

**Universitätsklinikum Ulm**  
**Klinik für Anästhesiologie**  
**Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Michael Georgieff**

**Aktivierung des NF- $\kappa$ B -Signaltransduktionsweges in  
mononukleären peripheren Blutzellen bei elektiven chirurgischen  
Patienten im Bezug auf deren klinischen Verlauf**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

**vorgelegt von Andrea Gratza**  
**geboren in Augsburg**

**2009**

**Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Uwe Senftleben**

**2. Berichterstatter: PD Dr. med. Bernd Mühling**

**Tag der Promotion: 29. 10. 2010**

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Sepsis / Systemische Entzündungsreaktion.....	1
1.2 Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor kappa B (NF- $\kappa$ B).....	4
1.3 Klinische Scores.....	9
1.4 Referenzstudien.....	11
1.5 Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung.....	17
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 Materialien.....	19
2.2 Methodik der NF- $\kappa$ B Bestimmung.....	20
2.3 Probandenkollektiv und Studiendesign.....	27
2.4 Blutentnahme.....	28
2.5 Dokumentation.....	28
2.6 Erhebung klinischer Scores.....	30
2.7 Statistik.....	32
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1 Kollektivbeschreibung.....	34
3.2 Verlauf laborchemischer standardisierter Entzündungsparameter.....	35
3.3 Verlauf der von NF- $\kappa$ B abgeleiteten Zielgrößen.....	42
3.4 Verlauf klinischer Scores.....	52
3.5 Korrelationsanalyse.....	58
<b>4 Diskussion</b>	<b>60</b>
4.1 Einleitung.....	60
4.2 Probandenkollektiv.....	62
4.3 Verlauf laborchemisch standardisierter Entzündungsparameter.....	63
4.4 Verlauf der von NF- $\kappa$ B abgeleiteten Zielgrößen.....	65
4.5 Verlauf klinischer Scores.....	70

---

4.6	<i>Korrelationsanalysen.....</i>	<i>75</i>
4.7	<i>Schlussfolgerung und Ausblick.....</i>	<i>78</i>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>101</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

AC	Arteria Carotis
AF	Atemfrequenz
aHT	arterielle Hypertonie
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AK	Aktivierungskapazität
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
ASA	American Society of Anesthesiologist
(d)ATP	(desoxy) Adenosintriphosphat
AZ	Allgemeinzustand
BA	Bindungsaktivität
BAA	Bauchaortenaneurysma
BAFF	B-Cell Activating Factor of the Tumor Necrosis Factor Family
Bcl-xL	Basal cell lymphoma-extra large
Blyss	B-lymphozyten Stimulator
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
ca.	Cirka
CBF	CAAT Binding Factor
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
c-Flip	Cellular FLICE-inhibitory Proteins
Ci	Curie
clAP	cellular Inhibitor of Apoptose Protein
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyklooxygenase 2
CP1	Cleft plate, isolated 1
Cpm	Counts per minute
CRP	C-reaktives Protein
C-terminal	Carboxyl-terminal
CTF	CAAT-Box Transkriptions- Faktor
(d)CTP	(desoxy) Cytidintriphosphat

---

d	dezi ( $10^{-1}$ )
DLP	Dyslipoproteinämie
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
€	Euro
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FADD	Fas-associated death domain protein
FCS	Fetal Calf Serum
FiO <sub>2</sub>	Sauerstofffraktion der Einatemluft
g	Gramm
GCS	Glasgow Coma Scale
gE	Erdbeschleunigung
G CSF	Granulozyte colony stimulating Factor
GM CSF	Granulozyte Makrophage colony stimulating Factor
(d)GTP	(desoxy) Guanosintriphosphat
h	hour, Stunde
HCL	Hydrochlorid-Säure, Salzsäure
HF	Herzfrequenz
Hk	Hämatokrit
HMf	Histone M. fervidus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
H <sub>2</sub> O	Wasser
ICAM-1	Inter-cellular Adhesion Molecule1
I $\kappa$ B	Inhibitor kappa B
IKK	Inhibitor kappa B Kinase
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
KCl	Kalium Chlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit

---

l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LT a	Leukotrien a
LT b	Leukotrien b
m	Milli ( $10^{-3}$ )
M	Molar
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
MHC	Major Histocompatibility Complex
MI	Myokardinfarkt
Min	Minute
MCP 1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MIP-1a	Macrophage inflammatory protein 1a
mmHG	Millimeter-Quecksilbersäule
MODS	Multiples Organ Dysfunktions Syndrom
MOF	Multi Organ Failure, Multiorganversagen
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NEMO	NF- $\kappa$ B essential Modulator
NaCl	Natrium Chlorid
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor kappa B
NF-Y	Nukleärer Faktor Y
NF1	Nukleärer Faktor 1
NIK	NF- $\kappa$ B induzierende Kinase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OP	Operation
<sup>32</sup> P	Isotop Phosphor mit der Massenzahl / Nukleonenzahl 32
p	piko ( $10^{-12}$ )
PaCO <sub>2</sub>	Partialdruck von CO <sub>2</sub> in der Ausatemluft gemessen
PaO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck in der Ausatemluft gemessen
pH	pondus Hydrogenii
PBS	Phosphat Buffered Saline, Pufferlösung
PMNCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
pNPP	p-Nitrophenyl Phosphate
PLA2	Phospholipase 2
PNK	Polynukleotid Kinase

Poly-dIdC	Poly–Deoxy Inosinic Deoxycytidylic Acid
PSL	photostimulierte Lumineszenz
PTT	Partielle Thromboplastin Zeit
r	Signifikanzniveau
r <sub>SP</sub>	Spearman's Korrelationskoeffizient
RANK	Rezeptor Aktivator von NF-κB Ligand
RANTES	Regulated upon activation normal T-cell secreted
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Zellkulturmedium
RR	Blutdruck
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
Syst.	systolisch
T	Körpertemperatur
TACE	TNF-alpha converting Enzyme
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEA	Thrombendarteriektomie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
TNF R	Tumor Necrosis Factor Rezeptor
Tris	Tris Puffer, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
(d)TTP	(desoxy) Thymidintriphosphat
V	Volt
W	Watt
WBC	White Blood Cell, Leukozyt
z. B.	zum Beispiel
Z. n.	Zustand nach

## **1. Einleitung**

### **1.1 Sepsis / Systemische Entzündungsreaktion**

Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock und SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrom): Gefürchtete Erkrankungen aus dem Bereich der Intensivmedizin, die aufgrund ihrer Komplexität bereits viele Jahre Forschungsarbeit mit zahlreichen neuen Erkenntnissen implizieren, aber auch noch viele Unbekannte bergen. Trotz aller Fortschritte in den letzten Jahren stellen sie, alleine durch ihre weitgehend unveränderten Mortalitäts- und Letalitätsraten, immer noch eine Herausforderung für die Medizin dar und gewinnen dadurch auch eine außerordentlich fächerübergreifende Bedeutung. Darüber hinaus haben sie einen erheblichen gesundheitsökonomischen Stellenwert, da sie zu den kostenträchtigsten Komplikationen auf modernen Intensivstationen zählen.

