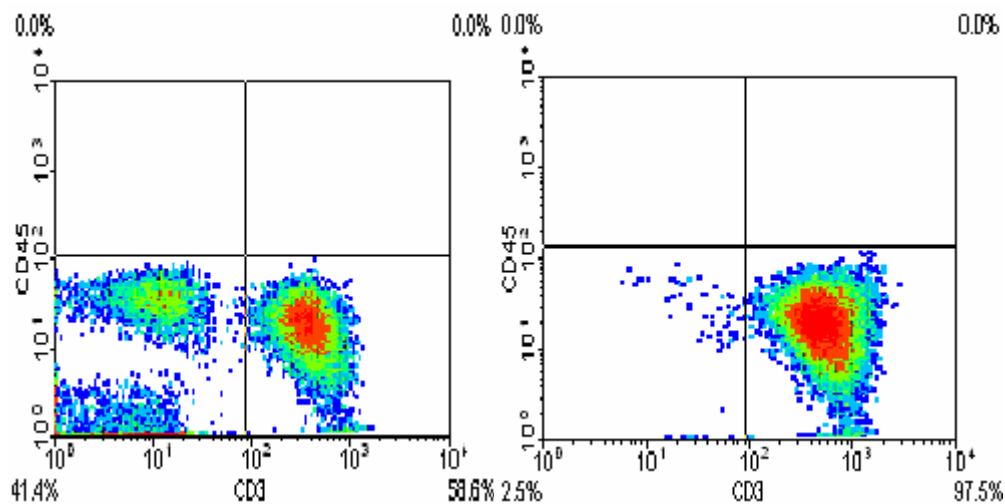


Abbildung 4: Darstellung von FACS Scan FSC und SSC vor und nach Reinigung, Färbung CD45 gegen CD3

## 2.3.2 Microarray Analyse

### 2.3.2.1 Einführung

Die Anwendung der DNA- Microarrays konzentriert sich auf zwei Bereiche, die (Gen-) Expressionsanalyse und den Nachweis von DNA- Varianten, z.B. für die Suche nach Mutationen, Polymorphismen und zur Analyse des Genotyps.

Dabei werden Gen- spezifische DNA- Fragmente auf einer Matrix immobilisiert. Diese Matrix wird simultan mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierter cDNA von Test- und Referenz-Zellen hybridisiert. Die Art der generierten Fluoreszenzsignale erlaubt eine Bestimmung der relativen Menge von RNA- Transkript in den Test- bzw. Referenzzellen. Dies erlaubt die Analyse der Expression von 10.000en von Genen in einem einzelnen Experiment.

Es werden zwei Arten von Microarraytechniken unterschieden:

Das sind zum einen die cDNA Microarrays. Für diese Arrays werden meist PCR amplifizierte cDNA- Fragmente mit einer Länge von 0,6-2.4 kb gespottet. Es können abhängig von der Spotgröße bis zu 30.000 cDNA- Spots auf einen Objektträger gedruckt werden, üblich sind jedoch Arrays mit bis zu 10.000 Spots. cDNA Arrays sind aufgrund ihrer relativ langen gespotteten Fragmente spezifisch und verursachen starke Signale.

Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung von Arrays sind Oligonukleotid Arrays, sie stellen eine attraktive Alternative zu cDNA Arrays dar. Hierbei wird zwischen kurzen und langen Oligos unterschieden:

Lange Oligos (50- 120 Nukleotide) liefern gute Hybridisierungssignale und sind recht spezifisch. Es entfällt die für cDNA Arrays notwendige Auswahl, Anzucht und DNA- Isolation aus cDNA Klonen. Die Verwendung kommerziell erhältlicher Oligo- Sets verringert erheblich die Arbeit bei der Bereitstellung von Array- tauglichem Material.

Kurze Oligos (12- 25 Nukleotide) bieten ein erheblich gesteigertes Risiko von Fehlhybridisierungen. Daher werden für jedes Gen ~ 11- 20 spezifische Oligos synthetisiert. Diese werden jeweils durch ein sog. mismatch- Oligo (mit Basenaustausch) ergänzt. Die Synthese der Oligos erfolgt meist direkt auf dem Trägermaterial z. B. unter Zuhilfenahme photolithographischer Techniken, wie sie bei der Halbleiterherstellung verwendet werden.

DNA- Microarrayanalysen ermöglichen so z. B. den Vergleich von krankem (z. B. Tumor) Gewebe versus Normalgewebe oder die Untersuchung von Zellkulturen, die unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt wurden (Stressfaktoren, Medikamente). In dieser Studie wurden sie zur Analyse des Aktivierungsstatus von T- Zellen nach großen chirurgischen Eingriffen genutzt. Es wurden Patienten mit septischen Komplikationen und ohne Komplikationen mithilfe der cDNA Microarray Technik untersucht.

### **2.3.2.2 Präparation von Gesamt- RNA**

Nach Positivselektion der T- Lymphozyten mit magnetic beads und Kontrolle der Reinheit der isolierten Targetzellen durch die FACS Analyse wurde zur Präparation der Total- RNA der RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN GmbH) verwendet. Dieser basiert auf einer Guanidiniumisothiozyanat Extraktion mit anschließender Isolierung der RNA über einer Säule. Die RNA wurde mit RNase- freiem DEPC H<sub>2</sub>O elutiert und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

### **2.3.2.3 RNA Amplifikation**

Da das Ausgangsmaterial für die Isolierung der RNA auf 10 ml je Patient limitiert war und besonders nach Operationen eine stark verminderte T- Zell Population im Patientenblut zu beobachten war, wurde eine Amplifikation notwendig. Es wurde die Amino Allyl MessageAmp<sup>™</sup> aRNA Amplification mit einer T7 promoter- aRNA verwendet. (Ambion, MessageAMP aRNA Kit). Zur Amplifikation wurde zunächst die RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben, dafür wurde eine reverse Transkriptase mit oligo (dt) primer, einen T7 Promotor enthaltend, genutzt. Als Produkt dieser modifizierten reversen Transcriptase- Reaktion lagen einzelsträngige cDNA's vor, die an den 5' und 3' Enden spezifische Adaptorenssequenzen trugen. Nach der cDNA Reinigung wurde durch die in vitro transkription mit der T7 RNA Polymerase hunderte bis tausende von antisense RNA Kopien von jeder mRNA erstellt. Die antisense RNA wird auch als aRNA bezeichnet.

### **2.3.2.4 Labeling der aRNA und Hybridisierung**

Nach Reinigung der aRNA wurden die präoperativen Proben von jeweils zwei Patienten mit septischen Komplikationen und zwei Patienten ohne Komplikationen gepoolt und mit Cy3 gekoppelt. In gleicher Weise wurde mit den postoperativen Proben, Tag eins bis drei, dieser Patienten verfahren, diese wurden mit Cy5 angefärbt. Nach einer erneuten Reinigung der Proben wurden jeweils die präoperativen mit den postoperativen Proben hybridisiert. Es wurden die Patienten ohne Komplikationen und die Patienten mit septischem Verlauf verglichen.

### 2.3.2.5 MWG– 40K oligonukleotid Arrayanalyse

Diese aRNA Mixtur wurde auf den cover slip aufgetragen und das MWG– 40K oligonukleotid Array wurde durchgeführt.

Dabei wurde der Array in der Hybridisationskammer platziert und mit 10µl DEPC behandeltem Wasser versetzt, unter Aufrechterhaltung einer konstanten Feuchtigkeit innerhalb der Kammer wurde nach mehrmaligen Waschschritten und Zentrifugationen der Array analysiert.

Die hybridisierten Arrays wurden mit dem Genepix 4000B Scanner (Axon Instruments), bei den Wellenlängen von 532 nm und 635 nm sowie bei PMT Einstellungen von 650 nm und 700 nm analysiert. Das 16- bit zwei Kanal TIFF array image wurde von GenePix Pro 4 (Axon Instruments) analysiert. Die Probeneigenschaften wurden identifiziert und das background Signal wurde subtrahiert, die mittleren Fluoreszenzwerte wurden für beide Wellenlängen angegeben.

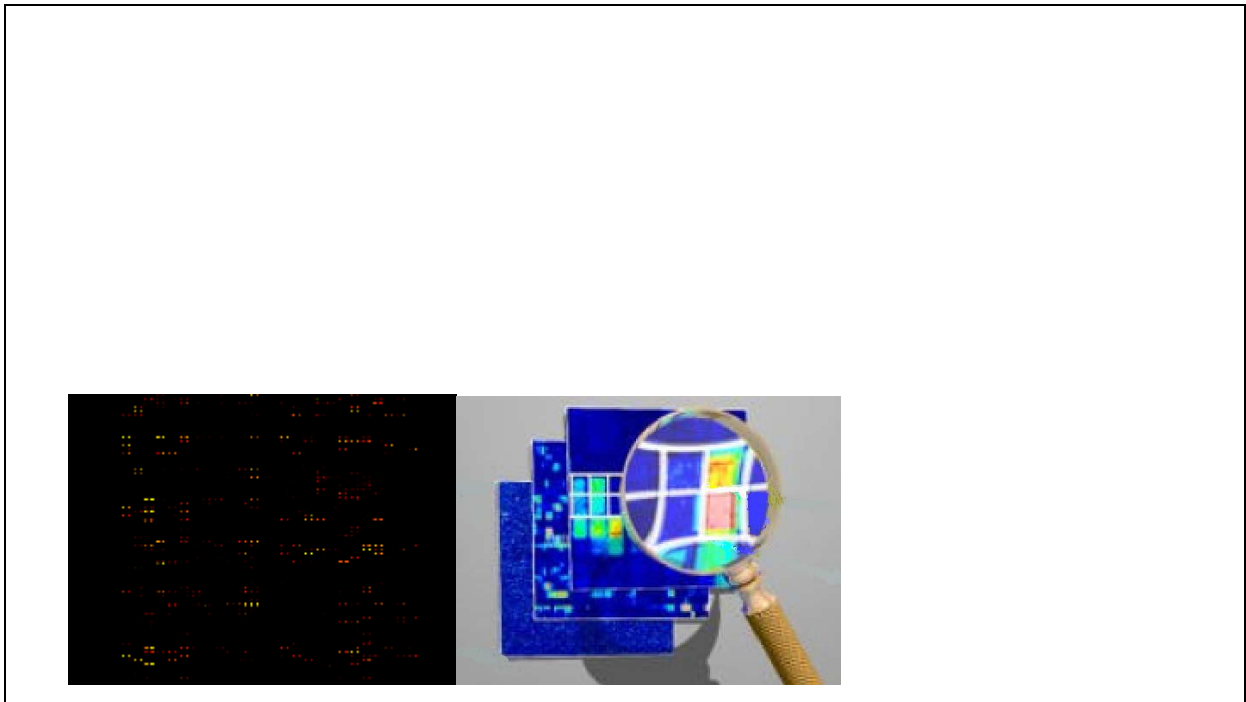


Abbildung 5: schematischer Ablauf der Mikroarray Analyse, unter Verwendung von Oligonucleotide Microarray, MWG Human 40k Array



## 2.4 Datenanalyse

Statistische Analyse der Daten konsekutiver Blutentnahmen präoperativ und in den ersten drei Tagen nach erfolgter Operation wurden mit dem nicht- parametrischen Mann- Whitney U Test für metrisch skalierte Variablen durchgeführt. Bei diskreten unabhängigen Stichproben wurden deren prozentuale Häufigkeiten berechnet und diese mittels Chi- Quadrat Test sowie dem Exact- Test nach Fischer auf statistisch signifikante Unterschiede auf deren Verteilung hin untersucht.

Zur Durchführung der statistischen Analysen wurde die Software PRISM® (GraphPad Software Inc.) genutzt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$ SEM angegeben. Bei allen angeführten statistischen Berechnungen wurde das Signifikanzniveau bei  $p < 0,05$  gesetzt

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Demographie

In die vorliegende Studie wurden 118 Patienten eingeschlossen, dabei war der Anteil der männlichen Patienten gegenüber den weiblichen Probanden deutlich höher ( $\frac{\text{♂}}{\text{♀}}$ , 74/44). Es handelte sich um 101 Patienten ( $\frac{\text{♂}}{\text{♀}}$ , 63/38) mit großen visceralchirurgischen Eingriffen und 17 ( $\frac{\text{♂}}{\text{♀}}$ , 11/6) mit kleineren Eingriffen (Tabelle 7). Der Body Maß Index lag im Median bei 26,1 („minor“ Chirurgie: 27,38, „major“ Chirurgie 25,89). Dabei zeigten sich keine signifikant unterschiedlichen BMI Werte zwischen den einzelnen Patientengruppen und den unterschiedlichen Operationen (Tabelle 5).

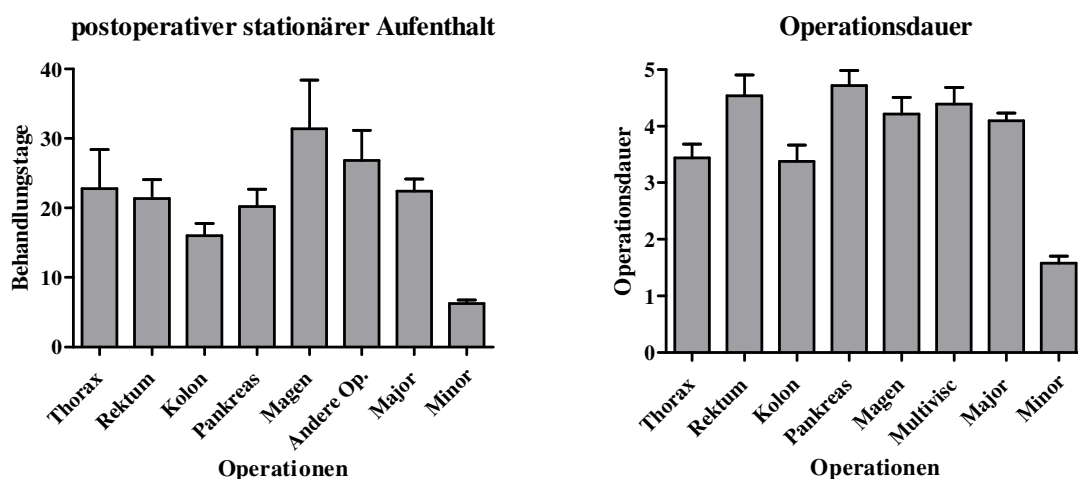
Patienten mit Pankreasoperationen waren signifikant jünger als Patienten mit kolonchirurgischen- ( $p < 0,0005$ ), mit rektumchirurgischen- ( $p < 0,005$ ), mit magenchirurgischen- ( $p < 0,0005$ ), mit multivisceralen Eingriffen ( $p < 0,005$ ) und sie waren auch jünger als alle „major“ Operationen im Mittel ( $p < 0,05$ ). Ebenfalls waren Patienten mit Thoraxchirurgie jünger als Patienten mit kolonchirurgischen Eingriffen ( $p < 0,05$ ) und Patienten nach Magen Chirurgie ( $p < 0,05$ ). In der „minor“ Gruppe war der postoperative stationäre Aufenthalt signifikant kürzer (6,25 Tage vs. 22,36 Tage in der „major“ Gruppe,  $p < 0,0001$ ). In der Gruppe der größeren chirurgischen Eingriffe wurde die kürzeste postoperative Behandlungsdauer bei Patienten mit kolonchirurgischen Eingriffen nachgewiesen ( $16,00 \pm 7,79$  Tage). Signifikante Unterschiede zeigten sich im Vergleich zu „Magenoperationen“ ( $p < 0,05$ ) und zu den „anderen Operationen“ ( $p < 0,05$ ). Bei Patienten mit kleineren chirurgischen Eingriffen unterschied sich die Liegedauer der einzelnen Gruppen nicht signifikant untereinander (Abbildung 6a).

Bei der Operationsdauer zeigte sich erwartungsgemäß ein deutlicher Unterschied zwischen den großen chirurgischen Operationen und der „minor“ Chirurgie ( $1,58 \pm 0,47$  Stunden zu  $4,12 \pm 1,32$  Stunden bei den größeren chirurgischen Eingriffen,  $p < 0,0001$ ). thorax- und kolonchirurgische Eingriffe hatten unter den „major“ Operationen die kürzeste Operationszeit. Eine signifikant kürzere Operationsdauer der Thoraxchirurgie war im Vergleich zur Pankreaschirurgie ( $p < 0,005$ ) sowie zu den „anderen Operationen“ ( $p < 0,05$ ) nachweisbar. Die kolonchirurgischen Operationen beanspruchten weniger Zeit als die Rektumchirurgie ( $p < 0,0001$ ), die Pankreaschirurgie ( $p < 0,0005$ ), die Magen Chirurgie ( $p < 0,05$ ),

und die Chirurgie der „anderen Eingriffe“ ( $p < 0,05$ ) und sogar weniger als der Median der größeren chirurgischen Eingriffe (n.s.) (Abbildung 6b).

Operationen	Anzahl	Verteilung	BMI	Alter	Stat. Auf.	OP Dauer
Minor	17	11/6	27,38±4,18	59,65±15,52	6,25±1,92	1,58±0,47
Gallenblase	5	4/1	27,07±5,25	64,20±9,11	6,80±1,72	1,25±0,25
Schilddrüse	4	0/4	26,98±1,64	54,00±8,92	5,75±0,83	1,95±0,09
Hernien	8	7/1	27,77±4,28	59,63±19,79	6,14±2,36	1,56±0,53
Major	101	63/38	25,89±4,74	63,67±12,76	22,36±17,57	4,12±1,32
Thorax	14	12/2	25,70±3,74	60,86±12,23	22,79±20,26	3,41±0,81
Rektum	19	12/7	25,45±5,58	64,53±8,6	21,37±11,49	4,54±1,47
Kolon	22	16/6	26,94±4,82	68,95±13,83	16,00±7,79	3,38±1,28
Magen	18	8/10	26,46±4,64	69,70±8,41	31,41±27,87	4,18±1,19
Pankreas	15	7/8	24,92±5,26	51,73±13,25	20,20±9,23	4,73±1,05
Andere	13	8/5	25,37±2,97	63,46±6,61	26,85±15,06	4,39±0,97
Gesamt	118	74/44	26,1±4,69	63,17±13,27	20,14±17,25	3,75±1,53

**Tabelle 5: Durchgeführte Operationen bei den eingeschlossenen Patienten. Geschlechterverteilung ( $\beta/\alpha$ ) sowie Mittelwerte und Standardabweichung für Operationsdauer (Stunden), Alter (Jahre), stationärer Aufenthalt postoperativ (Tage) und Operationsdauer (Stunden) werden dargestellt. In der Gruppe multiviscerale Operationen wurden Ösophagus- und Leberchirurgische Eingriffe neben multivisceralen Resektionen miterfasst.**



**Abbildung 6: 6a) Darstellung des postoperativen stationären Aufenthalts in Tagen. 6b) Operationsdauer in Stunden in Abhängigkeit von der durchgeführten Operation. (n= siehe Tabelle 5)**

### 3.2 Ergebnisse der klinischen Beobachtungen

Während der ersten 28 Tage postoperativ verstarben 4 Patienten (4/101, 3,96% der großen visceralchirurgischen Eingriffe). Die Krankenhausmortalitätsrate über die gesamte stationäre Liegedauer betrug 5,94% (6/101). In Relation zu allen eingeschossenen Patienten betrug die Mortalitätsrate: 3,3% (4/118) beziehungsweise 5,1% (6/118). Während des Krankenhausaufenthaltes erkrankten 12 Patienten der „major Chirurgie“ an einer schwerer Sepsis (12/101, 11,88%), 70 Patienten hatten einen unauffälligen postoperativen Verlauf (Tabelle 6). Patienten mit einer schweren septischen Komplikation hatten einen signifikant höheren Body Maß Index als Patienten ohne Komplikationen ( $p < 0,05$ ). Das Alter der Patientengruppe mit komplikationslosem Verlauf lag im Median bei  $63,54 \pm 13,66$  Jahren. Die Patienten mit schwerer Sepsis waren mit einem Durchschnittsalter von  $67,33 \pm 3,64$  nicht signifikant älter. Die Operationsdauer ( $3,99 \pm 1,26$  zu  $4,55 \pm 1,06$  Stunden,  $p < 0,05$ ) und die Krankenhaus Behandlungsdauer ( $16,31 \pm 7,06$  zu  $46,25 \pm 28,69$  Tage,  $p < 0,001$ ) war bei Patienten mit schwerer Sepsis signifikant erhöht. Während es sich bei Patienten mit schwerer Sepsis in der Mehrzahl der Fälle um Frauen handelte, zeigte sich bei dem Vergleich der Patienten ohne Komplikationen die umgekehrte Geschlechtsverteilung ( $p < 0,05$ ) (Tabelle 6). Die Mortalität der schweren Sepsis lag bei 50% (6/12).

	Keine Komplikationen	schwere Sepsis	Gesamt	p
Alter	63,05±13,66	67,33±3,64	63,38±13,04	n. s.
BMI	24,95±4,16	27,05±4,73	25,56±4,49	<0,0001
OP Dauer	3,99±1,26	4,55±1,06	4,05±1,25	<0,0001
Stat. Auf.	15,83±6,76	46,25±28,69	20,44±16,22	<0,0001
Geschlecht	48/22	4/8	52/30	<0,05

**Tabelle 6:** Überblick über die demografischen Daten, ihre Verteilung zwischen Patienten mit schwerer Sepsis und Patienten ohne Komplikationen in der Gruppe der großen visceralchirurgischen Eingriffe. Alter in Jahren, Operationsdauer in Stunden, stat. Aufenthalt in Tagen, Geschlecht: ♂/♀.

Von den untersuchten Patienten mit großen visceralchirurgischen Eingriffen hatten insgesamt 31 postoperative Komplikationen (31/101, 30,7%), in der „minor“ Chirurgie Gruppe trat bei einem Patienten eine Wundheilungsstörung auf (1/17, 5,88%). Die 31 postoperativen Komplikationen der „major“ Gruppe resultierten aus 9 Wundheilungsstörungen (9/31, 29,0%), 8 Anastomoseninsuffizienzen (8/31, 25,8%), 5 Patienten mit Pankreatitis (5/31, 16,1%), 7 Patienten mit respiratorischen Komplikationen (7/31, 22,5%) sowie 2 Patienten mit

anderen Komplikationen (2/31, 6,5%). Bei einer postoperativ aufgetretenen Pankreatitis kam es im Verlauf häufig zu einer schweren Sepsis, diese war mit einer hohen Mortalität assoziiert (4/5 Patienten entwickelten eine schwere Sepsis, 80%, 3/5 Patienten verstarben, 75%) (Tabelle 7). Unterschiede zwischen den anderen Gruppen ließen sich nicht nachweisen.

	Komplikationen	schwere Sepsis	verstorben
<b>Anastomoseninsuff.</b>	8/31 (25,8%)	5/12 (41,7%)	2/6 (33,3%)
<b>Pankreatitis</b>	5/31 (16,1%)	4/12 (33,3%)	3/6 (50%)
<b>Wundheilungsstörungen</b>	9/31 (29,0%)	0/12 (0%)	0/6 (0%)
<b>respiratorischen Kompl.</b>	7/31 (22,5%)	3/12 (25%)	1/6 (16,7%)
<b>Andere</b>	2/31 (6,5%)	0/12 (0%)	0/6 (0%)

**Tabelle 7: Aufstellung der verschiedenen Ursachen postoperativer Komplikationen**

### 3.2.1 Nebenerkrankungen

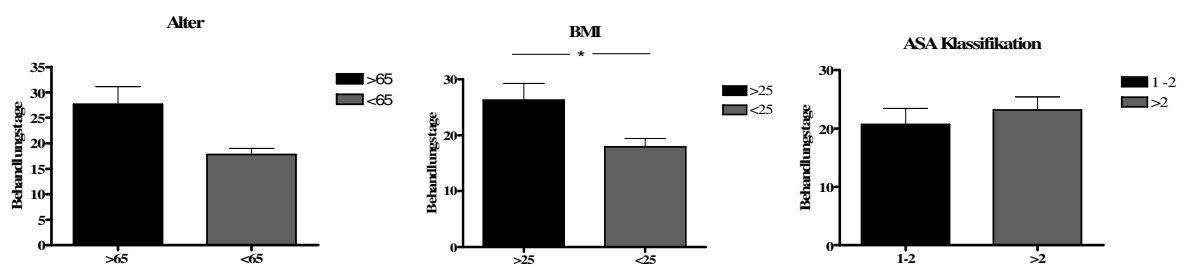
Bei näherer Betrachtung des klinischen Verlaufes, in Abhängigkeit des BMI und des Alters der Patienten, zeigten sich gravierende Unterschiede in den einzelnen Gruppen. Das Patientenkollektiv der „major“ Chirurgie wurde in jeweils 3 Gruppen (BMI: <25, 25- 30, >30; Alter: <65, 65- 79, >80) unterteilt. Mit ansteigendem BMI nahm die Häufigkeit für schwere postoperative Komplikationen zu. Besonders Patienten mit einem BMI > 30 zeigten eine hohe Inzidenz der schweren Sepsis (30,0%). Im Vergleich mit übergewichtigen Patienten (BMI 25-30) waren diese Unterschiede signifikant ( $p < 0,05$ ), zwischen normgewichtigen Patienten und adipösen Patienten sogar hoch signifikant ( $p < 0,01$ ). Auch bei dem Auftreten von postoperativen Komplikationen bestanden diese Unterschiede (<25 vs. >30,  $p < 0,05$ ). Ein verlängerter postoperativer stationärer Aufenthalt wurde bei adipösen Patienten gesehen. In den verschiedenen Altersgruppen zeigte besonders die Gruppe der 65-79 Jährigen einen verlängerten Klinikaufenthalt. Die Operationsdauer der Patienten <65 Jahre war signifikant höher als bei >80 jährigen Patienten ( $p < 0,05$ ). Das unterschiedliche Alter der Patienten wirkte sich nicht auf die Häufigkeit postoperativer Komplikationen aus (Tabelle 8).

BMI	Geschlecht	OP Dauer	Stat. Auf.	Komplikationen	schwere Sepsis	verstorben
<25	30/17	3,86±1,12	17,39±10,23	9/47 (19,1%)	3/47 (6,4%)	2/47 (4,2%)
25-30	24/10	4,41±1,43	23,91±16,34	12/34 (35,3%)	3/34 (8,8%)	1/34 (2,9%)
>30	9/11	4,13±1,38	30,42±27,91	10/20 (50,0%)	6/20 (30,0%)	3/20 (15,0%)
Alter						
<65	28/16	4,39±1,50	19,66±8,11	12/44 (27,3%)	4/44 (9,1%)	2/44 (4,5%)
65-79	29/18	3,99±1,06	26,49±22,89	16/47 (34,0%)	8/47 (17,0%)	4/47 (8,5%)
>80	6/4	3,30±0,81	21,00±11,44	3/10 (30%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)

**Tabelle 8:** Dargestellt werden die unterschiedlich stratifizierten Gruppen, in Abhängigkeit von BMI und Alter. Geschlecht: ♂/♀., Op Dauer in Stunden, stat. Aufenthalt in Tagen

BMI	Geschlecht	OP Dauer	Stat. Auf.	Komplikationen	schwere Sepsis	verstorben
<25	30/17	3,86±1,12	17,39±10,23	9/47 (19,1%)	3/47 (6,4%)	2/47 (4,2%)
>25	33/21	4,37±1,47	26,13±21,49	22/54 (40,7%)	9/54 (16,7%)	4/54 (7,4%)
Alter						
<65	28/16	4,39±1,50	19,66±8,11	12/44 (27,3%)	4/44 (9,1%)	2/44 (4,5%)
>65	35/22	3,90±1,11	25,16±21,73	19/57 (33,3%)	8/57 (14,0%)	4/57 (7,0%)

**Tabelle 9:** Dargestellt werden die unterschiedlich stratifizierten Gruppen, in Abhängigkeit von BMI und Alter. Geschlecht: ♂/♀., Op Dauer in Stunden, stat. Aufenthalt in Tagen



**Abbildung 7:** Dargestellt wird die Behandlungsdauer bei Patienten 7a) mit unterschiedlichem Alter 7b) unterschiedlichem BMI 7c) unterschiedlicher ASA Klassifikation

In einer weiteren Gruppierung wurde zwischen Patienten unter und über 65 Jahre unterschieden. Bei dem Ernährungszustand der Patienten wurden auch präadipöse Patienten mit in die Gruppe der adipösen eingeschlossen (Tabelle 9). Es zeigten sich auch hier in der Gruppe der übergewichtigen Patienten eine erhöhte Rate von Komplikationen und schwerer Sepsis im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes (Komplikationen und schwere Sepsis <25 vs. >25, jeweils  $p < 0,05$ ). Hierbei war auch die Behandlungsdauer signifikant verlängert ( $p < 0,05$ )

(Tabelle 9, Abbildung 7b). Im Gegensatz dazu zeigten sich bei älteren Patienten nur geringe Unterschiede bei den postoperativen Komplikationen und der Behandlungsdauer (Tabelle 9, Abbildung 7a).

### 3.2.2 Einteilung der Patienten nach der ASA Klassifikation

Alle in unserer Studie eingeschlossenen Patienten wurden präoperativ anhand des ASA Scores beurteilt. Bei dem Vergleich der unterschiedlichen Schweregrade zeigte sich, dass eine zunehmende ASA Kategorie mit einem verlängerten stationären Aufenthalt assoziiert war (Tabelle 10, Abbildung 7c). Patienten mit einem erhöhten ASA waren hochsignifikant älter (ASA 1-2  $58,49 \pm 13,14$ ; ASA >2  $66,1 \pm 11,94$   $p < 0,01$ ), die Häufigkeit von postoperativen Komplikationen unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Bei den kleineren chirurgischen Operationen war eine statistische Auswertung aufgrund zu geringer Patientenzahl mit einem ASA >2 nicht möglich

ASA	Geschlecht	OP Dauer	Stat. Auf.	Komplikationen	schwere Sepsis	verstorben
1-2	21/10	4,39±1,45	20,71±14,92	6/31 (19,4%)	5/31 (16,1%)	2/31 (6,4%)
>2	42/28	3,98±1,21	23,10±18,57	25/70 (35,7%)	7/70 (10,0%)	4/70 (5,7%)

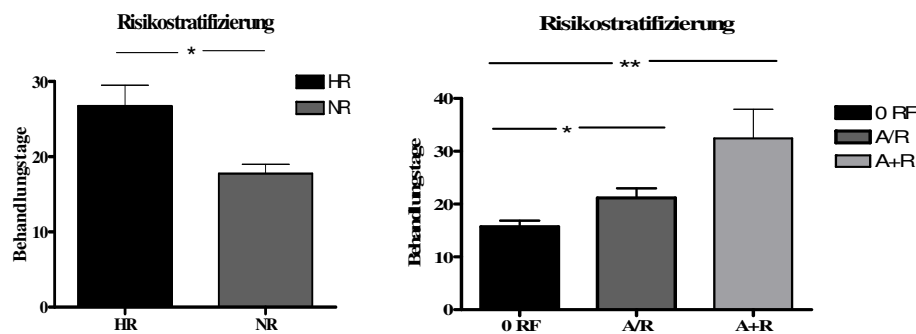
**Tabelle 10: Darstellung der unterschiedlichen Geschlechtsverteilung, der OP Dauer (in Stunden), sowie der postoperativen Komplikationen in Abhängigkeit von ASA der Patienten, Geschlecht: ♂/♀., Op Dauer in Stunden, stat. Aufenthalt in Tagen (ASA 1-2 n= 31, ASA> 2 n= 70)**

### 3.2.3 Chirurgische Hochrisikopatienten in Abhängigkeit von Nebenerkrankungen

Von den 101 untersuchten Patienten der „major“ Chirurgie Gruppe erfüllten 59 die Kriterien eines chirurgischen Hochrisikopatientens, bei diesen Patienten war die Operationsdauer geringfügig kürzer (Tabelle 11). Patienten ohne diese Risikofaktoren hatten einen signifikant kürzeren stationären Aufenthalt ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 8a). Hinsichtlich der postoperativ aufgetretenen Komplikationen unterschieden sich beide Gruppen nur geringfügig (Tabelle 11).

Risiko	Geschlecht	OP Dauer	Stat. Auf.	Komplikationen	schwere Sepsis	verstorben
HR	39/20	3,98±1,64	26,74±20,92	21/59 (35,6%)	8/59 (13,6%)	4/59 (6,8%)
NR	24/18	4,25±1,31	17,76±7,77	10/42 (23,8%)	4/42 (9,5%)	2/42 (4,8%)

**Tabelle 11:** Dargestellt werden die klinischen Daten, sowie die OP Dauer und die Behandlungsdauer der Patienten mit unterschiedlichen Risikofaktoren. Geschlecht: ♂/♀., Op Dauer in Stunden, stat. Aufenthalt in Tagen.



**Abbildung 8:** Dargestellt wird die Behandlungsdauer bei Patienten mit unterschiedlichen Risikofaktoren, a) Vergleich der chirurgischen Hochrisikopatienten mit Patienten ohne Risikofaktoren (HR: n=59, NR n= 42) b) Vergleich der Behandlungstage in Abhängigkeit von korrigierter Risikostratifizierung (ORF n= 31, A/R n= 44, A+R n= 26)

### 3.2.4 Modifizierte Risikostratifizierung

Um eine weitere Differenzierung der Hochrisikopatienten zu erreichen wurde die Adipositas als ein separater Risikofaktor in das Konzept des chirurgischen Hochrisikopatientens integriert. Aufgrund der häufigen Assoziation mit einem metabolischen Syndrom muss bei diesen Patienten von einer Koinzidenz weiterer Risikofaktoren ausgegangen werden, die zusätzlich einen negativen Einfluss auf den postoperativen Verlauf und das Auftreten von Komplikationen haben können.

In dem von uns erarbeiteten Modell wurde zwischen drei Gruppen unterschieden. In der ersten Gruppe wurden Patienten ohne jegliche Risikofaktoren eingeschlossen. Weitere Gruppen unterschieden zwischen Patienten mit verschiedenen Nebenerkrankungen. In der zweiten Gruppe wurden Patienten die entweder ein metabolisches Syndrom hatten, oder die Kriterien eines chirurgischen Hochrisikopatienten erfüllten eingeschlossen. Chirurgische Hochrisikopatienten mit einem BMI > 25 wurden in der dritten Gruppe zusammengefasst. Mithilfe dieser Unterteilung konnten weitaus größere Unterschiede zwischen den einzelnen Risikogruppen abgebildet werden (Tabelle 12). Die Behandlungsdauer nahm mit jedem Risikofaktor stark zu, insbesondere chirurgische Hochrisikopatienten mit Übergewicht hatten



eine verlängerte Behandlungsdauer (Abbildung 8b, signifikante Unterschiede zwischen: 0 RF vs. A/R  $p < 0,05$  und 0 RF vs. A+R  $p < 0,01$ ). Neben der Behandlungsdauer zeigte sich auch in der Inzidenz von Komplikationen ein Zusammenhang mit vorhandenen Risikofaktoren. Insbesondere die Unterschiede zwischen Patienten ohne Risikofaktoren oder Übergewicht und denen mit beiden Risikofaktoren waren hochsignifikant ( $p < 0,01$ , 0 RF vs. A+R  $p < 0,05$ ). Das Auftreten einer schweren Sepsis wurde durch vorhandene Risikofaktoren erhöht (n.s.) (Tabelle 12).

Risiko	Geschlecht	OP Dauer	Stat. Auf.	Komplikationen	schwere Sepsis	verstorben
0 RF	20/11	3,95±1,22	15,7±6,48	6/31 (19,4%)	1/31 (3,2%)	1/31 (3,2%)
A/R	25/19	4,35±1,43	21,07±11,67	11/44 (25,0%)	6/44 (13,6%)	3/44 (6,8%)
A + R	18/8	3,88±1,17	32,42±28,13	15/36 (41,7%)	5/36 (13,9%)	2/36 (5,6%)

**Tabelle 12:** Dargestellt werden die klinischen Daten, sowie die OP Dauer und die Behandlungsdauer der Patienten mit unterschiedlichen Risikofaktoren. Geschlecht: ♂/♀., Op Dauer in Stunden, stat. Aufenthalt in Tagen.

### 3.2.5 Zusammenfassung

Es konnte ein starker Zusammenhang zwischen der Größe der Operation und der Häufigkeit von auftretenden Komplikationen gesehen werden, so waren kleinere chirurgische Operationen mit einer sehr geringen Rate postoperativer Komplikationen assoziiert. Aber auch die einzelnen Operationsgebiete zeigten Unterschiede in der Inzidenz von Komplikationen. Insbesondere Magenoperationen waren von den großen chirurgischen Eingriffen mit der höchsten Komplikationsrate assoziiert. Besonders gute Resultate wurden bei Patienten mit Thoraxeingriffen gesehen. Als Ergebnis der Analyse von einzelnen Risikofaktoren konnte gezeigt werden, dass das Alter keinen Einfluss auf das postoperative Outcome hat, wohingegen ein BMI > 30 einen „unabhängigen“ Risikofaktor darzustellen scheint. Es wird empfohlen den BMI > 30 als unabhängigen Risikofaktor einzuführen.

## 3.3 Ergebnisse der HLA- DR Expressionsanalyse von Monozyten

### 3.3.1 Vergleich von großen chirurgischen Eingriffen mit kleineren Eingriffen

Die Expression von HLA- DR Molekülen auf peripheren Monozyten wurde mittels Zweifarben- Durchflusszytometrie untersucht. Präoperativ waren keine signifikanten

Unterschiede zwischen den Patienten mit „minor“ Chirurgie und denen mit großen chirurgischen Eingriffen nachweisbar (Abbildung 9a). Es zeigte sich, dass die mittlere Fluoreszenzintensität bereits in der frühen postoperativen Phase um 60-80% vermindert war („minor“ Chirurgie: um 58%, „major“ Eingriffe: um 76,4% verringert). Zwischen der „major“ und „minor“ Gruppe war ein hoch signifikanter Unterschied bereits 24h nach erfolgter Operation erkennbar ( $p < 0,0005$ ). In beiden Gruppen war in den ersten 3 postoperativen Tagen ein Anstieg der Expression erkennbar, wobei der Abstand zwischen den Gruppen nahezu konstant blieb (24h  $p < 0,0005$ , 48h  $p < 0,0005$ , 72h  $p < 0,005$ ).

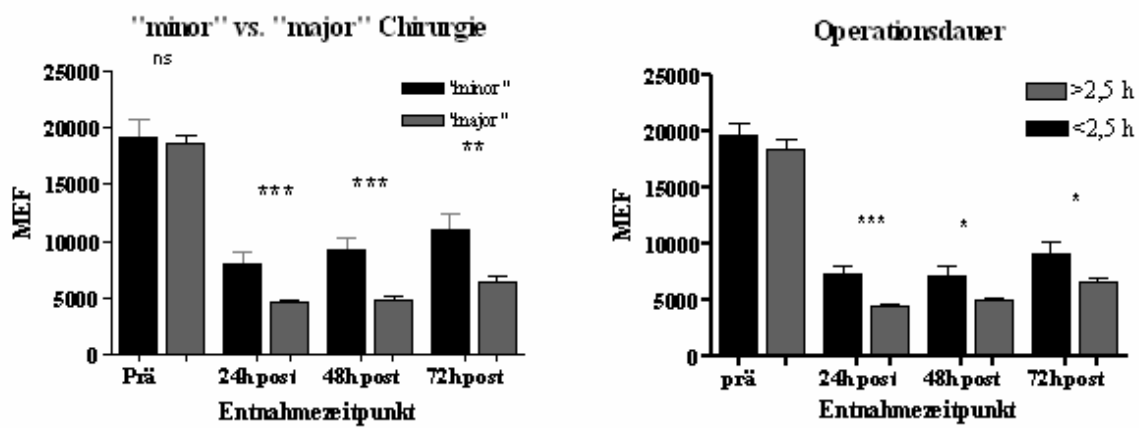


Abbildung 9: Expression von HLA- DR Molekülen auf peripheren Monocyten, dargestellt werden die mittlere Fluoreszenzintensität (9a) der Patienten mit einer Operationsdauer  $> 2,5$  Stunden ( $n=88$ ) und  $< 2,5$  Stunden ( $n=13$ ) (9b) der „minor“ ( $n=17$ ) und der „major“ ( $n=101$ ) Chirurgie präoperativ, sowie 24h, 48h und 72 h postoperativ.