Diese Tatsachen machen die Notwendigkeit eines inflammatorischen Monitorings deutlich, welches das rechtzeitige Erkennen und die Verlaufskontrolle gefährdeter Patienten ermöglicht. Ein sepsisspezifischer Marker existiert zurzeit noch nicht, wobei einige aktuell in der intensiven Erforschung sind. In dieser Hinsicht viel versprechend ist der Nukleäre Faktor kappa B (NF- $\kappa$ B), welcher eine große Rolle in entsprechenden pathophysiologischen Vorgängen zu spielen scheint.

Auf diesem Faktor soll in der vorliegenden Studie das Hauptaugenmerk liegen. Insbesondere soll seine perioperative Aktivierung untersucht werden, da es durch Prozesse wie Ischämie / Reperfusion, Endotoxinämie, Bakteriämie und ausgeprägten Blutverlust, wie sie im Verlauf großer chirurgischer Eingriffe auftreten können, zu systemischen Entzündungsreaktionen und Aktivierung von NF- $\kappa$ B kommt (Reilly & Bulkley 1993; Flohe et al. 1997; Chang et al. 2001; Kato et al. 2002). Das schwere chirurgische Trauma dient hier als Modell der systemisch ablaufenden pathophysiologischen Vorgänge, wie sie zum Beispiel beim SIRS nicht-infektiöser Genese auftreten.

#### **1.1.1 Definition von SIRS / Sepsis**

Sepsis wird heute als komplexe systemische inflammatorische Wirtsreaktion auf eine initiale Infektion angesehen (Hotchkiss & Karl 2003).

Es existieren derzeit keine Parameter, die allein zur Diagnose von SIRS / Sepsis führen. Genauer gesagt werden SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock als ein Krankheitskontinuum angesehen, das über eine Kombination aus Vitalparametern, Laborwerten, hämodynamischen Daten und Organfunktionen definiert wird.

Der Grundstein für die aktuelle Definition wurde 1992 durch die Konsensus-Konferenz des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine (ACCP / SCCM 1992) gelegt. 2001 wurden sie durch die Internationale Sepsis Definition Conference lediglich um einige Symptome und klinische Zeichen erweitert, wobei die Grunddefinition jedoch beibehalten wurde (SCCM 2001).

### **1.1.2 Epidemiologie**

Nach neuesten Erhebungen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Kompetenznetzwerks Sepsis (SepNet) beläuft sich die Inzidenz für eine schwere Sepsis bzw. einen septischen Schock auf 75.000 Einwohner und für eine Sepsis auf 79.000. Dabei liegt die Prävalenz für Sepsis auf Intensivstationen bei 12% und für schwere Sepsis und septischen Schock bei 11% (Engel et al. 2007).

Sepsis ist die häufigste Todesursache auf nichtkardiologischen Intensivstationen (Parriol et al. 1990). Darüber hinaus stellen septische Erkrankungen mit ca. 60.000 Todesfällen pro Jahr die dritthäufigste Todesursache nach koronaren Herzerkrankungen (KHK) und dem akuten Myokardinfarkt dar. Die direkt anteiligen Kosten, die alleine für die intensivmedizinische Behandlung von Patienten mit schwerer Sepsis in Deutschland anfallen, liegen bei ca. 1,77 Milliarden Euro. Damit werden etwa 30% des Budgets für Intensivmedizin in die Behandlung der Sepsis investiert. Die indirekten Kosten werden auf zusätzliche zwei bis vier Milliarden Euro geschätzt (Moerer & Burchardi 2004; Daniels 2007).

Darüber hinaus muss man vor dem Hintergrund der steigenden Zahl invasiver Maßnahmen in der Intensivmedizin sowie der demografischen Veränderung einer alternden Gesellschaft mit einer weiteren Inzidenzzunahme septischer Erkrankungen rechnen. Diese Daten unterstreichen deutlich die enorme volkswirtschaftliche Bedeutung des Krankheitsbildes.

### **1.1.3 Pathophysiologie der Sepsis**

In der Genese der Sepsis spielt das Zusammenwirken von Infektion und Immunantwort eine entscheidende Rolle. Dabei ist es unerheblich, ob diese Infektion bakterieller, viraler, fungaler oder parasitärer Natur ist. Alle Erreger sind prinzipiell in der Lage eine Sepsis zu triggern. Letztlich kommt es zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Vor allem mononukleäre Zellen spielen hierbei eine Schlüsselrolle, da sie die wichtigsten proinflammatorischen Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-6 und IL-1 ausschütten. Diese primäre Immunantwort wird durch die Freisetzung einer Vielzahl von sekundären Entzündungsmediatoren weiter verstärkt.

Initial lag der Schluss nahe, eine überschießende Immunantwort für die klinische Symptomatik der Sepsis verantwortlich zu machen, da einige Studien eine Überproduktion von proinflammatorischen Immunmediatoren nachweisen konnten (Rogy et al. 1994). Durch den mangelnden Erfolg etlicher antiinflammatorischer Therapieansätze in klinischen Studien, wird deren alleinige Rolle in der Pathogenese der Sepsis heute jedoch bezweifelt (Bone et al. 1987; Angus et al. 2000; Reinhart et al. 2001).

Aktuell geht man vielmehr davon aus, dass es in der Pathogenese zu einer komplexen Interaktion zwischen pro- und auch antiinflammatorischen Entzündungsvorgängen kommt. Durch die Bildung antiinflammatorischer Substanzen wie z.B. lösliche TNF Rezeptoren, IL-1 Rezeptorantagonisten und antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4 und IL-10 kommt es neben der Hyperinflammation nachweislich auch zu einer kompensatorischen antiinflammatorischen Reaktion (Cohen 2002; Hotchkiss et al. 2003).

Ein weiterer Gesichtspunkt der Herunterregulierung des Immunsystems während einer Sepsis ist die Entstehung einer vermehrten Lymphozytenapoptose (Cohen 2002). Lymphopenie bei Sepsispatienten ist bekannt, und durch Autopsieanalysen bewiesen (Hotchkiss et al. 1999).

Alles in allem ist die Pathogenese der Sepsis aufgrund ihrer Komplexität noch nicht in ihrer Gesamtheit verstanden. Klar ist, dass neben einer massiven Immunsystemaktivierung auch eine Immundepression eine Rolle spielen muss. Deren genauer zeitlicher Zusammenhang und die exakten klinischen Auswirkungen sind aber noch nicht gänzlich erfasst und lassen noch Raum für Forschung, wobei natürlich auch genetische Prädispositionen nicht außer Acht

gelassen werden dürfen. Auch hier gibt es Erkenntnisse im Rahmen von Studien, die belegen, dass unterschiedliche Mutationen in Genen von Entzündungskaskaden dazu führen können, dass der Körper unterschiedlich auf ein septisches Ereignis reagiert (Lorenz et al. 2000; Stuber 2001). Das Ziel der aktuellen Forschung bleibt somit nach wie vor, die komplexen Interaktionen der pathophysiologischen Vorgänge bei der Sepsis aufzudecken und neue Therapieansätze zu entwerfen.

## **1.2 Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor kappa B (NF- $\kappa$ B)**

### **1.2.1 Physiologische Funktionen und allgemeiner Stellenwert**

Nachdem NF- $\kappa$ B 1986 erstmals als B-Lymphozyten-spezifischer Transkriptionsfaktor für Gene der  $\kappa$ -Leichtketten beschrieben wurde (Sen & Baltimore 1986), ist heute bekannt, dass NF- $\kappa$ B ubiquitär exprimiert wird und in fast allen Zellen in inaktivem, induzierbarem Zustand im Zytoplasma vorliegt.

Die Zahl der durch NF- $\kappa$ B beeinflussten Zielgene beläuft sich nach aktuellem Wissensstand auf etwa 180 (Gilmore 2006). Dabei stellen einen Großteil davon streß-induzierbare Gene dar. Aber auch eine Vielzahl von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, Akute Phase Proteinen und Wachstumsfaktoren, werden durch NF- $\kappa$ B mit reguliert (Pahl 1999; Blackwell et al. 2000). Darüber hinaus hat der Signalweg auch Einfluss auf die Expression von Proteinen der Zellzykluskontrolle, der Zelldifferenzierung und Apoptose (Berg & Baltimore 1996; Van Antwerp et al. 1996; Pahl 1999), was seine bedeutende Rolle bei inflammatorischen Vorgängen verdeutlicht.

Medizinisch gesehen hat NF- $\kappa$ B eine zweiseitige Wirkung. Neben der Beteiligung an protektiven Immunreaktionen werden auch überschießende und eigentlich unerwünschte Entzündungsvorgänge in die NF- $\kappa$ B involviert ist, beobachtet, wie bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder auch im Bereich septischer Erkrankungen und Multiorganversagen (Visekruna et al. 2006; Liu & Malik 2006). Auch mit malignen Tumoren wird NF- $\kappa$ B häufig in Zusammenhang gebracht, da hier seine proliferationsfördernden und anti-apoptischen Wirkungen eine Rolle spielen (Zhou et al. 2007). Somit bietet dieser Transkriptionsfaktor in ganz besonderer und vielfältiger Weise Ansatzpunkte für Forschung in der Medizin.

### 1.2.2 Biochemische Struktur

Die Struktur betreffend handelt es sich bei NF- $\kappa$ B um ein Homo- oder Heterodimer, bestehend aus fünf Proteinen der Rel-Familie, wobei alle Kombinationen dieser Proteine existieren. Bei Säugern werden fünf dieser Rel Proteine exprimiert: RelA, c-Rel, RelB, p50 (NF- $\kappa$ B1) und p52 (NF- $\kappa$ B2). Das P50-RelA Heterodimer ist das Haupt NF- $\kappa$ B Dimer in vielen Zellen (Ghosh et al. 1998), wobei sich Heterodimere bevorzugt zwischen p50 oder p52 und einem der drei anderen Rel-Proteine ausbilden. Diese verfügen im Gegensatz zu ersteren über c-terminale Transaktivierungsdomänen. Da Homodimeren aus p50 und p52 eine solche Domäne fehlt, haben sie eine repressorische Wirkung auf die Transkription (Grundstrom et al. 2004).

Alle Proteine der NF- $\kappa$ B Familie haben als Gemeinsamkeit eine hochkonservierte n-terminale DNA-Bindungsdomäne, die so genannte Rel-Homologiedomäne (RHD), die etwa 300 Aminosäuren umfasst. Durch diese bilden sie Homo- und Heterodimere, die an eine Vielzahl von Ziel-DNA-Sequenzen, die so genannten  $\kappa$ B Sites, binden (Siebenlist et al. 1994; Gilmore 2006). Darüber hinaus sorgt die RHD für die nukleäre Translokation und die Bindung an inhibitorische Proteine (I $\kappa$ Bs). In den meisten Zellen liegen die NF- $\kappa$ B Komplexe, wie oben bereits erwähnt, inaktiv und vorwiegend im Zytoplasma, gebunden an ein inhibitorisches I $\kappa$ B Protein vor (Beg & Baldwin 1993; Ghosh & Karin 2002). Die I $\kappa$ Bs gehören auch zu einer Genfamilie die aus sieben bekannten Mitgliedern besteht: I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ , I $\kappa$ B- $\epsilon$ , I $\kappa$ B- $\gamma$ , BCL-3 und die REL-Vorläufer-Proteine p100 und p105 (Ghosh & Karin 2002).

### 1.2.3 Signaltransduktionskaskaden

NF- $\kappa$ B wird durch zelluläre Stresssituationen, wie sie durch inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1, bakterielle Abbauprodukte wie z.B. LPS, Hämorrhagie oder oxidativen Stress verursacht werden, induziert (Abraham 1996 + 2000). Die neuere Forschung hat ergeben, dass für NF- $\kappa$ B zwei strukturell und physiologisch unterschiedliche Signaltransduktionswege existieren: Der klassische und der alternative (Dixit & Mak 2002; Ghosh & Karin 2002; Pomeratz & Baltimore 2002; Gilmore 2006).

Die Gemeinsamkeit dieser Wege ist die Aktivierung des Schlüsselenzyms Inhibitor  $\kappa$ B Kinase (IKK). Diese Serinkinase ist ein großer Komplex, der aus drei

Untereinheiten besteht: IKK- $\alpha$  (IKK1), IKK- $\beta$  (IKK2) und IKK- $\gamma$ , auch Nf- $\kappa$ B essential Modulator (NEMO) genannt. IKK- $\alpha$  und IKK- $\beta$  sind die katalytischen Untereinheiten, während IKK- $\gamma$ /NEMO die regulatorische Untereinheit darstellt. (Ghosh & Karin 2002).

Die schon länger bekannte klassische Signalkaskade führt nach oben beschriebener Aktivierung zu einer Phosphorylierung von I $\kappa$ B durch IKK mit konsekutiver 26S-proteasomaler Degradation von I $\kappa$ B nach Polyubiquitinierung. Dieser Inhibitor sorgt im Ruhezustand der Zelle dafür, dass die NF- $\kappa$ B Dimere durch Bindung an ihn als inaktive Komplexe im Zytoplasma gehalten werden und nicht in den Kern translozieren (Beg & Baldwin 1993).

Diese Kaskade führt letztendlich dazu, dass NF- $\kappa$ B aktiviert (Abraham 1996+2000; Altavilla et al. 2001+2002-1) und frei wird, in den Zellkern transloziert und seinerseits zur Transkription bestimmter Zielgene führt. Dieser kanonische oder klassische Weg ist essentiell für das angeborene Immunsystem, wird durch alle bekannten proinflammatorischen Stimuli wie TNF- $\alpha$  oder LPS aktiviert und basiert hauptsächlich auf der Degradierung von I $\kappa$ Bs durch IKK- $\beta$  (Ghosh & Karin 2002).