### 3.3.2 Untersuchung des Einflusses von operativem Trauma

Bei dem Vergleich der reinen Operationszeiten von allen eingeschlossenen Patienten zeigten sich hochsignifikant höhere Expressionsdichte bei Patienten mit kurzen Operationen (unter 2,5 Stunden), diese Unterschiede bestanden insbesondere direkt postoperativ, (Abbildung 9b). In den Folgetagen kam es zu einer langsamen Angleichung der Expressionsniveaus.

### 3.3.3 Ergebnisse der einzelnen Operationsgebiete

Sowohl präoperativ als auch nach erfolgter Operation unterschieden sich tendenziell die HLA- DR Expressionsniveaus in den verschiedenen Operationsgruppen. Patienten mit Pankreaschirurgie zeigten präoperativ ein erhöhtes Fluoreszenzniveau, diese Unterschiede waren im Vergleich zu den anderen Gruppen nicht signifikant. Bereits 24 Stunden nach erfolgter Operation war ein starker HLA- DR Abfall zu beobachten. Das Niveau fiel auf 20-

30% des präoperativen Ausgangswertes zurück. Es kam in den Folgetagen zu einem Anstieg dieser Werte. Eine deutlich stärkere Zunahme der Expression war bei Patienten mit Thorax- und Kolonchirurgie nachweisbar. 72 Stunden postoperativ waren diese Unterschiede signifikant (Rektumchirurgie vs. Koloneingriffe:  $p < 0,05$ ; Rektumchirurgie vs. Multivisceraleingriffe:  $p < 0,05$ ; Thoraxoperationen vs. Multivisceraleingriffe:  $p < 0,05$ ) (Abbildung 10a-10d).

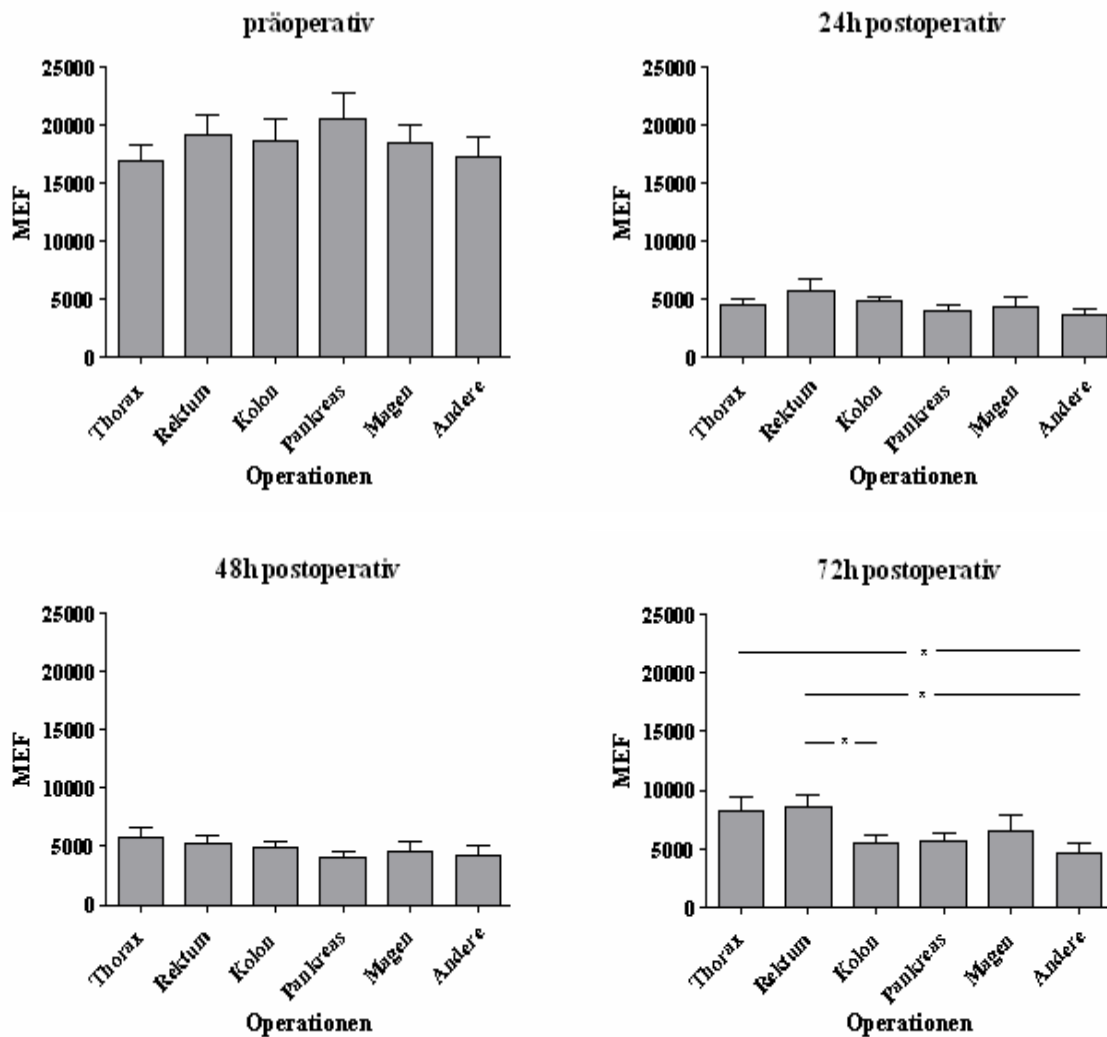


Abbildung 10: Unterschiedliche HLA- DR Expression in den verschiedenen Operationsgebieten. Thorax- (n=14), Rektum- (n=19), Kolon- (n=22), Pankreas- (n=15), Magen- (n=18) und andere Operationen (n=13), zu verschiedenen Zeitpunkten: 10a): präoperativ 10b): 24 Stunden 10c): 48 Stunden 10d): 72 Stunden postoperativ

### 3.3.4 Einfluss von postoperativen Komplikationen

Untersucht wurde, ob Komplikationen im postoperativen Verlauf in einer veränderten HLA-DR Expression gipfeln. Es wurden die Fluoreszenzintensitäten von Patienten mit schwerer Sepsis mit denen ohne Komplikationen verglichen. Präoperativ wurden hohe Expressionsniveaus ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen. 24

Stunden nach erfolgter Operation war ein Abfall der Werte in beiden Gruppen auf 25% des Ausgangswertes zu beobachten. Diese Resultate wurden auch in den anderen Gruppen der größeren visceralchirurgischen Eingriffe gesehen. Während es bei Patienten ohne Komplikationen im Verlauf zu einer Restitution der HLA- DR Expression kam (24h postop.:  $4736,16 \pm 2940,63$ ; 48h postop.:  $5322,19 \pm 2953,40$ ; 72h postop.:  $7346,42 \pm 4192,79$ ), wurde bei Patienten mit schwerer Sepsis am zweiten postoperativen Tag ein weiteres Absinken des Fluoreszenzniveaus beobachtet. 48 Stunden postoperativ wurden signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen erreicht ( $p < 0,005$ ), im weiteren Verlauf nahmen diese weiter zu (72h postop:  $p < 0,0005$ ). Schon in den ersten Tagen postoperativ befanden sich Patienten mit einer postoperativen schweren Sepsis in einer Immunparalyse (Abbildung 11c). Auch zwischen Patienten mit einem komplizierten und unkomplizierten Verlauf konnten hochsignifikante Unterschiede dargestellt werden (Abbildung 11e)

Bei dem Vergleich von Patienten ohne Komplikationen und verstorbenen Studienteilnehmern zeigte sich ein biphasischer Verlauf der Expression bei verstorbenen Patienten. Präoperativ waren beide Gruppen auf einem hohen Niveau, eine tendenzielle Verminderung der HLA- DR Expression bei im Verlauf verstorbenen Patienten war nicht signifikant. In der Gruppe der verstorbenen Patienten kam es nach einem ersten Abfall der Fluoreszenz am zweiten postoperativen Tag zu einem erneuten starken Absinken der Expression. Die Werte von Patienten ohne Komplikationen zeigten einen kontinuierlichen Anstieg im postoperativen Verlauf. Aufgrund dieser Divergenz waren signifikante Unterschiede sowohl am zweiten als auch am dritten postoperativen Tag nachweisbar. Zwischen im postoperativen Verlauf verstorbenen Patienten mit einer schweren Sepsis und überlebenden Patienten mit einer schweren Sepsis konnten keine signifikanten Unterschiede der HLA- DR Expression identifiziert werden (Abbildung 11a). Bei dem Vergleich von Patienten mit einem SIRS und ohne SIRS waren keine Unterschiede nachweisbar (Abbildung 11d).

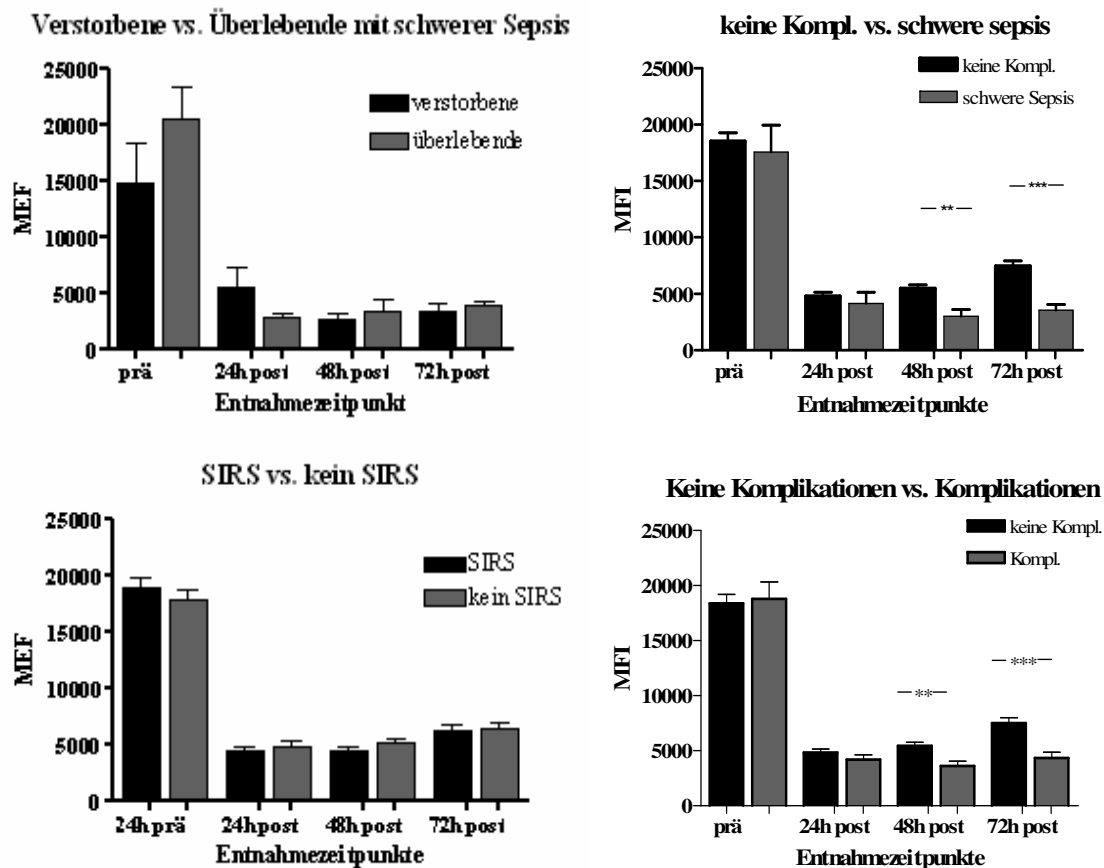
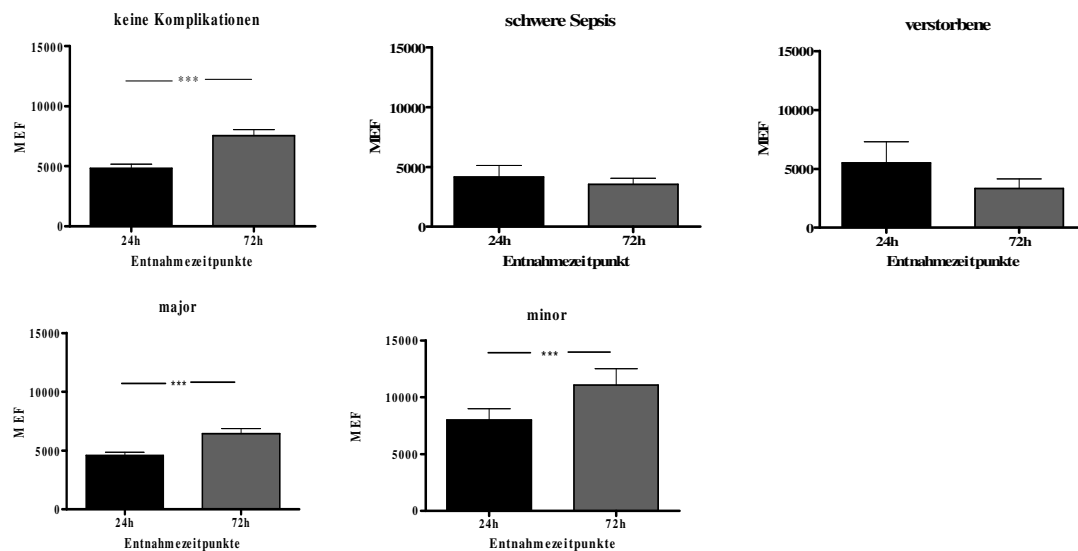


Abbildung 11: Vergleich der HLA- DR Expression zwischen 11a) Patienten mit schwerere Sepsis verstorbene (n= 6) vs. Überlebende (n=6) 11b): Dargestellt werden die mittleren Fluoreszenzintensitäten von verstorbenen Patienten (n= 6) und von Patienten ohne Komplikationen (n=70) 11c) Vergleich zwischen Patienten mit einer schwereren Sepsis (n= 12) und ohne postoperative Komplikationen (n= 70) 11d) Vergleich von Patienten mit SIRS (n=40) und ohne SIRS (n=61) 11e) Vergleich von kompliziertem (n=31) und unkompliziertem Verlauf (n=70)

Um die Dynamik dieser postoperativen Prozesse besser darzustellen wurden bei den unterschiedlichen Patientengruppen jeweils die Werte nach 24 Stunden mit denen nach 72 Stunden verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten ohne postoperative Komplikationen und alle „major“ und „minor“ Patienten einen hochsignifikanten Anstieg ihrer HLA- DR Expression in den ersten postoperativen Tagen hatten ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 12a, 12d, 12e). Im Gegensatz dazu wurden sowohl bei den im Verlauf verstorbenen Patienten als auch bei Patienten mit einer schweren Sepsis keine Unterschiede gesehen (Abbildung 12b, 12c). Dementsprechend kann gefolgert werden, dass die fehlende Erholung der HLA- DR Expression auf einen gestörten Verlauf mit potenziellem Risiko für die Entwicklung einer schweren Sepsis hinweist.



**Abbildung 12:** Darstellung der Dynamik der HLA- DR Werte postoperativ zwischen 24h und 72h . gegenübergestellt werden 12a) Patienten ohne Komplikationen 12b) Patienten mit schwerer Sepsis 12c) postoperativ verstorbene Patienten 12d) Patienten mit „major“ Chirurgie 12e) Patienten mit „minor“ Chirurgie

### 3.3.5 Alter und BMI

Die eingeschlossenen Probanden wurden in Patienten jünger als 65, 65- 80 und älter als 80 Jahre eingeteilt. Es konnten über den gesamten Beobachtungszeitraum keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Altersgruppen festgestellt werden. Der postoperative Verlauf stellte sich in den drei Gruppen mit nur geringen Differenzen dar, lediglich 72h postoperativ erscheint die HLA- DR Expression in den Gruppen <65 und 65- 79 tendenziell gegenüber den <80 jährigen Patienten erhöht zu sein.

In der vorliegenden Studie wurde die anerkannte Stratifizierung des BMI bis zu 25 (Normalgewicht), 25- 30 (Präadipositas) und mehr als 30 (Adipositas) zur Untersuchung der Auswirkungen auf den postoperativen Verlauf und die HLA- DR Expression verwendet. Auf eine weitere Unterteilung in die einzelnen Adipositas- Schweregrade wurde wegen zu geringem Patientengutes verzichtet. Es zeigte sich präoperativ eine tendenziell erhöhte Fluoreszenz in der Gruppe der Patienten mit einem BMI > 30 (nicht signifikant). Postoperativ kam es zu einer starken Depression der Expression in allen drei Gruppen. Patienten mit einem BMI unter 25 schienen im Verlauf eine schnellere Restitution der HLA- DR Expression zu haben, diese Unterschiede waren während der ersten drei Tage nicht Signifikant (Abbildung 13a).

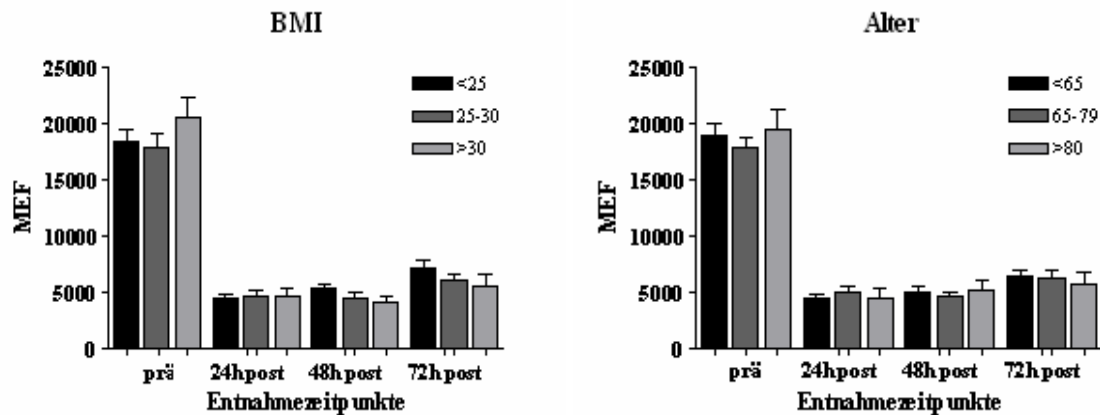


Abbildung 13: 13a) HLA- DR Expression der verschiedenen Altersgruppen (<65 n=44, 65-79 n=47, >80 n=10) zu den einzelnen Zeitpunkten 13b) Die mittlere Fluoreszenzintensität der einzelnen Patienten in BMI Gruppen (<25 n=47, 25-30 n=34, >30 n=20)

Neben dieser Stratifizierung wurde untersucht, ob auch schon eine Prädiabetes Auswirkungen auf den klinischen Verlauf und die HLA- DR Expression hat. Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss des Alters, über oder unter 65 Jahre, auf die Aktivität der Monozyten. Im Vergleich beider Populationen zeigte sich erneut ein stärkerer Einfluss des BMI auf die HLA- DR Expression als das Alter des Patienten. So wurden in der Gruppe mit einem BMI > 25 am zweiten und dritten postoperativen Tage signifikante Unterschiede erreicht (jeweils  $p < 0,05$ ) (Abbildung 14b), während nahezu identische Fluoreszenzniveaus in den unterschiedlichen Altersgruppen erreicht wurden (Abbildung 14a).