Ein Großteil der frühen angeborenen Immunantwort ist von dem klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg abhängig, wie zum Beispiel die Produktion von antimikrobiellem Stickstoff und antimikrobieller Sauerstoffspezies (Hayden et al. 2006).

Der zweite alternative Signalweg wurde erst in jüngster Zeit entdeckt und ist, im Gegensatz zum klassischen Signalweg, hauptsächlich von IKK- $\alpha$  abhängig und hauptsächlich in die B-Zell-Reifung und in die Bildung von sekundär lymphatischen Organen, vor allem von Keimzentren, als Antwort auf Stimuli wie zum Beispiel auf zwei Mitglieder der TNF Zytokin Familie (RANK Blys/BAFF) involviert (Ghosh & Karin 2002).

#### **1.2.4 Die Rolle von TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle bei lokaler und systemischer Inflammation und ist ein potenter und sehr gut untersuchter Aktivator von NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B-Aktivierung als Antwort auf ein TNF- $\alpha$  Signal induziert unter anderem die Expression von antiapoptotischen Genen wie cIAP1 und 2 und Bcl-xL, die wiederum an Effektorkaspasen binden (Hayden et al. 2006). Molekularbiologisch ist TNF- $\alpha$  ein 17 kDa großes Zytokin, welches in aktivierten Makrophagen, Lymphozyten und

natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gebildet wird. Es existiert eine membranverankerte und eine lösliche Form.

Im Zusammenhang mit TNF $\alpha$  hat NF- $\kappa$ B eine eindeutige antiapoptotische Wirkung, da die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch TNF- $\alpha$  pro-apoptotische Vorgänge herunterreguliert. Die Supprimierung von Apoptose durch NF- $\kappa$ B ist somit eng verbunden mit TNF- $\alpha$  (Karin & Lin 2002).

Abschließend bleibt zu unterstreichen, dass TNF- $\alpha$  eine große Rolle bei Entzündungsvorgängen bis hin zur Sepsis oder dem multiplen Organ Dysfunktions Syndrom (MODS) spielt. In Tiermodellen zum MODS wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass ein erhöhter TNF- $\alpha$  Serumspiegel der Grund für Lungenschäden und proinflammatorische Genexpression ist (Chen 2003). Darüber hinaus konnte in einer aktuellen Studie gezeigt werden, dass Variationen des TNF- $\alpha$  Gens zu unterschiedlichen Ausprägungen der Sepsis führen (Menges et al. 2008).

#### **1.2.5 Die Rolle von NF- $\kappa$ B in der Sepsis**

Etlche Tiermodelle zeigen, dass es im Rahmen einer Sepsis zu einer gesteigerten Aktivierung von NF- $\kappa$ B kommt, wobei höhere Anreicherungsraten von NF- $\kappa$ B im Zellkern mit höheren Mortalitätsraten und schlechterem klinischen Outcome assoziiert sind (Blackwell et al. 2000; Shimohashi et al. 2000; Chang et al. 2001; Kato et al. 2002; Teoh et al. 2002; Abraham 2005).

Hier kristallisieren sich unter anderem zwei zentrale Mechanismen heraus, die bei der Sepsis im Bezug auf NF- $\kappa$ B eine Rolle spielen. Zum einen führt NF- $\kappa$ B zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Mediatoren, zum anderen verlängert er durch Förderung der Transkription antiapoptotischer Gene die Lebensspanne von bestimmten Zellpopulationen wie neutrophilen Granulozyten, die selbst wiederum proinflammatorische Moleküle produzieren und direkt an akuten Entzündungsvorgängen teilhaben (Ward et al. 1999; Kupfner et al. 2001; Abraham 2003).

Neure Erkenntnisse zeigen darüber hinaus, dass NF- $\kappa$ B auch in der Phase der Entzündungsauflösung eine Rolle spielt. So führt die Hemmung von NF- $\kappa$ B während dieser Phase zu einer Verlängerung des Entzündungsprozesses und verhindert eine schnelle Gewebeheilung (Lawrence 2001).

Unklar bleibt jedoch, ob die Aktivierung dieser Signalsysteme sich eher protektiv auswirkt oder permissiv das weitere Fortschreiten der pathologischen Vorgänge stützt.

### **1.2.6 Therapieansätze**

Vor diesem Gesamthintergrund und dem Wissen um die gewichtige Rolle von NF- $\kappa$ B in der Sepsis liegt die Überlegung nahe ein therapeutisches Konzept zu entwerfen, mit dem durch spezifische pharmakologische Blockade der NF- $\kappa$ B Signalkaskade eine Kontrolle der NF- $\kappa$ B-abhängigen proinflammatorischen Transkription erreicht werden könnte. Erste Ansätze, die NF- $\kappa$ B-Translokation in den Kern zu verhindern, um nicht nur die Exprimierung NF- $\kappa$ B abhängiger Gene zu vermindern, sondern auch eine Reduktion von MOF und Mortalität zu erreichen, existieren bereits. Im Tiermodell konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Hemmung von NF- $\kappa$ B Multiorganschäden verhindert und das Überleben beim septischen Schock verbessert (Liu & Malik 2006). Allerdings steckt die Forschung in diesem Bereich noch in den Kinderschuhen, da die pathogenetische Beteiligung dieses Signalweges im Rahmen von intensivmedizinischen Krankheitsbildern wie Sepsis/SIRS oder ARDS noch nicht so weit evaluiert ist, als dass Aussagen drüber getroffen werden könnten, was mit einer solchen Blockade erreicht werden würde. Im Gegenteil gestaltet sich, mit immer neuen Erkenntnissen der Forschung, die inflammatorische Interaktion dieser Signalkaskade zunehmend komplexer und vielschichtiger.

Beispielsweise existieren Studien mit Antioxidantien, die die nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B im Zusammenhang mit Sepsis zu unterbinden versuchen. Hier verringert die Therapie mit Antioxidantien die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die Exprimierung von NF- $\kappa$ B abhängigen Genen nach einer Endotoxinämie (Blackwell et al. 1996; Liu et al. 1997; Altavilla et al. 2002-2). Auch zellpermeable Peptide, welche die nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B blockieren, sind beschrieben (Fujihara et al. 2000). Ebenso wurde bereits ischämie- und reperfusioninduzierter Gewebeschaden im Myokard (Sawa et al. 1997) und im Intestinum (Zou et al. 2003) durch selektive Inhibierung der NF- $\kappa$ B Aktivität verringert. Zusätzlich wurde erfolgreich im Tiermodell gezeigt, dass die systemische oder lokale Gabe von p65 Antisens-Oligonukleotiden eine experimentelle Colitis bei Mäusen verhindert

(Neurath et al. 1996). Die rektale humane Therapie wird momentan im Rahmen von Studien untersucht.