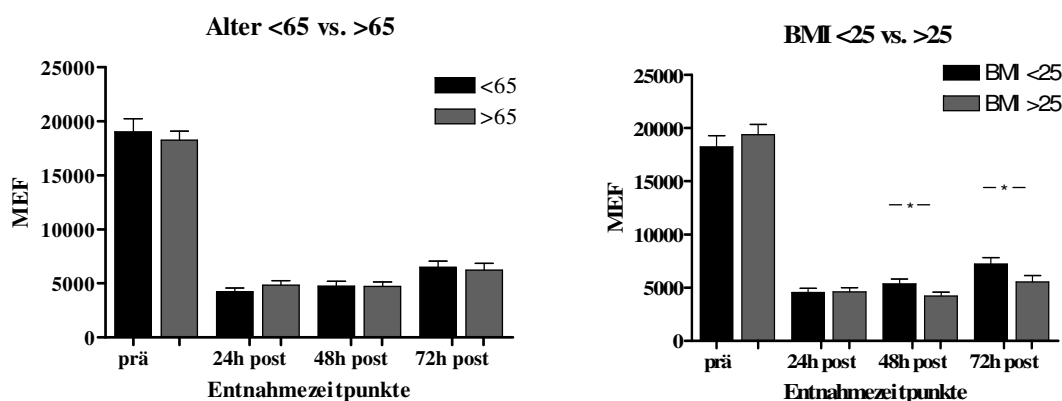


Abbildung 14: Darstellung der Unterschiedlichen Monozytenoberflächenaktivität 14a) in Abhängigkeit von Alter (<65 n= 44, >65 n=57) 14b) in Abhängigkeit vom BMI (<25 n= 47, >25 n=54)

### 3.3.6 Einteilung der Patienten nach der ASA Klassifikation

Um einen Einfluss der ASA Klassifikation auf den Immunstatus zu untersuchen wurden jeweils Patienten mit einem ASA von 1 und 2 sowie >2 in einer Gruppe zusammengefasst.

Weder prä- noch postoperativ konnte zwischen den einzelnen Gruppen Unterschiede nachgewiesen werden (Abbildung 15a).

### **3.3.7 Chirurgische Hochrisikopatienten in Abhängigkeit von Nebenerkrankungen**

Wie auch schon bei den klinischen Daten zeigten sich zwischen Patienten mit Risikofaktoren und ohne Risikofaktoren Unterschiede in der HLA- DR Expression auf Monozyten. Bereits präoperativ ist in der Gruppe der Hochrisikopatienten eine Verminderung der mittleren Fluoreszenzniveaus feststellbar (n. S.). Direkt postoperativ wurde in beiden Patienten Populationen deutlich weniger HLA- DR exprimiert, obgleich die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nahezu ausgeglichen waren. Im weiteren Verlauf kam es zu einem stärkeren Anstieg bei Patienten ohne Risikofaktoren, diese Unterschiede waren am dritten postoperativen Tag signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 15a/b).

### **3.3.8 Korrigierte Risikostratifizierung**

Unter Einbeziehung der Adipositas als unabhängigen Risikofaktor, zeigten sich insbesondere im postoperativen Verlauf ab dem zweiten Tag große Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Während präoperativ und am ersten postoperativen Tag in allen Gruppen die HLA- DR Expression der Monozyten auf einem nahezu identischem Niveau lag, waren ab dem zweiten Tag signifikante Unterschiede zwischen den Populationen nachweisbar (0 RF vs. A+R  $p < 0,05$ ) Im weiteren Verlauf waren diese Unterschiede weiter zunehmend ( $p < 0,01$ ) (Abbildung 15c).



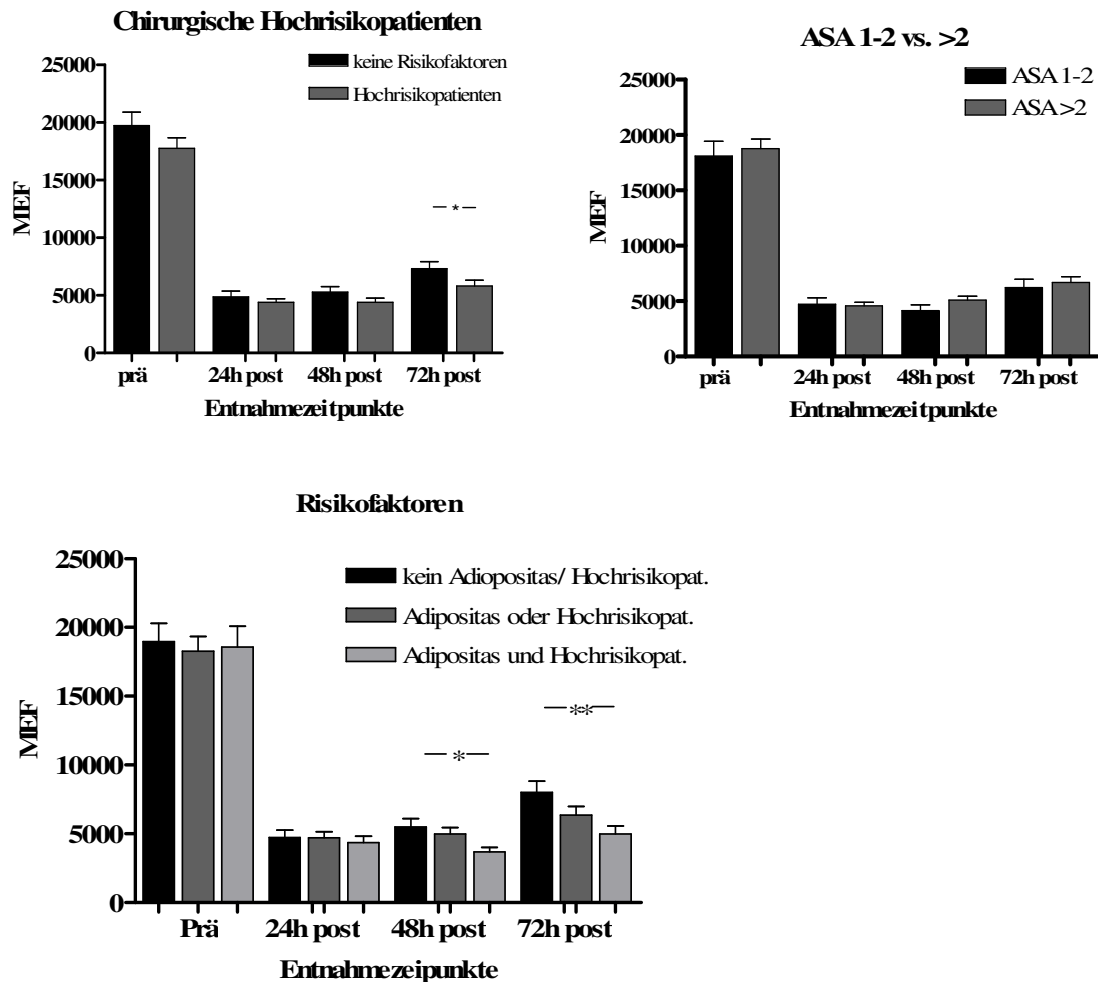


Abbildung 15: Unterschiedliche Risikostratifizierungssysteme 15a) chirurgische Hochrisikopatienten vs. Patienten mit normalem Risiko für postoperative Komplikationen (HR n= 59, NR = 42) 15b) Vergleich unterschiedlicher ASA Werte (ASA 1+2 n= 31, ASA >2 n= 70) 15c) Vergleich der korrigierten Risikostratifizierung (0 RF n= 31, A/R n= 44, A+ R n= 36)

### 3.3.9 Neoadjuvante Therapie

Bei dem Vergleich von Patienten mit präoperativ erfolgter Radiochemotherapie mit nicht vorbehandelten Patienten konnten keine Unterschiede in der HLA- DR Expression nachgewiesen werden. Ein nicht signifikanter Trend zeigte geringfügig bessere Werte 72 Stunden postoperativ in der neoadjuvant therapierten Gruppe (Abbildung 16a).

### 3.3.10 Dignität des Grundleidens

Es konnte kein Einfluss der Grunderkrankung (maligne vs. benigne) festgestellt werden. Die HLA- DR Expressionsniveaus stellten sich sowohl prä-, als auch postoperativ in beiden Gruppen identisch dar (Abbildung 16b).

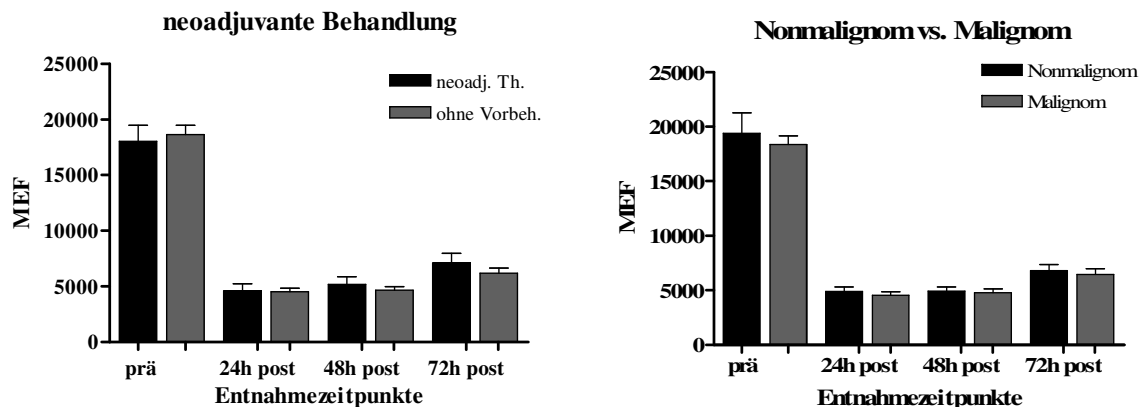


Abbildung 16: 16a) Einfluss der neoadjuvanten Radio-Chemotherapie auf die HLA- DR Expression auf Monozyten (neoadj. Th. n= 13, ohne Vorbeh. n= 88) 16b) Verglichen wurden die HLA- DR Expressionswerte prä und postoperativ von Patienten mit Karzinomen und ohne maligne Grunderkrankung (Nonmalignom n= 20, Malignom n= 81)

### 3.3.11 Zusammenfassung

Ein präoperativer Unterschied der HLA- DR Expression, im Sinne einer Disposition konnte in keiner Patientengruppe nachgewiesen werden. In allen Gruppen wurde postoperativ ein starker Abfall der Oberflächenaktivität beobachten. In den Folgetagen kam es zu einer langsamen Erholung dieses teilweise immunsuppressiven Niveaus. Insbesondere Patienten mit schwerer Sepsis zeigen nach dem anfänglichen Abfall der Werte in den folgenden postoperativen Tagen eine Stagnation der Expression. Hierbei war im Gegensatz zu Patienten ohne Komplikationen kein Anstieg der Expressionswerte zwischen dem ersten und dritten postoperativen Tag feststellbar. Ein Zusammenhang mit dem Auftreten von Komplikationen, meist am 6. Tag postoperativ, kann angenommen werden. Bei dem Vergleich von BMI und Alter zeigte sich ein Trend zu geringer Suppression bei älteren Patienten im Vergleich zu Patienten mit erhöhtem BMI. Die unterschiedlichen Risikostratifizierungen und die damit verbundene Erkrankungsschwere des Patienten scheinen auch einen Einfluss auf die HLA- DR Expression zu haben. In diesem Zusammenhang sind besonders die Unterschiede bei Patienten, die mit der modifizierten Risikostratifizierung beurteilt wurden, hochsignifikant. Neoadjuvante Therapieschemata verschlechtern, soweit am untersuchten Klientel beurteilbar,

weder die prä-, noch die postoperative Expression von HLA- DR Molekülen auf der Oberfläche von Monozyten. Ebenfalls konnten keine signifikanten Unterschiede bei Patienten mit oder ohne maligne Erkrankungen nachgewiesen werden.

### **3.4. Genexpressionsanalyse der T- Lymphozyten mittels cDNA Microarrays**

Die Funktion von T- Lymphozyten wird durch operative Eingriffe beeinflusst. Zur Identifikation der Vorgänge in der frühen postoperativen Phase nach chirurgischen Eingriffen bei Patienten mit und ohne septische Komplikationen wurde eine Analyse der T- Zell Funktion mittels cDNA Microarray Technologie durchgeführt.

Dafür wurde die RNA von T- Lymphozyten der Patienten präoperativ mit Cy3 angefärbt und in der Gegenfärbung, postoperativ, mit Cy5 gekoppelt. Zum einen wurden Patienten mit unkomplizierten Verläufen verglichen, in einer zweiten Gruppe wurde das Blut von Patienten mit schwerer Sepsis untersucht. Als reguliert wurden Gene mit  $>2.5$  und  $<0.4$ - facher Expression definiert. In der Gruppe der Patienten ohne postoperative Komplikationen wurden 142 hochregulierte und 282 down regulierte Gene identifiziert (Abbildung 17a), im Unterschied dazu zeigte sich bei Patienten mit septischen Komplikationen ein deutlich höherer Anteil an down regulierten Genen (1835, die 123 hochregulierte Gene waren mit denen der Vergleichsgruppe nahezu identisch, Abbildung 17b)

**Abbildung 17: Darstellung der Genexpression präoperativ im Vergleich zu postoperativen Ergebnissen  
17a) Hochregulierte Gene 17b) Herunterregulierte Gene.**

Die Klustergen Analyse, Ingenuity Pathway analysis 3.1, konnte keine signifikanten Konzentrationsunterschiede in einzelnen biochemischen Prozessen nachweisen. In der Aufschlüsselung der Funktion der identifizierten Gene zeigte sich ein großer Anteil von Transport- und Protein- Genprodukten (Abbildung 18).

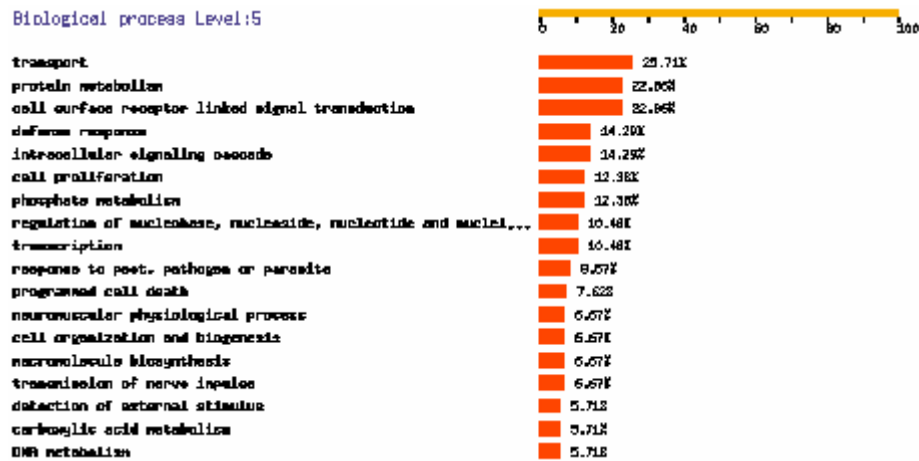


Abbildung 18: Unterschiedlicher Anteil der Expressionsprodukte an der gesamt Expression

### 3.4.1 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Genexpressionanalyse deuten eine ausgedehnte generelle Herabregulation der transkriptionalen Aktivität der T- Zellen nach chirurgischen Interventionen an. Dieser Trend einer generalisierten Paralyse der T- Lymphozyten war wesentlich stärker bei Patienten mit schweren septischen Komplikationen ausgeprägt.

## 4 Diskussion

Die vorliegende Dissertation untersucht den Einfluss von chirurgischen Eingriffen und prädisponierenden Faktoren auf das Immunsystem und das klinische Outcome. Um die Ausprägung einer Immunsuppression als Reaktion auf eine chirurgische Operation abzuschätzen, wurden Indikatoren einer Monozyten und T- Lymphozyten Dysfunktion in einer Kohorte von 101 Patienten mit „major“ und 17 mit „minor“ Chirurgie untersucht.

### 4.1 Epidemiologie

Von den Patienten mit großen visceralchirurgischen Eingriffen hatten 31 postoperative Komplikationen, in der „minor“ Chirurgie Gruppe trat eine Wundheilungsstörung auf. Die 31 postoperativen Komplikationen der „major“ Gruppe resultierten aus Wundheilungsstörungen, Anastomoseninsuffizienzen, postoperativer Pankreatitis, postoperativen respiratorischen Komplikationen und anderen Komplikationen. Während der ersten 28 Tage postoperativ verstarben 4 Patienten (4/101, 3,96%) der großen visceralchirurgischen Eingriffe. Es erkrankten 12 Patienten der „major Chirurgie“ Gruppe an einer schwerer Sepsis (12/101, 11,88%).

Die in anderen Studien gefundenen geringeren Raten und die geringere Schwere postoperativer Komplikationen bei Patienten mit kleinen chirurgischen Eingriffen konnten erwartungsgemäß durch unsere Ergebnisse bestätigt werden. Weiterhin zeigten die unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Operationsgruppen eine deutliche Häufung von Komplikationen bei Patienten mit Operationen am Gastrointestinaltrakt und hierbei besonders bei Magenoperationen. Unserer Ergebnisse werden durch die unterschiedlichen Mortalitätsraten z. B. der Thorax-, der Rektum-, und der Magen Chirurgie unterstützt. Während Patienten nach rektum- und thoraxchirurgischen Eingriffen [91, 92] eine Mortalitätsrate von 2,5% aufwiesen lag diese bei magenchirurgischen Eingriffen bei 8,5% [93].

Vor 1992 gab es keine einheitliche Regelung zur Bewertung des klinischen Zustandes von septischen Patienten [6]. Erst mit den Beschlüssen der ACCP/SCCM Konsensus Konferenz wurden einheitliche Definitionen für die Krankheitsbilder: SIRS, Sepsis, schwere Sepsis, Multiorganversagen geschaffen [7]. Seither wurden bis heute in mehreren 100 Studien zur

Sepsis Klassifikation die so genannten „Bone“ Kriterien angewandt [6]. Dabei schwankten die Mortalitätsraten (innerhalb von 28 Tage für die schwere Sepsis) zwischen den einzelnen Studien stark, zwischen 20 und 65% [27-29, 31, 94-98]. In der von uns untersuchten Kohorte betrug die Mortalitätsrate der schweren Sepsis 50%. Erfreulicherweise nahm die Gesamtmortalität der Erkrankung in den letzten Jahren leicht ab [99-101].

In den letzten zwei Jahrzehnten kam es zu einem Anstieg der Inzidenz der schweren Sepsis [102]. Zum großen Teil wurde in Untersuchungen zum Krankheitsbild der schweren Sepsis Bezug auf Patientenpopulationen einer Intensivstation genommen [94, 95, 103], dies war mit einer höheren Inzidenz der Erkrankung verbunden [104]. Für die nächsten Jahre wird ein weiterer Anstieg der Inzidenz prognostiziert [27, 29, 32, 105]. Die Inzidenz der schweren Sepsis betrug in unserem Patientenkollektiv 11,9 %.

Neben der schweren Sepsis wurde der Begriff des SIRS geprägt [7]. In einer Multicenter Studie zu dieser Thematik wurde eine Prävalenz von 87% auf Intensivstationen ermittelt [8]. Bei den von uns untersuchten Patienten erfüllte jeder der Intensivpatienten zumindest zeitweise die Kriterien eines SIRS. Bezogen auf alle Patienten der „major“ Chirurgie Gruppe betrug die Inzidenz eines SIRS 62%. Von diesen Patienten erkrankten 19% an einer schweren Sepsis. Ähnliche Ergebnisse ermittelte Rangel Frausto et al., mit einer Inzidenz des SIRS von 68% bei den eingeschlossenen Patienten. Von diesen Patienten erkrankten 26% während ihres stationären Aufenthaltes an einer Sepsis [9].

Bei den von uns untersuchten Patienten zeigte sich zwischen Patienten mit einem manifesten SIRS und keinen positiven „Bone“ Kriterien keine signifikant unterschiedliche Rate postoperativer Komplikationen. Patienten mit einem SIRS hatten keine schlechtere HLA- DR Expression auf Monozyten als Patienten ohne SIRS. Ein zwingender Zusammenhang zwischen einer systemischen Inflammation (definiert durch die SIRS Kriterien) und der Oberflächenaktivität der Monozyten war in unserem Patientenkollektiv nicht nachweisbar.

Von verschiedenen Autoren wurde in Frage gestellt, ob das SIRS eine hohe Sensitivität für die Sepsis besitzt [106-109]. Kritikpunkte dabei waren eine ungenügende Charakterisierung der Pathophysiologie der Erkrankung und keine Anhaltspunkte zu den stattfindenden Immunreaktionen. In der 2001 stattfindenden Konsensuskonferenz wurden die bestehenden

Definitionen bestätigt, zur Erweiterung der Stadieneinteilung wurden neue Biomarker gefordert [40].