### **1.2.7 NF- $\kappa$ B Aktivitätsbestimmung**

Es existieren viele Methoden die NF- $\kappa$ B Aktivität zu bestimmen. Als führend in der NF- $\kappa$ B Aktivitätsbestimmung gilt zurzeit der „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA), der auch in der vorliegenden Studie angewendet wurde. Dieses Verfahren wurde in einer vorangehenden Dissertation, welche das EMSA-Verfahren an gesunden Probanden etablierte, als Goldstandard zur NF- $\kappa$ B Bestimmung bestätigt (Cordes 2008).

Erfasst wird bei dem EMSA-Verfahren die Bindung von Transkriptionsfaktoren an DNA. Die zu untersuchenden Proteine werden mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden spezifischer DNA-Sequenzen inkubiert. Die hierbei entstehenden Komplexe werden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und somit als Banden sichtbar gemacht. Als Referenz- bzw. Standardgröße wird bei verschiedensten Studien zusätzlich zu NF- $\kappa$ B noch die Aktivität des Nukleären Faktors  $\gamma$  (NF- $\gamma$ ) bestimmt, der als ein konstitutiv exprimierter Transkriptionsfaktor die „transkriptive Grundaktivität“ darstellen soll und als Ladungskontrolle dient.

NF- $\gamma$  (auch CBF oder CP1 genannt) wurde zunächst als Nukleärer Faktor in B-Zellen von Mäusen charakterisiert, der mit CCAAT Motiven der MHC Klasse II Promotoren interagiert (Dorn et al. 1987). Mittlerweile ist klar, dass NF- $\gamma$  ubiquitär exprimiert wird und mit vielen CCAAT Motiven von konstitutiven und aktivierungsabhängigen Genen interagiert (Dorn et al. 1987; Hatamochi et al. 1988; Montovani 1998; Sankar & de Crombrughe 1998). Das Interessante an NF- $\gamma$  ist sein ubiquitäres Vorkommen und seine nicht durch äußere Faktoren induzierte, sondern kontinuierliche Grundaktivität in den Zellen. Dies lässt ihn zum Vergleichsmolekül für viele Untersuchungen avancieren, die die Aktivität ähnlicher Faktoren separat untersuchen und dabei die Grundaktivität als Ladungskontrolle verwenden. Mit dieser Intention wird er auch in der vorliegenden Studie eingesetzt.

### **1.3 Klinische Scores**

Seit etwa einem Vierteljahrhundert wurden verschiedene Klassifizierungssysteme entwickelt, um die Prognose, das Mortalitätsrisiko und das Outcome von

Intensivpatienten abschätzen und auch die Effizienz verschiedener Intensivstationen, die Validität neuer Therapieformen oder die Nutzung von Krankenhausressourcen untereinander vergleichen zu können. Hierunter zum Beispiel 1981 der „Acute Physiology and Chronic Health Evaluation Score“ (APACHE) (Knaus et al. 1981), 1984 der „Simplified acute Physiology Score“ (SAPS) (Le Gall et al. 1984) und 1985 der APACHE II Score (Knaus et al. 1985) und 1993 der SAPS II Score (Le Gall et al. 1993). In der vorliegenden Studie werden zur Beobachtung des klinischen Verlaufs der Patienten zwei Scores erfasst: Der APACHE II und der SAPS II Score.

### **1.3.1 APACHE II**

Der APACHE II Score ist ein System zur Klassifizierung des Schweregrades von Krankheiten. Er bedient sich dabei eines Punktesystems mit einer Skala von 0 - 68, das auf den Werten von 12 physiologischen Routinemessungen, dem Alter und dem zugrunde liegenden Gesundheitsstatus basiert. Durch ihn wird es unter anderem möglich, akut kranke Patienten anhand des Sterberisikos zu stratifizieren. Die Validierungsstudie von 1985 zeigte einen signifikanten Anstieg der Todesrate für jede Zunahme des Scores um fünf Punkte (Knaus et al. 1985).

Die von den Autoren vorgesehenen Anwendungen des APACHE II Scores beinhalten vor allem folgende Punkte: Indem eine Messung des Schweregrades einer Krankheit ermöglicht wird, hilft der Score festzulegen ob Kontroll- und Behandlungsgruppen gleich sind. Außerdem soll der Score dabei helfen, über die Notwendigkeit eines Intensivaufenthaltes zu entscheiden und den Nutzen einer Intensivtherapie festzustellen. Darüber hinaus ermöglicht APACHE II eine systematische Evaluierung, wie ein individueller Schweregrad einer Krankheit das Outcome des Patienten beeinflusst. Somit ist dieser Score ein gutes Instrument, wenn klinische Entscheidungen getroffen werden müssen.

Viele Nachfolgestudien haben ebenfalls den APACHE II Score als valide evaluiert (Oh et al. 1993; Wong et al. 1995; Chiavone & Sens 2003), wobei öfter auffiel, dass die in diesen Studien beobachteten Sterberaten höher waren, als die von dem Score vorhergesagte Wahrscheinlichkeit (Markgraf et al 2000; Chiavone & Sens 2003).

### **1.3.2 SAPS II**

Um den 1984 entworfenen „Simplified Acute Physiology Score“ (SAPS) zu vereinfachen und zu verbessern, entwickelten Le Gall et al. 1993 den SAPS II, der in etwa die gleichen Anwendungspunkte abdeckt wie der APACHE II Score. Als Hauptziel sollte auch anhand dieses Scores die krankenhausbezogene Mortalitätswahrscheinlichkeit von Intensivpatienten vorhergesagt werden können. Letztendlich wurden in diesen neuen Score 17 Variablen eingeschlossen: 12 physiologische Parameter, das Alter, der Aufnahmegrund und drei Variablen, die schwerwiegende Grunderkrankungen erfassen. Anhand dieser Variablen errechnet sich der Punktwert des Scores, der zwischen 0 und 163 rangiert und auch positiv mit dem Mortalitätsrisiko korreliert. Nach erfolgreicher Reliabilitäts- und Validitätsprüfung durch die Initialstudie kann man anhand des SAPS II das Sterberisiko abschätzen ohne aufwendige Primärdiagnostik zu betreiben (Le Gall et al. 1993): Die Datenerfassung, die zur Generierung dieses Scores notwendig ist, ist dabei leicht und schnell und erfordert keine speziellen Untersuchungsmaßnahmen. Er gilt als der einfachste Intensivscore für Mortalitätswahrscheinlichkeiten (Le Gall et al. 1993; Capuzzo et al. 2000; Aegerter et al. 2005), wobei er die Mortalität nicht immer exakt vorherzusagen scheint (Moreno et al. 1998; Markgraf et al. 2000).

Werden SAPS-II und APACHE-II verglichen hat APACHE II derjenige zu sein, der die bessere Güte der Anpassung und eine besser Kalibrierung hat und somit auch die Mortalitätswahrscheinlichkeit genauer bestimmt (Del Vufalo et al. 1995; Markgraf et al. 2000). Alles in allem sind beide Klassifizierungssysteme jedoch sehr gut validierte intensivmedizinische Scores, die schnell und leicht zu handhaben sind und schon länger ihren festen Platz im Alltag der Intensivstationen gefunden haben.

### **1.5 Referenzstudien**

Der Stellenwert von NF- $\kappa$ B bei kritischer Erkrankung ist Gegenstand einer Vielzahl von Untersuchungen am Tiermodell genauso wie am Menschen.

### 1.5.1 Tiermodell

Studien an Tieren zeigen übereinstimmend, dass Prozesse wie Ischämie/Reperfusion, Endotoxämie und Bakteriämie, wie sie auch im Verlauf großer chirurgischer Eingriffe auftreten können, zur Aktivierung des IKK/ NF- $\kappa$ B-Systems führen (Blackwell et al. 2000; Shimohashi et al. 2000; Chang et al. 2001; Kato et al. 2002; Teoh et al. 2002). Ferner ist im Tiermodell ein Zusammenhang zwischen Sepsis, ARDS und MOF mit einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B nachgewiesen (Armstead et al. 1993; Shenkar et al. 1998; Williams et al. 1999; Abraham 2000; Gjertsson et al. 2001).

Lawrence et al. zeigten 2001 noch eine mögliche andere Rolle von NF- $\kappa$ B in Entzündungsprozessen auf. Einerseits fanden auch sie, wie schon viele vor ihnen, dass aktiviertes NF- $\kappa$ B aus Leukozyten, die man in der Frühphase von Entzündungsreaktionen isoliert hatte, über positive Rückkopplungsmechanismen und andauernde Transkription proinflammatorischer Gene die Inflammation unterhält oder gar weiter aufschaukelt. Allerdings konnten sie als Novum nachweisen, dass es im weiteren Verlauf auch zur Induktion antiinflammatorischer Gene und Apoptose durch NF- $\kappa$ B kommt, wodurch dieser Faktor auch an der Auflösung einer inflammatorischen Reaktion entscheidend beteiligt zu sein scheint (Lawrence et al. 2001).

Auch eine Studie im Mausmodell von Chen et al. 2003 über Ischämie und Reperfusion bei MODS zeigt diese Zweiseitigkeit von NF- $\kappa$ B. Wird die Aktivität von NF- $\kappa$ B in Enterozyten blockiert, können dadurch extraintestinale, systemische Entzündungsvorgänge reduziert werden, gleichzeitig wird allerdings die antiapoptotische Eigenschaft des Signalwegs ebenfalls unterdrückt, woraus ein verringertes Zellüberleben und eine Verstärkung der lokalen Schäden resultiert (Chen et al. 2003).

Es ist nicht endgültig geklärt, ob sich eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B in der Summe eher protektiv auswirkt (Kramer et al. 1999; Fryer et al. 2001; Gjertsson et al. 2001) oder permissiv das weitere Fortschreiten der pathologischen Vorgänge stützt (Gu et al. 2001; Kato et al. 2002). So ist die Supprimierung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B einerseits mit einer erhöhten bakteriellen Belastung im Mäusesepsismodell assoziiert (Gjertsson et al. 2001), andererseits kann sie abhängig vom verwendeten Tiermodell auch die Mortalität senken (Adib-Conquy et al. 2000).

Eine Studie am Tiermodell aus dem Jahr 2004 von Gadjeva et al. geht hier ins Detail und zeigt, dass die NF- $\kappa$ B Untereinheiten p50 und p65 wichtige inhibierende Funktionen während der systemischen Entzündungsantwort haben (Gadjeva et al. 2004).

Alles in allem erlauben die Tiermodelle keine eindeutige Aussage über die Wertigkeit der einzelnen Signalwege für die Prognose bzw. die Entstehung von Sepsis und Organversagen beim Menschen. Einige Studien zeigen auch, dass Ergebnisse aus Versuchen in Vitro und am Tiermodell nicht uneingeschränkt auf den Menschen extrapoliert werden können (Abraham et al. 1995; Christman et al. 1998). Dies macht eine Überprüfung am Menschen unumgänglich.

#### **1.4.2 Patientenstudien**

Neuere klinische Studien am Menschen zeigen ebenfalls, dass eine exzessive Steigerung der Aktivität von NF- $\kappa$ B während SIRS und Sepsis mit einer erhöhten Mortalität und einem schlechteren klinischen Outcome einherzugehen scheint (Böhrer et al. 1997; Arnalich et al. 2000; Paterson et al. 2000). Der prädikative Wert entsprach hierbei bei einigen Studien dem APACHE II Score (Böhrer et al. 1997; Arnalich et al. 2000).

Diesen Zusammenhang beim Menschen nachzuweisen, gelang erstmals Böhrer et al. 1997 mit einer Studie, in der die NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von 15 Sepsispatienten bestimmt wurde. Der Anstieg der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität korrelierte hierbei mit einem schlechten klinischen Outcome und erhöhter Mortalität. Zudem war der prädikative Wert von NF- $\kappa$ B vergleichbar mit dem prädikativen Wert des APACHE II Scores (Böhrer et al. 1997).

Mit ähnlicher Intention und auch vergleichbarem Ergebnis untersuchten Arnalich et al. im Jahre 2000 den prognostischen Vorhersagewert von kombinierten Messungen der NF- $\kappa$ B Aktivität in peripheren Blutzellen und dem Zytokinprofil im Plasma bei 34 Patienten mit schwerer Sepsis. Durch frühe Messungen der NF- $\kappa$ B Aktivität, wollten sie diese als Prognosefaktor für das Outcome bei Sepsis evaluieren, der dann ein potentielles Unterscheidungskriterium einer schweren von einer weniger schweren Sepsis darstellen könnte (Arnalich et al. 2000).

Ebenso wie zuvor bei Böhrer et al. war auch in dieser Studie bei den nicht-überlebenden Patienten die NF- $\kappa$ B Aktivität signifikant erhöht und korrelierte stark

mit dem Schweregrad der Krankheit entsprechend dem APACHE II Score. Allerdings konnte keine Korrelation der NF- $\kappa$ B Aktivität mit dem Zytokinprofil festgestellt werden. Somit scheint diese Studie zu zeigen, dass die Messung der NF- $\kappa$ B Aktivität in einer einzigen Blutprobe zu Studienbeginn einen besseren Vorhersagewert im Bezug auf Mortalität und klinischen Outcome hat, als das Gleichgewicht und der zeitliche Verlauf von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen.

Ebenfalls im Jahre 2000 bedienten sich Paterson et al. eines mit den beiden oben genannten Studien vergleichbaren Ansatzes, um die NF- $\kappa$ B Aktivität bei Intensivpatienten zu bestimmen, die kurz vor dem Tod standen. Hierbei bestimmten sie die NF- $\kappa$ B Aktivität bei 10 Intensivpatienten mit SIRS.