#### **4.2 HLA- DR Expression auf Monozyten**

Eine zentrale Rolle in den unterschiedlichen Phasen der Sepsis spielen die Monozyten. Durch ihre phagozytierenden Eigenschaften und die Präsentation von Antigenen sind sie ein essentieller Bestandteil des unspezifischen Immunsystems und dienen der Aktivierung des spezifischen Immunsystems [33, 110].

Ihre Aktivität kann mithilfe der Zahl der auf ihrer Oberfläche exprimierten MHC II Moleküle charakterisiert werden. Monozyten mit verminderten HLA- DR Expression sind in ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen stark eingeschränkt [111] und in ihrer Fähigkeit zur Produktion von inflammatorischen Mediatoren als Reaktion auf Pathogene supprimiert [112].

Die HLA- DR Expressionsanalyse entwickelte sich in den vergangenen Jahren zu einem guten Marker für die Immunkompetenz von Patienten. Bereits 1990 konnte von Hershman et al. ein direkter Zusammenhang zwischen der Oberflächenaktivität der Monozyten und der Häufigkeit von infektiösen Komplikationen bei Trauma- Patienten gezeigt werden [45] .

Volk et al. definierte die Werte für eine Immunparalyse bei einer HLA- DR Aktivität unter 30% [113]. Es wurden 150 Patienten mit einer HLA- DR Aktivität unter 30% mit 270 Patienten ohne Immunparalyse verglichen. Patienten mit einer länger als 5 Tage andauernden Reduktion der HLA- DR Expression auf unter 30% hatten eine erhöhte Mortalitätsrate. Die Überlebensrate bei Patienten mit bestehender Immunparalyse betrug 19%, im Vergleich zu 81% bei Immunsuffizienten Patienten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Cut off Punkt für eine Immunsuppression bei einer HLA- DR Aktivität unter 30% festgelegt. Dabei wurde zur Analyse der Monozyten - Oberflächenmarker der von Hershman und Volk etablierte Test- Kit der Firma BDBioscience [45, 113] verwendet.

Bei der Bestimmung des Aktivitätsniveaus der Monozyten bestand zunächst das Problem der fehlenden Standardisierung der HLA- DR Expressionsanalyse. Bis 2005 wurde keine standardisierte, für Multicenterstudien verwendbare Methode in der Literatur beschrieben. Die Laboratorien unterschieden sich in den Methoden für die präanalytische Behandlung der

Proben, die zur Analyse genutzten Antikörper, für das Monozyten Gating und die Durchflusszytometer.

So wurde zunächst die Aktivität in % positive Monozyten angegeben. Bei dieser Methode wurde nur der Teil der Monozyten gezählt, dessen Fluoreszenz höher als die der Negativkontrolle war. Diese Form der Auswertung brachte den Nachteil der untersucherabhängigen Einstellung der Negativkontrolle mit sich. Trotz der fehlenden Standardisierung und damit einer nur sehr eingeschränkten Vergleichbarkeit der Messergebnisse wurde diese Methode von vielen Autoren [44, 46, 49, 51, 53, 110, 113-123] zur Bestimmung der Immunaktivität der Monozyten genutzt.

Eine weitere Möglichkeit zur Aktivitätsbestimmung der Monozyten stellt die Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) dar, mit der die Anzahl der exprimierten HLA- DR Moleküle auf jedem einzelnen Monozyt ermittelt wird. Die erstmals von Volk durchgeführte quantitative flowzytometrische Methode, bei der die Kalibrierung des Messgerätes mit Phytoerythrin beladenen Latexpartikeln erfolgt, erlaubte eine sehr viel detailreichere Erfassung der Verläufe. Volk und Mitarbeiter definierten den Bereich der Immunparalyse mit dieser quantitativen Methode [113]: >10000 ABS/ Zelle= Immunkompetent, 5000-10000 ABS/ Zelle= Graubereich, <5000 ABS/ Zelle= Immunparalyse.

In unserer Studie wurde die Oberflächenaktivität mithilfe von Molecules of Equivalent (MEF) ermittelt. In den vergangenen Jahren wurden zunehmend Studien mithilfe dieser Methoden durchgeführt [47, 52, 89, 124-130]. Der Vergleich der von uns verwendeten Methode mit dem von Döcke genutzten Analyse Test- Kit von BDBiosciences liefert vergleichbare Ergebnisse. Der verwendete anti- HLA- DR- Ak- Klon identisch (L243), andererseits wurde dieser bei BD mit PE- konjugiert (rot-orange Fluoreszenz) bei unserer Methode hingegen mit FITC- markiert (grüne Fluoreszenz). Hintergrund dieses Ansatzes mit FITC- markierten Antikörpern war, dass physikalisch keine Beeinflussung des Messsignals durch die Gegenfärbung der Monozyten mit CD14 in einer anderen Fluoreszenzfarbe (Fl 3- Kanal) auftritt. Bei Verwendung von PE war eine physikalische Spektralüberlappung beherrschbar, bei unexakter Geräteeinstellung allerdings eine systematischen Messwertbeeinflussung möglich. Die von BD patentierte (chemische) Konjugationsmethode garantiert für PE- konjugierte Antikörpermoleküle eine 1:1 Kopplung, d.h. jedes Antikörpermolekül ist mit genau einem Fluoreszenzmolekül gekoppelt. Bei der FITC Konjugation können in



Abhängigkeit von der Zahl der Kopplungsstellen und der eingesetzten FITC- Konzentration mehrere Moleküle je Antikörpermolekül koppeln. Bei gut standardisierten Herstellungsbedingungen ist für ein und denselben monoklonalen Antikörper die Zahl der FITC Kopplungsstellen gleich. Es wird so zwar in der Regel nicht genau ein Fluoreszenzmolekül an einen konkreten Antikörper gebunden, aber es wird immer das gleiche durchschnittliche molare Verhältnis zwischen Protein und gebundenem FITC erreicht.

Der von uns angegebene absolute DR- Wert repräsentiert die durchschnittliche (im Median der Monozyten) Zahl gebundener FITC- Moleküle, die vom Test- Kit herausgegebenen Werte repräsentieren aufgrund der 1:1 Kopplung die Zahl der gebundenen anti- HLA- Ak- Moleküle. Somit sind die Werte von BD und die unserer Studie nicht gleich, aber direkt proportional und damit hinsichtlich des Abfalls/ Anstiegs vergleichbar. Bei einem prä-operativen Ausgangswert von 15.000 sind bei einem Abfall der Fluoreszenzintensität auf 5.000 zwei Drittel der HLA- DR- Moleküle auf den Einzelmonozyten verloren gegangen.

In unserem Patientenkollektiv kam es bei allen Patienten, einschließlich der „minor“ Patienten, postoperativ zu einer generalisierten Funktionsstörung der Monozyten. Es zeigten sich starke Unterschiede bei dem Vergleich der Patienten mit „major“ und „minor“ Chirurgie. So wurden signifikant geringere HLA– DR Expressionswerte bei Patienten mit großen chirurgischen Eingriffen nachgewiesen. In beiden Gruppen war der Einfluss der Anästhesie auf den Patienten vergleichbar. Die Eingriffe unterschieden sich anhand des Gewebstraumas, des Blutverlustes und der Operationsdauer. Patienten bei denen kleinere chirurgische Eingriffe durchgeführt wurden zeigten bereits 24 Stunden postoperativ eine höhere ( $p < 0,0005$ ) Oberflächenaktivität der Monozyten und damit eine geringere Immunsuppression. Diese Unterschiede zwischen den Gruppen blieben während der ersten drei postoperativen Tage konstant. Es zeigte sich ein Trauma Dosis Effekt der postoperativen Immunsuppression. Bei Patienten mit einer Operationsdauer von mehr als 2,5 Stunden wurde eine signifikant verstärkte HLA– DR Suppression nachgewiesen. Dieser Effekt mit verringerter Immunkompetenz durch eine größere Operationsbelastung wurde bereits bei dem Vergleich von laparoskopischen und konventionellen Operationen beschrieben. Die Gruppe um Ordemann et al. konnte zeigen, dass im Vergleich zu laparoskopischen Eingriffen nach konventioneller Chirurgie eine signifikant geringere HLA– DR Expression auf Monozyten und eine erhöhte Plasmakonzentrationen von IL– 6 und TNF-  $\alpha$  nachweisbar ist. Es wurde somit eine stärkere Immunsuppression nach konventioneller Chirurgie postuliert [130].

Heidecke et al. zeigten, dass ein Operationsreiz zu einer Suppression der HLA– DR Expression führen kann. [131]. In dieser Studie wurden chirurgische Patienten untersucht, von denen die frühe (Tag 1 oder 2) und die spätere (Tag 3 bis 5) postoperative Phase analysiert wurde. Es kam dabei in der frühen postoperativen Phase zu einem starken Abfall der HLA-DR Expression, der immunsuppressive Zustand blieb auch in der späten postoperativen Phase bestehen. In der von uns untersuchten frühen postoperativen Phase konnten unterschiedliche Verläufe der Expressionsniveaus zwischen Patienten mit und ohne Komplikationen nachgewiesen werden. Der entscheidende Unterschied zwischen komplizierten und unkomplizierten Verläufen weniger der direkt postoperativ ermittelte HLA– DR Wert sondern vielmehr die Dynamik der Oberflächenaktivität der Monozyten in den ersten postoperativen Tagen. So konnte bei Patienten ohne Komplikationen ein signifikanter Anstieg der Oberflächenaktivität zwischen dem ersten und dem dritten postoperativen Tag identifiziert werden, in dem gleichen Zeitraum stagnierte die HLA- DR Expression bei postoperativ verstorbenen oder Patienten mit schwerer Sepsis. Eine kürzere und weniger intensive Periode der Monozyten Deaktivierung charakterisierte Patienten mit einem komplikationslosen Verlauf.

Die HLA- DR Expression auf Monozyten unterschied sich zwischen überlebenden Patienten und an einer schweren Sepsis verstorbenen Patienten in unserem Patientenkollektiv nur gering. Hierbei war eine geringere Oberflächenaktivität bei verstorbenen Patienten nachweisbar. Die Ergebnisse von Cheadle et al. [44] und Muller- Kobold et al. [132] zeigten ebenfalls keine signifikant unterschiedliche Monozyten Aktivität zwischen überlebenden und verstorbenen Patienten mit schwerer Sepsis.

#### **4.3 Einteilung der schweren Sepsis in Typ A und B**

Wie unsere Ergebnisse zeigen befinden sich Patienten nach einem chirurgischen Eingriff in einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Immunsuppression. Die bestehende Abwehrschwäche tritt insbesondere dann zu Tage, wenn es postoperativ zu einer infektiösen Komplikation kommt. So beobachtet man bei einer Anastomoseninsuffizienz eine wesentlich höhere Mortalität als bei einer perforierten Sigmadivertikulitis [133, 134]. Aus diesem Grund wurde von unserer Arbeitsgruppe eine Einteilung der schweren Sepsis gemäß der Immunsituation zum Zeitpunkt ihrer Entstehung vorgeschlagen. Diese Einteilung verbindet

die postoperativ vorhandene Immunsuppression chirurgischer Patienten mit dem dadurch gesteigerten Risiko einer schweren Sepsis [135]. So wird von einer Typ A Sepsis bei Patienten ohne vorhergehende Immunsuppression durch operativen Eingriff gesprochen (spontan akquiriert), dies ist mit einem günstigeren Outcome der Patienten verbunden. Bei postoperativ bestehender Immunsuppression kommt es beim Auftreten einer Infektion zur Ausbildung einer Typ B Sepsis (postoperativ erworben). Im Rahmen der Sepsis Typ B ist der Verlauf aufgrund der eingeschränkten Abwehrlage wesentlich schwerer und führt häufiger zu einem letalen Ausgang [135]. Das Immunsystem ist in diesen Fällen aufgrund der vorhergehenden Operation wesentlich eingeschränkt. Insbesondere im Zusammenhang mit dem weitaus schlechteren Outcome bei Patienten mit einer Typ B Sepsis ist eine frühzeitige Bestimmung des Immunstatus postoperativ als diagnostische Maßnahme sinnvoll. Durch ein rechtzeitiges Erkennen einer Typ B Sepsis kann zügig reagiert werden und zum Beispiel eine antibiotische Therapie initialisiert oder eskaliert werden.

#### **4.4 Genexpressionsanalyse der T- Lymphozyten**

Neben einer Alteration des angeborenen Immunsystems mit dem Eintreten der Monozyten in ein Stadium der „Anergie“ mit verminderter Fähigkeit zur Reaktion auf LPS und zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen [136] kommt es nach chirurgischen Interventionen auch zu einer Supprimierung der adaptiven Abwehr. Die Effekte einer Sepsis auf das adaptive Immunsystem sind durch eine hohe Apoptoserate der B- und T-Lymphozyten sowie eine reduzierte Proliferationsfähigkeit als Reaktion auf die Bindung an den T- Zell Rezeptor CD28 gekennzeichnet [136]. Diese gipfeln womöglich in einer mangelhaften Abwehr von sekundären Infektionen.

Die Genexpressionsanalyse mithilfe von Microarrays ist bislang aufwändig, so dass eine Untersuchung aller Patienten zurzeit nicht möglich ist. Dies führt zu einer starken Selektion der untersuchten Patientenpopulationen infolge dessen die gewonnen Daten oft heterogen sind [137]. Deshalb müssen die Untersuchungen von Patientenproben mit einer bewussten Selektion der Patienten erfolgen. Wenn Microarray Analysen mit Proben einzelner Patienten durchgeführt werden sind die Signale spezifisch für das untersuchte Individuum. Auf der anderen Seite besteht bei gepoolten Proben die Gefahr, dass regulierte Gene nicht identifiziert werden. Um die Gemeinsamkeiten zwischen unterschiedlichen Objekten darzustellen wurden in unserer Studie jeweils Proben von zwei Patienten gepoolt.

Bei dem Vergleich der prä- und postoperativen Proben wurden bei Patienten mit Komplikationen und bei unauffälligem Verlauf 589 regulierte Gene identifiziert. Von diesen waren 554 herunterreguliert und 35 heraufreguliert. In beiden Patientengruppen konnte eine große Anzahl herunterregulierter und weniger hochregulierter Gene nachgewiesen werden. Diese Veränderungen waren bei Patienten mit septischen Komplikationen stärker ausgeprägt. Dennoch zeigte die Hochregulation einiger Gene, dass T- Lymphozyten im postoperativen Verlauf nicht komplett anerg sind. Zur näheren Analyse der herabregulierten Gene wurden diese in funktionelle Gruppen unterteilt. Hierfür wurde die Ingenuity Pathways Analysis Software (IPAS) verwendet. Es wurde jedes Gen zu seinem korrespondierenden Gen in der Ingenuity Pathways Datenbank zugeordnet. Wir fanden verschiedene Gene mit unterschiedlicher Expression, diese Leitungsstrukturen waren nicht einzelnen Funktionen oder Molekülen zugeordnet. Durch die Ingenuity Pathways Analysis Software konnte gezeigt werden, dass mehrere mit wichtigen T- Zell Funktionen assoziierte Gene bei allen Patienten postoperativ alteriert wurden. Einen anderen Weg ging die Arbeitsgruppe Prucha et al. In dem analysierten Patientenkollektiv konnten von 340 inflammatorischen Genen 50 unterschiedliche, bei Patienten mit einer schweren Sepsis überexprimierte Gene identifiziert [138] werden. Weiterhin konnte in unserer Arbeitsgruppe auch eine erhöhte Apoptoserate der T- Lymphozyten nach chirurgischen Eingriffen nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten).

#### **4.5 Patientenabhängige Risikofaktoren**

Neben der Bestimmung der HLA- DR Expression auf Monozyten und anderen Immunmarkern können weitere Patienten- spezifische Faktoren, wie zum Beispiel verschiedene Risikoscoresysteme, das Alter oder der BMI zur präoperativen Risikoanalyse angewendet werden. Diese Patienten bezogenen Faktoren wurden an unserem Patientenkollektiv angewandt und auf ihre Repräsentativität überprüft.

Das bei chirurgischen Patienten am häufigsten angewendeten Systeme zur Risikobewertung ist die Klassifikation der „American Society of Anesthesiologists“ (ASA) [54-56, 139, 140]. Bei dieser werden Patienten präoperativ nach dem zu erwartenden Outcome in 5 unterschiedliche Gruppen eingeordnet. Dieses System wird routinemäßig bei fast allen chirurgischen Patienten angewandt. Es wurde eine gute Vorhersagekraft dieses Scores bei unterschiedlichen operativen Eingriffen nachgewiesen. Die Gruppe Arenal et al. konnte

zeigen, dass die ASA Klassifikation bei abdominellen- und kolonchirurgischen Notfalleingriffen mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist [141]. Es konnte ebenfalls ein Zusammenhang des ASA Scores mit dem Auftreten von postoperativen Wundinfektionen [142] und mit dem Outcome von Trauma- Patienten [143] hergestellt werden.

Ein Problem der ASA Klassifikation ist die Subjektivität der Beurteilung, die sich in einem zum Teil nur geringen Maß der Übereinstimmung (30- 80%) äußert, wenn verschiedene Anästhesisten zur Klassifizierung des gleichen Patienten aufgefordert werden [144]. In anderen Studien konnte eine weitaus größere Übereinstimmung der Fallbewertung nachgewiesen werden [144]. So wurden von Aronson et al. 70 Anästhesisten befragt, hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Bewertung der vorgegebenen 10 Beispielpatienten nachgewiesen werden [143]. Trotz der gezeigten guten Vorhersagekraft des Scores wurden bei zum Teil bestehenden Inkonsistenzen bei der Analyse von Beispielpatienten Erweiterungen der ASA Klassifizierung gefordert [145].

Bei den von uns untersuchten Patienten konnten mithilfe dieses Systems keine Vorhersagen über gehäuft auftretende Komplikationen oder eine stärkere Immunsuppression vorgenommen werden. Eine mögliche Ursache für diese Resultate besteht neben der oben genannten Subjektivität dieses Systems in der geringen Anzahl eingeschlossener Patienten mit einem ASA Score >2 in unserem Patientenkollektiv.

Eine mögliche Alternative zu der ASA Klassifikation ist die Unterteilung in Patienten mit erhöhtem Risiko und mit normalem Risikoprofil. Mit den in unserer Studie genutzten, nach Shoemaker et al. modifizierten Scoresystem konnte eine wesentlich bessere Übereinstimmung der Immunsuppression und dem Risikoprofil der Patienten festgestellt werden.

Andererseits konnte durch Bowles et al. gezeigt werden, dass auch die Analyse von Komorbiditäten eine gute Korrelation mit der postoperativen Mortalität und Morbidität zulässt. In dieser Studie wurden Patienten mit elektiven kolorektalen Eingriffen untersucht. Neben der ASA Klassifikation wurden die Komorbiditäten analysiert. Hierbei zeigte sich, dass neben einem ASA >2 mindestens 2 Komorbiditäten die Mortalität und Morbidität erhöhten [146].

Ein in Zukunft weiter zunehmendes Problem stellt der starke Anstieg von übergewichtigen Patienten dar. So wird die Prävalenz von übergewichtigen Patienten in allen Industriestaaten in den folgenden Jahren stark zunehmen. Der Anteil adipöser Amerikaner an der Normalbevölkerung wird dann von 20% auf über 40% im Jahr 2025 steigen [61].

Einen einfachen und leicht zu ermittelnden Anhaltspunkt für den Ernährungszustand liefert der BMI. Dieser wurde vom belgischen Mathematiker Adolphe Quételet im 19. Jahrhundert entwickelt. Populär wurde er durch den Einsatz bei US-amerikanischen Lebensversicherern, um über eine einfache Einstufung die Prämien für Lebensversicherungen berechnen zu können. Der BMI wird durch den Quotienten aus Masse (kg) durch Größe<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>) definiert. Werte von normalgewichtigen Personen liegen gemäß der Adipositas- Klassifikation der WHO zwischen 18,50 kg/m<sup>2</sup> und 24,99 kg/m<sup>2</sup> [147-149]. Starkes Über- oder starkes Untergewicht kann zu einer Erhöhung der Mortalität führen, auch wenn weitere Risikofaktoren wie zum Beispiel das Rauchen ausgeschlossen werden [150].

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem erhöhten BMI ein höheres Risiko für postoperative Komplikationen haben. Insbesondere zeigte sich eine signifikant erhöhte Rate der schwereren Sepsis bei Patienten mit einem BMI >30. Die Inzidenz aller postoperativen Komplikationen war bei adipösen Patienten stark erhöht. Patienten mit einer postoperativen schweren Sepsis waren signifikant schwerer.

Calle et al. untersuchte den Einfluss von Übergewicht auf die Mortalität in den USA [151]. Es wurden insgesamt 1,184,657 Patienten prospektiv untersucht. Das Sterblichkeitsrisiko stieg unabhängig von kardiovaskulären Erkrankungen, Malignomen oder anderen Erkrankungen bei stark übergewichtigen Patienten an. Dieser Zusammenhang wurde in allen Altersgruppen beobachtet. Eine Erhöhung des Sterblichkeitsrisikos wurde insbesondere bei weißen Patienten gesehen. Bei schwarzen Patienten waren die Effekte deutlich geringer ausgeprägt. Neben einer erhöhten Mortalität konnte bei adipösen Patienten ebenfalls eine erhöhte Morbidität festgestellt werden. Die Gruppe Adams et al. stellte die häufigsten und wichtigsten Morbiditätsfaktoren für übergewichtige Patienten zusammen [151] das waren zum Beispiel: kardiovaskuläre Erkrankungen, wie Hypertonie oder KHK, Krankheiten die die metabolischen und hormonalen Funktionen beeinträchtigen, wie Diabetes mellitus aber auch Erkrankungen die die Gerinnung, das respiratorische System und die Sexualfunktion beeinträchtigen.

Bei der Analyse von Patienten mit nicht kardiochirurgischen Eingriffen konnte sowohl im Bezug auf die gesamt Mortalität als auch auf die Intensivstationsmortalität eine signifikante Erhöhung bei adipösen Patienten nachgewiesen werden [152]. Übergewichtige Patienten hatten eine signifikant höhere Rate postoperativer Wundinfektionen, sowie eine deutlich höhere Inzidenz eines postoperativen Myokardinfaktes [152]. Übergewichtigkeit wurde als unabhängiger Risikofaktor für die perioperative Morbidität und Mortalität identifiziert [153].

Tremblay et al. untersuchten retrospektiv 61346 Patienten einer Intensivstation von denen 41011 eingeschlossen wurden [154]. Es wurde ein protektiver Effekt der Adipositas beschrieben. Neben einer hohen Anzahl ausgeschlossener Patienten wegen unvollständigen Datensätzen war das Patientenkollektiv heterogen. Überwiegend internistische Patienten wurden eingeschlossen, nur 40% der untersuchten Patienten waren nach elektiven- und notfallchirurgischen Eingriffen auf der Intensivstation. Daten zu den Nebenerkrankungen der Patienten wurden nicht erfasst, ein möglicher Zusammenhang von Tumorstadium oder einer Kachexie bei chronischen konsumierenden Erkrankungen wurde nicht hergestellt. Der Aufenthalt der Patienten auf einer Intensivstation war in dieser Studie mit 2 Tagen sehr kurz. Die mit der Adipositas verbundenen Probleme, wie zum Beispiel eine erhöhte Rate postoperativer Wundinfektionen, oder kardiovaskuläre Komplikationen treten häufig erst später nach dem operativen Eingriff auf. Auch Ray et al. berichtete über Patienten mit einem kurzen Aufenthalt auf einer Intensivstation. Auch in diesen Fällen waren die Effekte eines erhöhten BMI auf das Outcome der Patienten minimal [155]. Andererseits berichtete Goulenok bei Patienten einer internistischen Intensivstationen von einer erhöhten Mortalität bei übergewichtigen Patienten [155]. In dieser prospektiven Studie wurden 813 Patienten untersucht. Der cut off Punkt für Übergewichtigkeit wurde von den Autoren bei der 75. Perzentile der untersuchten Patienten gesetzt, das entsprach einem BMI 27. Der BMI war ein unabhängiger prognostischer Faktor für die Mortalität auf der Intensivstation und es wurde von den Autoren die Aufnahmen dieses Parameters in bestehende Scoresysteme gefordert [156].

Von einem paradoxen Effekt der Adipositas wurde auch bei internistischen Patienten berichtet [157]. Fonarow et al. untersuchte über 108927 Patienten mit akuter dekompensierter Herzinsuffizienz. In diesem Patientenkollektiv war ein höherer BMI mit einer geringeren Mortalität assoziiert. Es wurden vier Gruppen verglichen. Die Einteilung der Patienten

erfolgte dabei nicht nach den anerkannten WHO Empfehlungen zur Klassifikation der Adipositas. Eine mögliche Erklärung für die erhobenen Daten ist die untersuchte Grunderkrankung. Bei der Herzinsuffizienz kommt es im Verlauf zu einer Kachexie. Die dabei wichtigen Daten zu der Krankheitsdauer der Patienten wurden in der Studie nicht ausgewertet. Auch bei der Untersuchung von 6876 Veteranen wurde eine um 22% geringere Sterblichkeitsrate bei übergewichtigen Patienten im Vergleich zu normalgewichtigen Probanden gefunden [158]. Bei Tumorpatienten konnten positive Effekte eines erhöhten BMI gezeigt werden, diese waren unter Umständen mit dem Vorliegen einer Tumorkachexie bei untergewichtigen Patienten assoziiert [159]. Der Anstieg der berichteten Mortalität bei Patienten mit einem niedrigen BMI erscheint als eine direkte Konsequenz des Krankheitsassoziierten Gewichtsverlustes. Eine wichtige Rolle spielte auch die Dynamik mit der ein Gewichtsverlust bei den Patienten aufgetreten war [61].

Der BMI [155] ist erstaunlicherweise bisher in keinem Scoresystem für das perioperative Risiko als potentiell Kriterium enthalten. Aufgrund der signifikant höheren Komplikationsrate sowie einer eingeschränkten Immunkompetenz durch eine verminderte Oberflächenaktivität von Monozyten bei übergewichtigen Patienten bezogen wir den BMI in eine modifizierte Risikoanalyse mit ein. Wir verwendeten hierzu die Unterscheidung von Patienten in Hochrisikopatienten und Patienten mit normalem postoperativem Risiko. Die Aussagekraft des Risikoscores verbesserte sich dadurch dramatisch. Dies sollte künftig bei der präoperativen Risikoabschätzung berücksichtigt werden. Unsere Ergebnisse bestätigen die Forderung nach der Integration des BMI in die bestehenden Risikosysteme [160]. Die Bestimmung des Gewichtsindex durch den BMI ist durchaus kritisch zu beurteilen [161]. So ist unklar ob die Messung des Fettanteiles oder der Vergleich unterschiedlicher Körperproportionen eine bessere Abbildung des Gesundheitszustandes erlaubt. Ein Vorteil des BMI ist allerdings die einfache Bestimmung, die auch im klinischen Alltag mit großer Zuverlässigkeit durchgeführt werden kann.

Neben diesen Scoresystemen und dem Ernährungszustand spielt das Alter der Patienten in Zukunft eine immer stärkere Rolle. Patienten die älter als 85 Jahre sind repräsentieren die am schnellsten wachsende Altersgruppe in den USA [162], zum jetzigen Zeitpunkt macht diese Gruppe 3,4% der amerikanischen Bevölkerung aus.



In den letzten Jahrzehnten hat sich ein Wandel der Senioren vollzogen. Durch verminderte körperliche Belastung während der Arbeitsjahre und eine bessere medizinische Versorgung der Patienten ist heutzutage alt nicht mehr gleichbedeutend mit krank. So konnte gezeigt werden, dass das Alter alleine kein Risikofaktor für das Auftreten von postoperativen Komplikationen darstellt, vielmehr führen die häufiger auftretenden kardialen und auch pulmonalen Nebenerkrankungen zu einer Erhöhung der Mortalität [163-165].

Besonders kolorektale Eingriffe wurden in Bezug auf ihre postoperativen Komplikationen in verschiedenen Altersgruppen untersucht [165]. Es wurden sowohl Patienten ab 70 [163], als auch ab 75 Jahre [163] mit jüngeren verglichen. In den Studien konnte kein Unterschied der Mortalität in den unterschiedlichen Altersgruppen nach kolorektaler Chirurgie nachgewiesen werden. Vielmehr waren Tumorstadium und Art und Ausdehnung der operativen Therapie in der multivariaten Analyse mit einer höheren Mortalität assoziiert [164]. Die Gruppe Violi et al. verglich 1256 Patienten in vier unterschiedlichen Altersgruppen (<60, 60-69, 70-79, >80). Insbesondere bei Patienten >80 Jahre wurde eine höhere Rate von Komorbiditäten nachgewiesen, dennoch konnten keine unterschiedlichen Mortalitätsraten in den unterschiedlichen Patientenkollektiven festgestellt [166] werden. Eine Dreiteilung des Patientenkollektives wurde von Chiappa et al. angewandt. Wie in unserer Studie wurden die Patienten in folgende Altersgruppen eingeteilt: <65, 65-79 und >80. Es konnte ein Zusammenhang der Mortalität mit dem Tumorstadium hergestellt werden. Das 5 Jahres Überleben und die Inzidenz von postoperativen Komplikationen unterschieden sich nicht zwischen den einzelnen Altersgruppen.

Auch bei den von uns untersuchten Patienten konnten in den unterschiedlichen Altersgruppen keine unterschiedlichen Komplikationsraten nachgewiesen werden. Neben einer Dreiteilung des Patientenkollektives wurde auch eine Zweiteilung in Patienten >65 und jünger als 65 Jahre vorgenommen. Auch bei dieser Analyse zeigte sich kein schlechteres Outcome der Patienten mit einem Alter > 65 Jahren. Problematisch bei dem von uns untersuchten Patientenkollektiv war die geringe Anzahl der eingeschlossenen Patienten mit einem Alter >80 Jahre.

## 5 Zusammenfassung

Die von uns erhobenen Daten belegen eine transiente Dysfunktion des angeborenen und des adaptiven Immunsystems nach chirurgischen Operationen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen beobachteten wir eine Suppression des angeborenen Immunsystems mit einer reduzierten monozytären HLA-DR Expression im postoperativen Verlauf. Diese war abhängig von der Größe des Eingriffes. Die Intensität und Länge dieser postoperativen Immundysfunktion korrelierte mit der Schwere des chirurgischen Traumas. Patienten mit einer stärkeren und länger andauernden Immunsuppression haben dementsprechend ein erhöhtes Risiko für postoperative, infektiöse Komplikationen. Schwer septische Patienten zeigten unabhängig vom Outcome im Verlauf keinen Anstieg der Expressionsniveaus und verblieben in einem immunparalytischen Zustand. Im Gegensatz dazu stieg bei Patienten ohne postoperative Komplikationen die HLA-DR Expression zwischen dem ersten und dritten postoperativen Tag signifikant an. Ein Zusammenhang mit dem Auftreten einer postoperativen schweren Sepsis, in unserem Patientenkollektiv meist am 6 Tag postoperativ auftretend wird durch unsere Daten nahe gelegt.

Die Einteilung der Sepsis in Typ A und Typ B verbindet die postoperativ vorhandene Immunsuppression chirurgischer Patienten mit dem dadurch gesteigerten Risiko einer schweren Sepsis. Bei Patienten mit einer Typ B Sepsis ist das Immunsystem aufgrund der vorhergehenden Operation wesentlich eingeschränkt. Insbesondere im Zusammenhang mit dem weitaus schlechteren Outcome bei Patienten mit Typ B Sepsis ist eine frühzeitige Bestimmung des Immunstatus postoperativ als präventive Maßnahme zur frühzeitigen Erkennung dieser Erkrankung sinnvoll.

Eine präoperative Disposition für einen komplizierten Verlauf charakterisiert durch eine verminderte Oberflächenaktivität der Monozyten, wie sie von anderen Arbeitsgruppen bei Malignomen beobachtet wurde konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls veränderten neoadjuvante Therapieschemen weder die prä-, noch die postoperative Expression von HLA-DR Molekülen auf der Oberfläche von Monozyten.

Neben dem angeborenen Immunsystem kam es nach großen chirurgischen Eingriffen zu einer Alteration der adaptiven Abwehr. Alle in unserer Studie eingeschlossenen Patienten waren

postoperativ von einer generalisierten Reduktion der transkriptionalen Aktivität der T- Zellen betroffen, diese war bei Patienten mit septischen Komplikationen stärker ausgeprägt.

Die Ursachen für die schnelle Änderung des Phänotyps der Monozyten und T- Lymphozyten nach chirurgischen Eingriffen müssen in weiteren Untersuchungen genauer analysiert werden. Unsere Resultate belegen, dass die Determination von Monozyten und T- Zell Parametern zur frühzeitigen Identifikation von Hochrisikopatienten nach chirurgischen Eingriffen sinnvoll ist. In weiteren prospektiven Studien muss geklärt werden, ob die Dynamik der HLA- DR Expression auf Monozyten auch bei größeren Patientenkollektiven eine Vorhersage für postoperative Komplikationen zulässt. Weiterhin ist fraglich ob mit der Microarray Technologie und der damit identifizierbaren Genexpression eine genaue Analyse der Abwehrlage des Patienten möglich ist.

Der Vergleich der Komorbiditätsfaktoren Alter und BMI zeigte vermehrt Komplikationen und eine verminderte HLA- DR Expression in der Gruppe der übergewichtigen Patienten. Wir konnten in unserer Studie zeigen, dass Patienten mit einem erhöhten BMI ein höheres Risiko für postoperative Komplikationen haben. Insbesondere zeigte sich eine signifikant erhöhte Rate der schwereren Sepsis bei Patienten mit einem BMI >30. Die Nutzung des BMI zur Ergänzung bereits bestehender Risikostratifizierungssysteme scheint sinnvoll. Mit den unterschiedlichen Risikostratifizierungen konnten Patienten mit einer eingeschränkten postoperativen HLA- DR Expression identifiziert werden. Insbesondere bei Patienten, die mit der modifizierten Risikostratifizierung beurteilt wurden waren diese Unterschiede hochsignifikant.

## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Tilney, N.L., G.L. Bailey, and A.P. Morgan, *Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care*. Annals of surgery ISSN (PRINT VERSION): 0003 4932, 1973. **178**(2): p. 117-22.
2. Polk, H.C., Jr. and C.L. Shields, *Remote organ failure: a valid sign of occult intra-abdominal infection*. Surgery ISSN (PRINT VERSION): 0039 6060, 1977. **81**(3): p. 310-3.
3. Eiseman, B., R. Beart, and L. Norton, *Multiple organ failure*. Surgery, gynecology and obstetrics ISSN (PRINT VERSION): 0039 6087, 1977. **144**(3): p. 323-6.
4. Fry, D.E., et al., *Multiple system organ failure. The role of uncontrolled infection*. Archives of surgery Chicago, Ill. 1960 ISSN (PRINT VERSION): 0004 0010, 1980. **115**(2): p. 136-40.
5. Goris, R.J., et al., *Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation?* Archives of surgery Chicago, Ill. 1960 ISSN (PRINT VERSION): 0004 0010, 1985. **120**(10): p. 1109-15.
6. Trzeciak, S., et al., *Inclusion criteria for clinical trials in sepsis: did the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine consensus conference definitions of sepsis have an impact?* Chest ISSN (PRINT VERSION): 0012 3692, 2005. **127**(1): p. 242-5.
7. *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis*. Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 1992. **20**(6): p. 864-74.
8. Sprung, C.L., et al., *An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence in Acutely ill Patients (SOAP) study*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 2006. **32**(3): p. 421-7.
9. Rangel Frausto, M.S., et al., *The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study*. JAMA the journal of the American Medical Association ISSN (PRINT VERSION): 0098 7484, 1995. **273**(2): p. 117-23.
10. Jones, G.R. and J.A. Lowes, *The systemic inflammatory response syndrome as a predictor of bacteraemia and outcome from sepsis*. QJM monthly journal of the Association of Physicians ISSN (PRINT VERSION): 1460 2725, 1996. **89**(7): p. 515-22.
11. Alberti, C., et al., *Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients*. American journal of respiratory and critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 1073 449X, 2003. **168**(1): p. 77-84.
12. Bone, R.C., *Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation*. Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 1996. **24**(1): p. 163-72.
13. Abraham, E., et al., *Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group*. JAMA the journal of the American Medical Association ISSN (PRINT VERSION): 0098 7484, 1995. **273**(12): p. 934-41.
14. Fisher, C.J., Jr., et al., *Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind,*

- placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group.* JAMA the journal of the American Medical Association ISSN (PRINT VERSION): 0098 7484, 1994. **271**(23): p. 1836-43.
15. Dinarello, C.A. and E. Abraham, *Does blocking cytokines in sepsis work?* Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(9): p. 1156-7.
  16. Dinarello, C.A., J.A. Gelfand, and S.M. Wolff, *Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome.* JAMA the journal of the American Medical Association ISSN (PRINT VERSION): 0098 7484, 1993. **269**(14): p. 1829-35.
  17. Platzer, C., et al., *Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs.* International immunology ISSN (PRINT VERSION): 0953 8178, 1995. **7**(4): p. 517-23.
  18. Doughty, L.A., S.S. Kaplan, and J.A. Carcillo, *Inflammatory cytokine and nitric oxide responses in pediatric sepsis and organ failure.* Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 1996. **24**(7): p. 1137-43.
  19. Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L.L. Moldawer, *Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity.* Shock Augusta, Ga. ISSN (PRINT VERSION): 1073 2322, 2001. **16**(2): p. 83-96.
  20. Hotchkiss, R.S., et al., *Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans.* Journal of immunology Baltimore, Md. 1950 ISSN (PRINT VERSION): 0022 1767, 2001. **166**(11): p. 6952-63.
  21. Randow, F., et al., *Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta.* Journal of experimental medicine ISSN (PRINT VERSION): 0022 1007, 1995. **181**(5): p. 1887-92.
  22. Mills, C.D., M.D. Caldwell, and D.S. Gann, *Evidence of a plasma-mediated "window" of immunodeficiency in rats following trauma.* Journal of clinical immunology ISSN (PRINT VERSION): 0271 9142, 1989. **9**(2): p. 139-50.
  23. Hamilton, G., S. Hofbauer, and B. Hamilton, *Endotoxin, TNF-alpha, interleukin-6 and parameters of the cellular immune system in patients with intraabdominal sepsis.* Scandinavian journal of infectious diseases ISSN (PRINT VERSION): 0036 5548, 1992. **24**(3): p. 361-8.
  24. Hensler, T., et al., *Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery.* Infect Immun, 1997. **65**(6): p. 2283-91.
  25. Hotchkiss, R.S. and I.E. Karl, *The pathophysiology and treatment of sepsis.* New England journal of medicine ISSN (ELECTRONIC VERSION): 1533 4406, 2003. **348**(2): p. 138-50.
  26. Faist, E., et al., *Functional analysis of monocyte activity through synthesis patterns of proinflammatory cytokines and neopterin in patients in surgical intensive care.* Surgery ISSN (PRINT VERSION): 0039 6060, 1992. **112**(3): p. 562-72.
  27. Angus, D.C., et al., *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care.* Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 2001. **29**(7): p. 1303-10.
  28. Sands, K.E., et al., *Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers.* JAMA the journal of the American Medical Association ISSN (PRINT VERSION): 0098 7484, 1997. **278**(3): p. 234-40.
  29. Martin, G.S., et al., *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.* New England journal of medicine ISSN (ELECTRONIC VERSION): 1533 4406, 2003. **348**(16): p. 1546-54.