Wie auch zuvor bei Böhler und Arnalich et al. war die NF- $\kappa$ B Aktivität in PMNCs bei SIRS-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden signifikant höher. Bei den Patienten, die die 96 Stundenmarke überlebten, blieb die NF- $\kappa$ B Aktivität in PMNCs konstant. Bei den Patienten hingegen, die vor Ablauf der 96 Stunden starben, konnte hier ein deutlicher Anstieg festgestellt werden. Noch kurz vor dem Tod war die Aktivität signifikant höher, als bei denen die die 96 Stunden überlebten. Die Zytokinkonzentrationen von IL-6, IL-8 und sICAM1 zeigten wie auch bei Arnalich et al. keine Verbindung zur NF- $\kappa$ B Aktivität. Zudem war kein Unterschied zwischen den beiden „Gruppen“ im initial erfassten APACHE II Scorewert zu erkennen, was der „Böhler-Studie“ widerspricht (Paterson et al. 2000). Aber es konnte tatsächlich ein deutlicher Anstieg der NF- $\kappa$ B Aktivität in PMNCs vor dem Tod nachgewiesen werden, was auf ein Neues die prognostische Aussagekraft dieses Parameters im Bezug auf die Mortalität unterstreicht.

Vor dem Hintergrund, dass systemische Entzündungsvorgänge die Apoptose neutrophiler Granulozyten hemmen und zu Multiorganversagen führen können, stellten Nolan B. et al. ebenfalls im Jahr 2000 die Hypothese auf, dass ein schweres Trauma eine Dysregulation der Neutrophilen-Apoptose verursachen könne. Untersucht wurde dieser Ansatz mittels NF- $\kappa$ B Aktivierungsbestimmung und Apoptosequantifizierung in neutrophilen Granulozyten von Traumapatienten und gesunden Kontrollen (Nolan et al. 2000).

Hier konnte gezeigt werden, dass tatsächlich eine NF- $\kappa$ B abhängige Hemmung der Apoptose neutrophiler Granulozyten nach einem Trauma auftritt und darüber hinaus noch von der Größe des Traumas abhängt. Zudem korrelierte die

Neutrophilen-Apoptose mit dem MODS und dem APACHE II Score. Ebenso lässt sich aus diesen Daten herauslesen, dass eine stärkere NF- $\kappa$ B abhängige Hemmung der Apoptose die Entstehung von MOF vermindern kann.

Ähnliche Beobachtungen einer traumabedingten „Immunparalyse“ wurden noch in weiteren Studien gemacht. Adib-Conquy et al. stellten bei der Aktivierung von PMNCs bei Traumatpatienten eine ähnliche NF- $\kappa$ B Expression wie bei einer LPS-Toleranz fest, was sie ein Jahr später in einer Nachfolgestudie bestätigten (Adib-Conquy et al. 2000 + 2001).

Die Studie, die der hier vorliegenden wohl am nächsten kommt, ist die 2001 von Foulds et al. durchgeführte Untersuchung an Patienten mit chirurgischer Versorgung von thorako-abdominalen Aortenaneurysmen. Ebenso wie für das vorliegende Projekt bereits erläutert, diente in dieser Studie das große operative Trauma als Modell für ein systemisches Entzündungsgeschehen.

Bereits 1997 war es Foulds et al. gelungen bei Patienten die an einem thorako-abdominalen Aortenaneurysma operiert wurden, die intraoperative Neutrophilenaktivierung als Marker für postoperative Komplikationsentstehung festzumachen (Foulds et al 1997).

2001 untersuchten sie vor diesem Hintergrund das perioperative NF- $\kappa$ B Profil bei 25 Patienten mit thorako-abdominaler Aortenaneurysma-Rekonstruktion. Präoperativ wurden im Bezug auf klinische Parameter keine Unterschiede zwischen den Patienten, die im Nachhinein ein MODS entwickelten und denen, die dies nicht taten, festgestellt. Signifikante Unterschiede gab es jedoch bei den präoperativen Konzentrationen von NF- $\kappa$ B in diesen beiden Patientengruppen. Ebenso waren signifikante präoperative Unterschiede zwischen Patienten, die überlebten und denen die starben, zu beobachten (Foulds et al. 2001).

Somit sind erhöhte präoperative Konzentrationen von NF- $\kappa$ B in neutrophilen Granulozyten mit vermehrten postoperativen Komplikationen in Form von MOF assoziiert und könnten als potentieller präoperativer Marker für das postoperativen Outcome dienen.

Die neueste klinische Studie in diesem Bereich stammt aus dem Jahre 2006 von Abraham et al. und beleuchtet das ganze Thema von einer anderen Seite.

Bereits 2003 war es gelungen zu zeigen, dass frühe Veränderungen im Aktivierungsmuster von neutrophilen Granulozyten und hier vor allem die Fähigkeit

NF- $\kappa$ B im Kern zu akkumulieren den klinischen Verlauf bei Sepsis-induziertem, akutem Lungenschaden beeinflussen (Yang et al 2003).

Unklar war hierbei jedoch, ob diese verstärkte Akkumulation von NF- $\kappa$ B im Zellkern auf genetisch determinierte Charakteristika zurückzuführen ist oder ob solche Vorgänge lediglich eine größere in Vivo Inflammation reflektieren. Um dieser Frage nachzugehen, legt die Studie von 2006 ihr Augenmerk vornehmlich auf Aktivierungsmuster in neutrophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut und zeigt eine Assoziation zwischen diesen Mustern und einer Entzündungsantwort der Lunge auf LPS.

Anhand LPS-induzierter NF- $\kappa$ B DNA Bindung konnte hier gezeigt werden, dass Unterschiede in der Antwort der neutrophilen Granulozyten selbst eine wesentliche Rolle im Bezug auf den Schweregrad einer Entzündungsantwort spielen. Darüber hinaus wurde bewiesen, dass stabile Phänotypen von neutrophilen Granulozyten existieren und mit der Entzündungsantwort, die der direkten LPS Exposition in der Lunge folgt, korrelieren. Somit scheint es das zugrunde liegende Zellprofil zu sein, welches primär das klinische Outcome bestimmt (Abraham et al. 2006).

Das Wissen um die Existenz stabiler neutrophiler Phänotypen, die mit Entzündungsreaktionen assoziiert sind, impliziert viele neue diagnostische und therapeutische Ansatzpunkte, die noch weiter erforscht werden müssen.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Patientenstudien folgern, dass eine erhöhte NF- $\kappa$ B Aktivität bei Sepsispatienten oder Patienten mit schwerem chirurgischem Trauma, mit schlechtem klinischen Outcome oder erhöhter Mortalität einherzugehen scheint (Böhrer et al. 1997; Arnalich et al. 2000; Paterson et al. 2000; Foulds et al. 2001). Darüber hinaus scheint bei einigen Studien eine Korrelation zwischen der NF- $\kappa$ B Aktivität und dem APACHE II Score zu bestehen (Böhrer et al. 1997; Arnalich et al. 2000). Allerdings muss unterstrichen werden, dass sich alle Studien in wichtigen Punkten der Methodik voneinander unterscheiden und somit nicht von einer Studie auf die andere geschlossen werden kann. Allein die NF- $\kappa$ B Aktivitätsbestimmung ist in jeder Untersuchung unterschiedlich. So setzen Böhrer et al. hier die Aktivität in prozentuale Relation zu Tag eins, während Arnalich et al. die Aktivität als Prozentsatz einer gesunden Kontrolle angeben und Paterson et al. diese als