30. Linde Zwirble, W.T. and D.C. Angus, *Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society*. Critical care London, England ISSN (ELECTRONIC VERSION): 1466 609X, 2004. **8**(4): p. 222-6.
31. Salvo, I., et al., *The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 1995. **21 Suppl 2**: p. S244-9.
32. *From the Centers for Disease Control. Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia--United States, 1979-1987*. JAMA the journal of the American Medical Association ISSN (PRINT VERSION): 0098 7484, 1990. **263**(7): p. 937-8.
33. Haveman, J.W., et al., *The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment*. Netherlands journal of medicine ISSN (PRINT VERSION): 0300 2977, 1999. **55**(3): p. 132-41.
34. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. New England journal of medicine ISSN (PRINT VERSION): 0028 4793, 2000. **343**(5): p. 338-44.
35. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immune recognition and control of adaptive immune responses*. Seminars in immunology ISSN (PRINT VERSION): 1044 5323, 1998. **10**(5): p. 351-3.
36. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immune induction of the adaptive immune response*. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology ISSN (PRINT VERSION): 0091 7451, 1999. **64**: p. 429-35.
37. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways, kontrollieren ob doppelt!* Immunological reviews ISSN (PRINT VERSION): 0105 2896, 2000. **173**: p. 89-97.
38. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annual review of immunology ISSN (PRINT VERSION): 0732 0582, 1999. **17**: p. 593-623.
39. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: impact on the adaptive immune response*. Current opinion in immunology ISSN (PRINT VERSION): 0952 7915, 1997. **9**(1): p. 4-9.
40. Levy, M.M., et al., *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 2003. **29**(4): p. 530-8.
41. Kox, W.J., et al., *Immunomodulatory therapies in sepsis*. Intensive Care Med, 2000. **26 Suppl 1**: p. S124-8.
42. Strohmeyer, J.C., et al., *Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients*. Cytometry. Part B, Clinical cytometry ISSN (PRINT VERSION): 1552 4949, 2003. **53**(1): p. 54-62.
43. Asadullah, K., et al., *Immunodepression following neurosurgical procedures*. Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 1995. **23**(12): p. 1976-83.
44. Cheadle, W.G., et al., *HLA-DR antigen expression on peripheral blood monocytes correlates with surgical infection*. American journal of surgery ISSN (PRINT VERSION): 0002 9610, 1991. **161**(6): p. 639-45.
45. Hershman, M.J., et al., *Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient*. British journal of surgery ISSN (PRINT VERSION): 0007 1323, 1990. **77**(2): p. 204-7.
46. Tschaikowsky, K., et al., *Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients*. Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 2002. **30**(5): p. 1015-23.

47. Caille, V., et al., *Histocompatibility leukocyte antigen-D related expression is specifically altered and predicts mortality in septic shock but not in other causes of shock*. Shock Augusta, Ga. ISSN (PRINT VERSION): 1073 2322, 2004. **22**(6): p. 521-6.
48. Hoffman, J.A., et al., *Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral blood monocytes and the risk of pneumonia in pediatric lung transplant recipients*. Transplant infectious disease an official journal of the Transplantation Society ISSN (PRINT VERSION): 1398 2273, 2004. **6**(4): p. 147-55.
49. Haveman, J.W., et al., *Low HLA-DR expression on peripheral blood monocytes predicts bacterial sepsis after liver transplantation: relation with prednisolone intake*. Transplant infectious disease an official journal of the Transplantation Society ISSN (PRINT VERSION): 1398 2273, 1999. **1**(3): p. 146-52.
50. Kunz, D., et al., *Diagnostic relevance of procalcitonin, IL-6 and cellular immune status in the early phase after liver transplantation*. Transplantation proceedings ISSN (PRINT VERSION): 0041 1345, 1998. **30**(5): p. 2398-9.
51. van den Berk, J.M., et al., *Low HLA-DR expression on monocytes as a prognostic marker for bacterial sepsis after liver transplantation*. Transplantation ISSN (PRINT VERSION): 0041 1337, 1997. **63**(12): p. 1846-8.
52. Richter, A., et al., *HLA-DR expression in acute pancreatitis*. European journal of surgery Acta chirurgica ISSN (PRINT VERSION): 1102 4151, 1999. **165**(10): p. 947-51.
53. Richter, A., et al., *Immunparalyse bei akuter pankreatitis--HLA-DR-antigen-expression auf monozyten CD14+DR+*. Langenbecks Archiv fur Chirurgie ISSN (PRINT VERSION): 0023 8236, 1996. **381**(1): p. 38-41.
54. Owens, W.D., *American Society of Anesthesiologists Physical Status Classification System in not a risk classification system*. Anesthesiology ISSN (PRINT VERSION): 0003 3022, 2001. **94**(2): p. 378.
55. Ranta, S., M. Hynynen, and T. Tammisto, *A survey of the ASA physical status classification: significant variation in allocation among Finnish anaesthesiologists*. Acta anaesthesiologica Scandinavica ISSN (PRINT VERSION): 0001 5172, 1997. **41**(5): p. 629-32.
56. Haynes, S.R. and P.G. Lawler, *An assessment of the consistency of ASA physical status classification allocation*. Anaesthesia ISSN (PRINT VERSION): 0003 2409, 1995. **50**(3): p. 195-9.
57. Wolters, U., et al., *ASA classification and perioperative variables as predictors of postoperative outcome*. British journal of anaesthesia ISSN (PRINT VERSION): 0007 0912, 1996. **77**(2): p. 217-22.
58. Wilson, J., et al., *Reducing the risk of major elective surgery: randomised controlled trial of preoperative optimisation of oxygen delivery*. BMJ Clinical research ed ISSN (PRINT VERSION): 0959 8138, 1999. **318**(7191): p. 1099-103.
59. Shoemaker, W.C., P.L. Appel, and H.B. Kram, *Hemodynamic and oxygen transport responses in survivors and nonsurvivors of high-risk surgery*. Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 1993. **21**(7): p. 977-90.
60. Shoemaker, W.C., et al., *Prospective trial of supranormal values of survivors as therapeutic goals in high-risk surgical patients*. Chest ISSN (PRINT VERSION): 0012 3692, 1988. **94**(6): p. 1176-86.
61. *Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee*. World Health Organization technical report series ISSN (PRINT VERSION): 0512 3054, 1995. **854**: p. 1-452.

62. Rickenbach, M., et al., *Tabakkonsum, Blutdruck und Körpergewicht in der Schweizer Bevölkerung: MONICA-Studie 1988-89*. Schweizerische medizinische Wochenschrift. Supplementum ISSN (PRINT VERSION): 0250 5525, 1993. **48**: p. 21-8.
63. Garrow, J.S., et al., *Obesity and postoperative complications of abdominal operation*. BMJ Clinical research ed ISSN (PRINT VERSION): 0959 8138, 1988. **297**(6642): p. 181.
64. Allison, D.B., et al., *Body mass index and all-cause mortality among people age 70 and over: the Longitudinal Study of Aging*. International journal of obesity and related metabolic disorders journal of the International Association for the Study of Obesity ISSN (PRINT VERSION): 0307 0565, 1997. **21**(6): p. 424-31.
65. Cornoni Huntley, J.C., et al., *An overview of body weight of older persons, including the impact on mortality. The National Health and Nutrition Examination Survey I--Epidemiologic Follow-up Study*. Journal of clinical epidemiology ISSN (PRINT VERSION): 0895 4356, 1991. **44**(8): p. 743-53.
66. Diehr, P., et al., *Body mass index and mortality in nonsmoking older adults: the Cardiovascular Health Study*. American journal of public health ISSN (PRINT VERSION): 0090 0036, 1998. **88**(4): p. 623-9.
67. Durazo Arvizu, R., et al., *Relative weight and mortality in U.S. blacks and whites: findings from representative national population samples*. Annals of epidemiology ISSN (PRINT VERSION): 1047 2797, 1997. **7**(6): p. 383-95.
68. Allison, D.B., et al., *Annual deaths attributable to obesity in the United States*. JAMA the journal of the American Medical Association ISSN (PRINT VERSION): 0098 7484, 1999. **282**(16): p. 1530-8.
69. Must, A., et al., *The disease burden associated with overweight and obesity*. JAMA the journal of the American Medical Association ISSN (PRINT VERSION): 0098 7484, 1999. **282**(16): p. 1523-9.
70. Himes, C.L., *Obesity, disease, and functional limitation in later life*. Demography ISSN (PRINT VERSION): 0070 3370, 2000. **37**(1): p. 73-82.
71. Barbagallo, C.M., et al., *Prevalence of overweight and obesity in a rural southern Italy population and relationships with total and cardiovascular mortality: the Ventimiglia di Sicilia project*. International journal of obesity and related metabolic disorders journal of the International Association for the Study of Obesity ISSN (PRINT VERSION): 0307 0565, 2001. **25**(2): p. 185-90.
72. Farrell, S.W., et al., *The relation of body mass index, cardiorespiratory fitness, and all-cause mortality in women*. Obesity research ISSN (PRINT VERSION): 1071 7323, 2002. **10**(6): p. 417-23.
73. Hamel, B., MlHenderson,G,WlKhuri,F,Sldaley,J,J, *Surgical outcomes for patients aged 80 and older: morbidity and mortality from major noncardiac surgery*. Journal of the American Geriatrics Society, 2005. **53**(3): p. 424.
74. Vironen, H., Jlsainio,P,PlHusa,I,AlKellokumpu,H,I, *Complications and survival after surgery for rectal cancer in patients younger than and aged 75 years or older*. Diseases of the colon & rectum, 2004. **47**(7): p. 1225.
75. Ray, P., et al., *Acute respiratory failure in the elderly: etiology, emergency diagnosis and prognosis*. Critical care London, England ISSN (ELECTRONIC VERSION): 1466 609X, 2006. **10**(3): p. R82.
76. Organ, H.J., C, *Surgery in the aged*. Archives of surgery, 2003. **138**(10): p. 1046.
77. Monson, K., KlLitvak,A,DiBold,J,R, *Surgery in the aged population: surgical oncology*. Archives of surgery, 2003. **138**(10): p. 1061.
78. Boumendil, A., et al., *Prognosis of patients aged 80 years and over admitted in medical intensive care unit*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 2004. **30**(4): p. 647-54.



79. Jakob, S.M. and H.U. Rothen, *Intensive care 1980-1995: change in patient characteristics, nursing workload and outcome*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 1997. **23**(11): p. 1165-70.
80. Groeger, J.S., et al., *Descriptive analysis of critical care units in the United States: patient characteristics and intensive care unit utilization*. Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 1993. **21**(2): p. 279-91.
81. Fried, L.P., *Epidemiology of aging*. Epidemiologic reviews ISSN (PRINT VERSION): 0193 936X, 2000. **22**(1): p. 95-106.
82. Fried, L.P., et al., *Risk factors for 5-year mortality in older adults: the Cardiovascular Health Study freihand!* JAMA the journal of the American Medical Association ISSN (PRINT VERSION): 0098 7484, 1998. **279**(8): p. 585-92.
83. Manton, K.G., L. Corder, and E. Stallard, *Chronic disability trends in elderly United States populations: 1982-1994*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America ISSN (PRINT VERSION): 0027 8424, 1997. **94**(6): p. 2593-8.
84. Rich, M.W., *Heart failure in the 21st century: a cardiogeriatric syndrome*. Journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences ISSN (PRINT VERSION): 1079 5006, 2001. **56**(2): p. M88-96.
85. Marrie, T.J., *Community-acquired pneumonia in the elderly*. Clinical infectious diseases an official publication of the Infectious Diseases Society of America ISSN (PRINT VERSION): 1058 4838, 2000. **31**(4): p. 1066-78.
86. King, J., et al., *High serum carcinoembryonic antigen concentration in patients with colorectal liver metastases is associated with poor cell-mediated immunity, which is predictive of survival*. British journal of surgery ISSN (PRINT VERSION): 0007 1323, 1997. **84**(10): p. 1382-5.
87. Robinson, E., et al., *Lymphocyte subpopulations in patients with multiple primary tumors*. Cancer ISSN (PRINT VERSION): 0008 543X, 1999. **85**(9): p. 2073-6.
88. Berghella, A.M., et al., *Prognostic significance of immunological evaluation in colorectal cancer*. Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals ISSN (PRINT VERSION): 1084 9785, 1996. **11**(6): p. 355-61.
89. Ordemann, J., et al., *Immunomodulatory changes in patients with colorectal cancer*. International journal of colorectal disease ISSN (PRINT VERSION): 0179 1958, 2002. **17**(1): p. 37-41.
90. Wiegand, G., et al., *Isolation of highly enriched human monocytes from ten ml samples of heparinised whole blood*. Clinical chemistry and laboratory medicine CCLM FESCC ISSN (PRINT VERSION): 1434 6621, 1999. **37**(3): p. 369-72.
91. Alves, A., et al., *Mortality and morbidity after surgery of mid and low rectal cancer. Results of a French prospective multicentric study*. Gastroenterologie clinique et biologique ISSN (PRINT VERSION): 0399 8320, 2005. **29**(5): p. 509-14.
92. Boffa, D.J., et al., *Data from The Society of Thoracic Surgeons General Thoracic Surgery database: the surgical management of primary lung tumors*. Journal of thoracic and cardiovascular surgery ISSN (ELECTRONIC VERSION): 1097 685X, 2008. **135**(2): p. 247-54.
93. Pisanu, A., et al., *Curative surgery for gastric cancer in the elderly: treatment decisions, surgical morbidity, mortality, prognosis and quality of life*. Tumori ISSN (PRINT VERSION): 0300 8916, 2007. **93**(5): p. 478-84.
94. Alberti, C., et al., *Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 2002. **28**(2): p. 108-21.
95. Brun Buisson, C., et al., *Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French*

- ICU Group for Severe Sepsis*. JAMA the journal of the American Medical Association ISSN (PRINT VERSION): 0098 7484, 1995. **274**(12): p. 968-74.
96. Edbrooke, D.L., et al., *The patient-related costs of care for sepsis patients in a United Kingdom adult general intensive care unit*. Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 1999. **27**(9): p. 1760-7.
97. Wichmann, M.W., et al., *Incidence and mortality of severe sepsis in surgical intensive care patients: the influence of patient gender on disease process and outcome*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 2000. **26**(2): p. 167-72.
98. Brun Buisson, C., *The epidemiology of the systemic inflammatory response*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 2000. **26 Suppl 1**: p. S64-74.
99. Friedman, G., E. Silva, and J.L. Vincent, *Has the mortality of septic shock changed with time*. Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 1998. **26**(12): p. 2078-86.
100. Azoulay, E., et al., *Post-ICU mortality in critically ill infected patients: an international study*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 2005. **31**(1): p. 56-63.
101. Opal, S.M. and A.S. Cross, *Clinical trials for severe sepsis. Past failures, and future hopes*. Infectious disease clinics of North America ISSN (PRINT VERSION): 0891 5520, 1999. **13**(2): p. 285-97, vii.
102. Danai, P. and G.S. Martin, *Epidemiology of sepsis: recent advances*. Current infectious disease reports ISSN (PRINT VERSION): 1523 3847, 2005. **7**(5): p. 329-34.
103. Padkin, A., et al., *Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland*. Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 2003. **31**(9): p. 2332-8.
104. Angus, D.C., C.A. Pereira, and E. Silva, *Epidemiology of severe sepsis around the world*. 2006. **6**(2): p. 207-12 ISSN (PRINT VERSION) 1871-5303.
105. Brun Buisson, C., et al., *EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 2004. **30**(4): p. 580-8.
106. Vincent, J.L., *Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you*. Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 1997. **25**(2): p. 372-4.
107. Abraham, E., et al., *Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation*. Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 2000. **28**(1): p. 232-5.
108. Cohen, J., et al., *New strategies for clinical trials in patients with sepsis and septic shock*. Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 2001. **29**(4): p. 880-6.
109. Zahorec, R., *Definition for septic syndrome should be re-evaluated*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 2000. **26**(12): p. 1870.
110. Cheadle, W.G., *The human leukocyte antigens and their relationship to infection*. American journal of surgery ISSN (PRINT VERSION): 0002 9610, 1993. **165**(2A Suppl): p. 75S-81S.
111. Wolk, K., et al., *Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis*. Pathobiology journal of immunopathology, molecular and cellular biology ISSN (PRINT VERSION): 1015 2008, 1999. **67**(5-6): p. 253-6.
112. Pitton, C., et al., *Different regulation of TNF alpha and IL-1ra synthesis in LPS-tolerant human monocytes*. Progress in clinical and biological research ISSN (PRINT VERSION): 0361 7742, 1995. **392**: p. 523-8.

113. Volk, H.D., et al., *Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 1996. **22 Suppl 4**: p. S474-81.
114. Asadullah, K., et al., *Very low monocytic HLA-DR expression indicates high risk of infection--immunomonitoring for patients after neurosurgery and patients during high dose steroid therapy*. European journal of emergency medicine official journal of the European Society for Emergency Medicine ISSN (PRINT VERSION): 0969 9546, 1995. **2(4)**: p. 184-90.
115. Volk, H.D., et al., *Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies*. Behring Institute Mitteilungen ISSN (PRINT VERSION): 0301 0457, 1991(88): p. 208-15.
116. Docke, W.D., et al., *Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment, suchen ob vorhanden! freihand*. Nature medicine ISSN (PRINT VERSION): 1078 8956, 1997. **3(6)**: p. 678-81.
117. Ho, Y.P., et al., *A strong association between down-regulation of HLA-DR expression and the late mortality in patients with severe acute pancreatitis, wenn dann, dann bestellen*. American journal of gastroenterology ISSN (PRINT VERSION): 0002 9270, 2006. **101(5)**: p. 1117-24.
118. Nakamura, H., et al., *Immunologic parameters as significant prognostic factors in lung cancer*. Lung cancer Amsterdam, Netherlands ISSN (PRINT VERSION): 0169 5002, 2002. **37(2)**: p. 161-9.
119. Novellino, P.S., et al., *Cisplatin containing chemotherapy influences HLA-DR expression on monocytes from cancer patients*. Journal of experimental and clinical cancer research CR ISSN (PRINT VERSION): 0392 9078, 1999. **18(4)**: p. 481-4.
120. Perry, S.E., et al., *Is low monocyte HLA-DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis?* Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 2003. **29(8)**: p. 1245-52.
121. Sachse, C., et al., *Association between reduced human leukocyte antigen (HLA)-DR expression on blood monocytes and increased plasma level of interleukin-10 in patients with severe burns*. Clinical chemistry and laboratory medicine CCLM FESCC ISSN (PRINT VERSION): 1434 6621, 1999. **37(3)**: p. 193-8.
122. Satoh, A., et al., *Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral monocytes as a predictive marker of sepsis during acute pancreatitis*. Pancreas ISSN (ELECTRONIC VERSION): 1536 4828, 2002. **25(3)**: p. 245-50.
123. Wakefield, C.H., et al., *Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery*. British journal of surgery ISSN (PRINT VERSION): 0007 1323, 1993. **80(2)**: p. 205-9.
124. Ditschkowski, M., et al., *HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma*. Annals of surgery ISSN (PRINT VERSION): 0003 4932, 1999. **229(2)**: p. 246-54.
125. Docke, W.D., et al., *Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study*. Clinical chemistry ISSN (PRINT VERSION): 0009 9147, 2005. **51(12)**: p. 2341-7.
126. Flohe, S., et al., *Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the immune response of circulating monocytes after severe trauma*. Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 2003. **31(10)**: p. 2462-9.
127. Kawasaki, T., et al., *Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery*. Anesthesia and analgesia ISSN (PRINT VERSION): 0003 2999, 2001. **92(5)**: p. 1322-6.

128. Nierhaus, A., et al., *Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 2003. **29**(4): p. 646-51.
129. Oczenski, W., et al., *HLA-DR as a marker for increased risk for systemic inflammation and septic complications after cardiac surgery*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 2003. **29**(8): p. 1253-7.
130. Ordemann, J., et al., *Cellular and humoral inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections*. Surgical endoscopy ISSN (ELECTRONIC VERSION): 1432 2218, 2001. **15**(6): p. 600-8.
131. Heidecke, C.D., et al., *[Immune paralysis of T-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. Correlation of immune function with survival]*. Chirurg, 2000. **71**(2): p. 159-65.
132. Muller Kobold, A.C., et al., *Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality*. Intensive care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0342 4642, 2000. **26**(7): p. 883-92.
133. Branagan, G. and D. Finnis, *Prognosis after anastomotic leakage in colorectal surgery*. Dis Colon Rectum, 2005. **48**(5): p. 1021-6.
134. Chandra, V., et al., *Impact of primary resection on the outcome of patients with perforated diverticulitis*. Archives of surgery Chicago, Ill. 1960 ISSN (PRINT VERSION): 0004 0010, 2004. **139**(11): p. 1221-4.
135. Maier, S., et al., *Besonderheiten der abdominalen Sepsis*. Chirurg Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizin, Der ISSN (PRINT VERSION): 0009 4722, 2005. **76**(9): p. 829-36.
136. Hensler, T., et al., *Increased susceptibility to postoperative sepsis in patients with impaired monocyte IL-12 production*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2655-9.
137. Lin, M.T. and T.E. Albertson, *Genomic polymorphisms in sepsis*. Critical care medicine ISSN (PRINT VERSION): 0090 3493, 2004. **32**(2): p. 569-79.
138. Prucha, M., et al., *Expression profiling: toward an application in sepsis diagnostics*. Shock Augusta, Ga. ISSN (PRINT VERSION): 1073 2322, 2004. **22**(1): p. 29-33.
139. Owens, W.D., J.A. Felts, and E.L. Spitznagel, Jr., *ASA physical status classifications: a study of consistency of ratings*. Anesthesiology ISSN (PRINT VERSION): 0003 3022, 1978. **49**(4): p. 239-43.
140. Arenal, J.J. and M. Bengoechea Beeby, *Mortality associated with emergency abdominal surgery in the elderly*. Canadian journal of surgery; Journal canadien de chirurgie ISSN (PRINT VERSION): 0008 428X, 2003. **46**(2): p. 111-6.
141. Woodfield, J.C., et al., *American Society of Anesthesiologists classification of physical status as a predictor of wound infection*. ANZ journal of surgery ISSN (PRINT VERSION): 1445 1433, 2007. **77**(9): p. 738-41.
142. Skaga, N.O., et al., *Pre-injury ASA physical status classification is an independent predictor of mortality after trauma*. Journal of trauma ISSN (ELECTRONIC VERSION): 1529 8809, 2007. **63**(5): p. 972-8.
143. Mak, P.H., R.C. Campbell, and M.G.C.A.A.S.o.A. Irwin, *The ASA Physical Status Classification: inter-observer consistency*. American Society of Anesthesiologists. Anaesthesia and intensive care ISSN (PRINT VERSION): 0310 057X, 2002. **30**(5): p. 633-40.
144. Aronson, W.L., M.S. McAuliffe, and K. Miller, *Variability in the American Society of Anesthesiologists Physical Status Classification Scale*. AANA journal ISSN (PRINT VERSION): 0094 6354, 2003. **71**(4): p. 265-74.
145. Bowles, T.A., et al., *Simplified risk stratification in elective colorectal surgery*. ANZ journal of surgery ISSN (ELECTRONIC VERSION): 1445 2197, 2008. **78**(1-2): p. 24-7.

146. Dindo, D., et al., *Obesity in general elective surgery*. Lancet ISSN (ELECTRONIC VERSION): 1474 547X, 2003. **361**(9374): p. 2032-5.
147. Lindsted, K.D. and P.N. Singh, *Body mass and 26-year risk of mortality among women who never smoked: findings from the Adventist Mortality Study*. American journal of epidemiology ISSN (PRINT VERSION): 0002 9262, 1997. **146**(1): p. 1-11.
148. Singh, P.N. and K.D. Lindsted, *Body mass and 26-year risk of mortality from specific diseases among women who never smoked*. Epidemiology Cambridge, Mass ISSN (PRINT VERSION): 1044 3983, 1998. **9**(3): p. 246-54.
149. Lindsted, K.D. and P.N. Singh, *Body mass and 26 y risk of mortality among men who never smoked: a re-analysis among men from the Adventist Mortality Study*. International journal of obesity and related metabolic disorders journal of the International Association for the Study of Obesity ISSN (PRINT VERSION): 0307 0565, 1998. **22**(6): p. 544-8.
150. Calle, E.E., et al., *Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults*. New England journal of medicine ISSN (PRINT VERSION): 0028 4793, 1999. **341**(15): p. 1097-105.
151. Adams, J.P. and P.G. Murphy, *Obesity in anaesthesia and intensive care*. British journal of anaesthesia ISSN (PRINT VERSION): 0007 0912, 2000. **85**(1): p. 91-108.
152. Bamgbade, O.A., et al., *Postoperative complications in obese and nonobese patients*. World journal of surgery ISSN (PRINT VERSION): 0364 2313, 2007. **31**(3): p. 556-60.
153. Tremblay, A. and V. Bandi, *Impact of body mass index on outcomes following critical care*. Chest ISSN (PRINT VERSION): 0012 3692, 2003. **123**(4): p. 1202-7.
154. Ray, D.E., et al., *The effect of body mass index on patient outcomes in a medical ICU*. Chest ISSN (PRINT VERSION): 0012 3692, 2005. **127**(6): p. 2125-31.
155. Goulenok, C., et al., *Influence of overweight on ICU mortality: a prospective study*. Chest ISSN (PRINT VERSION): 0012 3692, 2004. **125**(4): p. 1441-5.
156. Fonarow, G.C., et al., *An obesity paradox in acute heart failure: analysis of body mass index and inhospital mortality for 108,927 patients in the Acute Decompensated Heart Failure National Registry*. American heart journal ISSN (ELECTRONIC VERSION): 1097 6744, 2007. **153**(1): p. 74-81.
157. McAuley, P., et al., *Body mass, fitness and survival in veteran patients: another obesity paradox?* American journal of medicine ISSN (ELECTRONIC VERSION): 1555 7162, 2007. **120**(6): p. 518-24.
158. Palesty, J.A. and S.J. Dudrick, *What we have learned about cachexia in gastrointestinal cancer*. Digestive diseases Basel, Switzerland ISSN (PRINT VERSION): 0257 2753, 2003. **21**(3): p. 198-213.
159. Lainscak, M., M. Podbregar, and S.D. Anker, *How does cachexia influence survival in cancer, heart failure and other chronic diseases?* 2007. **1**(4): p. 299-305 ISSN (ELECTRONIC VERSION) 1751-4266.
160. Akinnusi, M.E., L.A. Pineda, and A.A. El Solh, *Effect of obesity on intensive care morbidity and mortality: a meta-analysis*. Critical care medicine ISSN (ELECTRONIC VERSION): 1530 0293, 2008. **36**(1): p. 151-8.
161. *Census Bureau profiles foreign-born and first-generation U.S. residents*. Public health reports Washington, D.C. 1974 ISSN (PRINT VERSION): 0033 3549, 2002. **117**(1): p. 85.
162. McNicol, L., et al., *Postoperative complications and mortality in older patients having non-cardiac surgery at three Melbourne teaching hospitals*. Medical journal of Australia ISSN (PRINT VERSION): 0025 729X, 2007. **186**(9): p. 447-52.

163. Makela, J.T., H. Kiviniemi, and S. Laitinen, *Survival after operations for colorectal cancer in patients aged 75 years or over*. European journal of surgery Acta chirurgica ISSN (PRINT VERSION): 1102 4151, 2000. **166**(6): p. 473-9.
164. Violi, V., et al., *Curative surgery for colorectal cancer: long-term results and life expectancy in the elderly*. Diseases of the colon and rectum ISSN (PRINT VERSION): 0012 3706, 1998. **41**(3): p. 291-8.
165. Arenal, J.J., et al., *Colorectal resection and primary anastomosis in patients aged 70 and older: prospective study*. Eur J Surg, 1999. **165**(6): p. 593-7.
166. Chiappa, A., et al., *Surgical outcomes for colorectal cancer patients including the elderly*. Hepato gastroenterology ISSN (PRINT VERSION): 0172 6390, 2001. **48**(38): p. 440-4.

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

ACCP	American College of Chest Physicians
APC	Antigenpräsentierende Zelle
A/R	Adipositas oder andere Risikofaktoren
A + R	Adipositas und andere Risikofaktoren
BMI	Body Mass Index
CARS	Compensatory anti-inflammatory response syndrom
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
DNA	Desoxiribonukleinsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Floureszeinisothiocyanat
FSC	Forward Angle Light Scatter
H <sub>2</sub> O	Wasser
HR	Hochrisikopatient
IFN	Interferon
MEF	Molecules of Equivalent Flouochrome
MHC	major histocompatibility complex
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MODS	Multiple organ dysfunction syndrom
mRNA	messenger RNA
NK	natürliche Killerzelle
NR	normales postoperatives Risiko
PBMC	peripheren mononukleären Zellen
PBML	Periphere Blut- Mono- und Lymphozyten
PBS Acid	phosphate-buffered saline Säure
PE	R-Phycoerythrin
RF	Risikofaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase-freiem DEPC	Ribonuklease freies Diethylpyrocarbonat
RR	Riva-Rocchi, unblutige Blutdruckmessung
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SSC	Side Scatter

SSCM	Society of Critical Care Medicine
TCR	T- Zell- Rezeptor
WBC	white blood cells, Leukozytenanzahl



### 6.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Vergleich der Eigenschaften von Komponenten des angeborenen und des adaptiven Immunsystems [39]	12
<b>Tabelle 2:</b> ASA Klassifikation aus [54-56].	13
<b>Tabelle 3:</b> Klassifikation Adipositas nach WHO [61]	15
<b>Tabelle 4:</b> Farbstoffe zur Anwendung in der Durchflusszytometrie	27
<b>Tabelle 5:</b> Durchgeführte Operationen bei den eingeschlossenen Patienten. Geschlechterverteilung (♂/♀) sowie Mittelwerte und Standardabweichung für Operationsdauer (Stunden), Alter (Jahre), stationärer Aufenthalt postoperativ (Tage) und Operationsdauer (Stunden) werden dargestellt. In der Gruppe multiviscerale Operationen wurden Ösophagus- und Leberchirurgische Eingriffe neben multivisceralen Resektionen miterfasst.	35
<b>Tabelle 6:</b> Überblick über die demografischen Daten, ihre Verteilung zwischen Patienten mit schwerer Sepsis und Patienten ohne Komplikationen in der Gruppe der großen visceralchirurgischen Eingriffe. Alter in Jahren, Operationsdauer in Stunden, stat. Aufenthalt in Tagen, Geschlecht: ♂/♀.	36
<b>Tabelle 7:</b> Aufstellung der verschiedenen Ursachen postoperativer Komplikationen	37
<b>Tabelle 8:</b> Dargestellt werden die unterschiedlich stratifizierten Gruppen, in Abhängigkeit von BMI und Alter. Geschlecht: ♂/♀., Op Dauer in Stunden, stat. Aufenthalt in Tagen	38
<b>Tabelle 9:</b> Dargestellt werden die unterschiedlich stratifizierten Gruppen, in Abhängigkeit von BMI und Alter. Geschlecht: ♂/♀., Op Dauer in Stunden, stat. Aufenthalt in Tagen	38
<b>Tabelle 10:</b> Darstellung der unterschiedlichen Geschlechtsverteilung, der OP Dauer (in Stunden), sowie der postoperativen Komplikationen in Abhängigkeit von ASA der Patienten, Geschlecht: ♂/♀., Op Dauer in Stunden, stat. Aufenthalt in Tagen (ASA 1-2 n= 31, ASA> 2 n= 70)	39
<b>Tabelle 11:</b> Dargestellt werden die klinischen Daten, sowie die OP Dauer und die Behandlungsdauer der Patienten mit unterschiedlichen Risikofaktoren. Geschlecht: ♂/♀., Op Dauer in Stunden, stat. Aufenthalt in Tagen.	40
<b>Tabelle 12:</b> Dargestellt werden die klinischen Daten, sowie die OP Dauer und die Behandlungsdauer der Patienten mit unterschiedlichen Risikofaktoren. Geschlecht: ♂/♀., Op Dauer in Stunden, stat. Aufenthalt in Tagen.	41

## 6.4 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Darstellung des biphasischen Verlaufes der Sepsis. Überarbeitet nach Hotchkiss et al. [25]	9
<b>Abbildung 2:</b> vereinfachtes Prinzip der FACS Analyse, aus: Betriebsanleitung des FACSScan®	26
<b>Abbildung 3:</b> Darstellung verschiedener häufig genutzter Flouochrome	27
<b>Abbildung 4:</b> Darstellung von FACS Scan FSC und SSC vor und nach Reinigung, Färbung CD45 gegen CD3	29
<b>Abbildung 5:</b> schematischer Ablauf der Mikroarray Analyse, unter Verwendung von Oligonucleotide Microarray, MWG Human 40k Array	32
<b>Abbildung 6:</b> 6a) Darstellung des postoperativen stationären Aufenthalts in Tagen. 6b) Operationsdauer in Stunden in Abhängigkeit von der durchgeführten Operation.( n= siehe Tabelle 5)	35
<b>Abbildung 7:</b> Dargestellt wird die Behandlungsdauer bei Patienten 7a) mit unterschiedlichem Alter 7b) unterschiedlichem BMI 7c) unterschiedlicher ASA Klassifikation	38
<b>Abbildung 8:</b> Dargestellt wird die Behandlungsdauer bei Patienten mit unterschiedlichen Risikofaktoren, a) Verglichen werden chirurgische Hochrisikopatienten mit Patienten ohne Risikofaktoren (HR: n=59, NR n= 42) b) Vergleich der Behandlungstage in Abhängigkeit von korrigierter Risikostratifizierung (ORF n= 31, A/R n= 44, A+R n= 26)	40
<b>Abbildung 9:</b> Expression von HLA- DR Molekülen auf peripheren Monocyten, dargestellt werden die mittlere Floureszenzintensität 9a) der Patienten mit einer Operationsdauer > 2,5 Stunden (n=88) und < 2,5 Stunden (n=13) 9b) der „minor“ (n=17) und der „major“ (n=101) Chirurgie präoperativ, sowie 24h, 48h und 72 h postoperativ.	42
<b>Abbildung 10:</b> Unterschiedliche HLA- DR Expression in den verschiedenen Operationsgebieten. Thorax- (n=14), Rektum- (n=19), Kolon- (n=22), Pankreas- (n=15), Magen- (n=18) und andere Operationen (n=13), zu verschiedenen Zeitpunkten: 10a): präoperativ 10b): 24 Stunden 10c): 48 Stunden 10d): 72 Stunden postoperativ	43
<b>Abbildung 11:</b> Vergleich der HLA- DR Expression zwischen 11a) Patienten mit schwerere Sepsis verstorbene (n= 6) vs. Überlebende (n=6) 11b): Dargestellt werden die mittleren Floureszenzintensitäten von verstorbenen Patienten (n= 6) und von Patienten ohne Komplikationen (n=70) 11c) Vergleich zwischen Patienten mit einer schwereren Sepsis (n= 12) und ohne postoperative Komplikationen (n= 70) 11d) Vergleich von Patienten	

- mit SIRS (n=40) und ohne SIRS (n=61) 11e) Vergleich von kompliziertem (n=31) und unkompliziertem Verlauf (n=70) 45
- Abbildung 12:** Darstellung der Dynamik der HLA- DR Werte postoperativ zwischen 24h und 72h . gegenübergestellt werden 12a) Patienten ohne Komplikationen 12b) Patienten mit schwerer Sepsis 12c) postoperativ verstorbene Patienten 12d) Patienten mit „major“ Chirurgie 12e) Patienten mit „minor“ Chirurgie 46
- Abbildung 13:** 13a) HLA- DR Expression der verschiedenen Altersgruppen (<65 n=44, 65-79 n=47, >80 n=10) zu den einzelnen Zeitpunkten 13b) Die mittlere Fluoreszenzintensität der einzelnen Patienten in BMI Gruppen (<25 n=47, 25-30 n=34, >30 n=20) 47
- Abbildung 14:** Darstellung der Unterschiedlichen Monozytenoberflächenaktivität 14a) in Abhängigkeit von Alter (<65 n= 44,>65 n=57) 14b) in Abhängigkeit vom BMI (<25 n= 47, >25 n=54) 47
- Abbildung 15:** Unterschiedliche Risikostratifizierungssysteme 15a) chirurgische Hochrisikopatienten vs. Patienten mit normalem Risiko für postoperative Komplikationen (HR n= 59, NR = 42) 15b) Vergleich unterschiedlicher ASA Werte (ASA 1+2 n= 31, ASA >2 n= 70 15c) Vergleich der korrigierten Risikostratifizierung (0 RF n= 31, A/R n= 44, A+ R n= 36) 49
- Abbildung 16:** 16a) Einfluss der neoadjuvanten Radio-Chemotherapie auf die HLA- DR Expression auf Monozyten (neoadj. Th. n= 13, ohne Vorbeh. n= 88) 16b) Verglichen wurden die HLA- DR Expressionswerte prä und postoperativ von Patienten mit Karzinomen und ohne maligne Grunderkrankung (Nonmalignom n= 20, Malignom n= 81) 50
- Abbildung 17:** Darstellung der Genexpression präoperativ im Vergleich zu postoperativen Ergebnissen 51
- Abbildung 18:** Unterschiedlicher Anteil der Expressionsprodukte an der gesamt Expression 52

## **7 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich Alexander-Konstantin Hegenbart, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

## **8 Danksagung**

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. C.- D. Heidecke für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. S. Maier für die unermüdliche Unterstützung und die wissenschaftliche Betreuung bei der Konzeption, der Durchführung und der Erstellung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Beteiligten des Graduiertenkollegs 8401 und hier insbesondere Frau Prof. Dr. med. B. Bröker und Prof. Dr. rer. nat. R.- S. Jack für den wissenschaftliche Background und die Erweiterung des eigenen Horizontes durch die interdisziplinären Veranstaltungen des Graduiertenkollegs bedanken.

Ebenso herzlich bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Immunologie. Insbesondere Suresh Kumar gilt mein Dank für die Unterstützung bei den unterschiedlichen Analysemethoden die an zahlreichen Blutproben durchgeführt wurden. Weiterhin wäre die Bestimmung der HLA- DR Expression auf Monozyten ohne die umfangreiche Beteiligung von Dr. med. M. Grunwald nicht möglich gewesen.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Geburtsdatum 09.06.1978  
Geburtsort Potsdam  
Familienstand ledig, keine Kinder  
Staatsangehörigkeit deutsch

### Schulbildung

09/1985 - 07/1990 Besuch der Polytechnischen Oberschule Kleinmachnow  
08/1990 - 07/1998 Besuch des Immanuel-Kant-Gymnasiums in Teltow  
(Abschluss Abitur)

### Zivildienst

08/1998 - 09/1999 Zivildienst in der orthopädischen Klinik des Oberlinhauses  
Potsdam Babelsberg

### Medizinische Ausbildung

10/1999 – 05/2006 Studium der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der  
Ernst-Moritz-Arndt - Universität Greifswald

03/2002 Ärztliche Vorprüfung  
03/2003 1. Staatsexamen  
03/2005 2. Staatsexamen  
05/2006 3. Staatsexamen

### Beschäftigungsverhältnisse

10/2006– 03/2007 Assistenzarzt in der Klinik für Allgemein und Thoraxchirurgie im  
Dietrich Bonhoeffer Klinikum Neubrandenburg...

04/2007– 09/2008 Assistenzarzt in der Klinik für Orthopädie in Altentreptow, sowie  
in der NFA und Intensivstation im Dietrich Bonhoeffer Klinikum  
Neubrandenburg

seit 10/2008 Assistenzarzt in der Gemeinschaftspraxis Dr. med. Leunert und Dr.  
med. Lober in Teltow

### Promotion

04/2003- 03/2004 Stipendiat im Graduiertenkolleg (GRK 840/1) der Deutschen  
Forschungsgemeinschaft (DFG) „Wechselwirkungen zwischen  
Erreger und Wirt bei generalisierten bakteriellen Infektionen“ zu  
dem Thema: „Aktivierungsstatus von T- Zellen nach großen  
chirurgischen Eingriffen“ in der chirurgischen Klinik Greifswald.

04/2004– 10/2006 Assoziiert im Graduiertenkolleg

**Zusätzliche Abschlüsse**

2001	Ausbildung zum Rettungssanitäter
2002/2003	Wundmanagement Kurs an der EMAU Greifswald, Nahttechniken der Chirurgie/ Poliklinik der Chirurgie EMAU Greifswald
2004	Kurs für „Schutzimpfungen mit praktischen Übungen“ an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Greifswald
2007	Kurs Notfallmedizin
2008	Grundkurs/Spezialkurs im Strahlenschutz
2009	Anerkennung der Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

Datum

Unterschrift