Fraktion eines vorstimulierten Standardkernisolates angeben. Nolan et al. verwenden im Gegensatz zu diesen Studien kein EMSA-Verfahren, sondern arbeiten mit Westernblots, während Foulds et al. sich der FACS Analyse bedienen. Darüber hinaus unterscheiden sich alle Studien im Erfassungszeitraum. Während Nolan et al. lediglich einmalig posttraumatisch die NF- $\kappa$ B Bestimmung durchführten, bestimmten Foulds et al. diese präoperativ und zu mehreren festen Zeiten intraoperativ. Arnalich et al. führten hingegen Messungen innerhalb von 24 Stunden durch, während bei Paterson et al. mehrere Bestimmungen innerhalb von 72 Stunden durchgeführte wurden. Den längsten Erfassungszeitraum findet man bei Böhler et al., die innerhalb von 14 Tagen neun Erhebungen durchführten. Auch die Fallzahlen und statistischen Verfahren unterscheiden sich in jeder Studie. Somit ist deutlich, dass anhand dieser Untersuchungen keine eindeutigen Aussagen getroffen werden können und hier eigentlich zunächst eine Standardisierung zur NF- $\kappa$ B Bestimmung hätte durchgeführt werden müssen. Vor diesem Hintergrund sollen nun in dem vorliegenden Projekt nach stattgefundener Evaluation der Methodik in einer vorangegangenen Dissertation (Cordes 2008) ähnliche Untersuchungen, wie in den oben beschriebenen Studien, an Patienten durchgeführt werden.

### **1.6 Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung**

Am Beispiel der IKK/NF- $\kappa$ B Signaltransduktionskaskade soll mittels des vorliegenden Projektes qualitativ und quantitativ untersucht werden, ob eine Aktivierung zellulärer Signalwege in Leukozyten aus dem peripheren Blut stattfindet. Eine Korrelation mit dem klinischen Verlauf bei Patienten mit großen operativen Eingriffen soll evaluiert werden.

Dabei wird hier allerdings nicht nur, wie in vielen vorangehenden Studien, die alleinige NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität bestimmt, die immer nur eine ungenaue Momentaufnahme des zellulären Geschehens widerspiegelt. Stattdessen liegt der Fokus hier auch auf der NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität, anhand derer eine präzisere Aussage über den tatsächlichen pathophysiologischen Stellenwert dieser Signalkaskade bei kritischen Erkrankungen getroffen werden könnte.

Patienten mit schweren, elektiven gefäßchirurgischen Eingriffen und folglich hohem postoperativen Risiko eine systemische Inflammation zu entwickeln, wurde

im Rahmen einer prospektiv-deskriptiven laborchemischen Untersuchung präoperativ, intraoperativ und zu mehreren definierten postoperativen Tagen zur Bestimmung des Aktivierungsgrades der genannten Signalwege Vollblut entnommen. Das schwere chirurgische Trauma dient als Modell der systemisch ablaufenden pathophysiologischen Vorgänge, wie sie zum Beispiel beim SIRS nicht-infektiöser Genese ablaufen. Die Kontrollgruppe besteht aus Patienten mit weniger invasiven operativen Eingriffen an der Arteria Carotis. Dies erlaubt die Unterscheidung von bagatelltrauma-assoziierten Effekten einerseits von Vorgängen, die bei schwer traumatisierenden operativen Eingriffen und SIRS von Bedeutung sind andererseits.

Ziel ist es, einem frühzeitigen „inflammatorischen Monitoring“ durch die Korrelation der Aktivierung dieses Signalwegs mit üblichen klinischen Parametern näher, oder gar zuvorzukommen, also die präoperative NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität ex-vivo als prädikativen Parameter für die postoperative Inflammationsreaktion zu evaluieren. Demnach könnte eine erhöhte Aktivierungskapazität mit einem schwereren inflammatorischen Verlauf einhergehen. Umgekehrt könnte eine reduzierte Aktivierungskapazität mit einer erhöhten Infektionsrate einhergehen.

Vor allem im Hinblick auf die Anstrengungen der pharmazeutischen Industrie, stressinduzierbare Signalwege therapeutisch zu beeinflussen, ist die Untersuchung des pathophysiologischen Stellenwertes spezifischer molekularer zellulärer Signaltransduktionskaskaden bei Patienten mit großem chirurgischen Trauma unumgänglich. Nur bei funktioneller Beteiligung eines Signalweges an der Ausbildung einer Erkrankung ist mit einem therapeutischen Erfolg durch dessen spezifische Blockade oder Modulation zu rechnen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie soll nun auf folgende Fragestellungen eingegangen werden:

Bestehen Unterschiede hinsichtlich Zeitpunkt, Ausmaß und Dauer der Veränderung der Bindungsaktivität und der Aktivierungskapazität von NF- $\kappa$ B in mononukleären Zellen, bei Patienten mit schwerem und leichtem chirurgischen Trauma?

Besteht ein Zusammenhang zwischen prä- und/oder postoperativer Aktivierung von NF- $\kappa$ B mit dem postoperativen klinischen Verlauf (APACHE-II-Score, SAPS-II)

und dem postoperativen Verlauf von inflammatorischen Parametern (CRP, Leukozyten)?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, falls nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Biochrom, Bio-Rad, BD Bioscience, Milteny, Santa Cruz und Sigma bezogen.

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnummer</b>
Acrylamid-Bis 29:1 40%	<i>Serva</i>	10680
Aqua B. Braun	<i>Braun</i>	75/12604052/0503
Biocoll Separating Solution	<i>Biochrom AG</i>	L6115
Bio-Rad Protein Assay	<i>Bio-Rad</i>	500-0006
BSA für Biorad Assay	<i>Pierce</i>	23209
dNTP 10mM Mix C114 B	<i>Promega</i>	6250706
DTT	<i>Sigma</i>	D-9779
EDTA Dinatrium Dihydrat	<i>AppliChem</i>	A3553.0500
PBS	<i>GIBCO Invitrogen</i>	14190
RPMI 1640 Medium	<i>GIBCO Invitrogen</i>	42401-018
S-Monovette (Heparin)	<i>Sarstedt</i>	01.1604
S-Monovette (EDTA)	<i>Sarstedt</i>	05.1167
S-Monovette (Citrat)	<i>Sarstedt</i>	05.1071
TEMED	<i>Sigma</i>	T-8133
Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ (human, rekombinant)	<i>Sigma</i>	T6674
QIAquick Nucleotide Removal Kit	<i>Qiagen</i>	28304

#### 2.1.2 Lösungen

**TBE 0,5 fach:** 45 mM Tris-Cl; 45 mM Na-Borat; 1 mM EDTA pH 8,0

**Zellkulturmedium:** RPMI 1640 Medium, 10% FCS

**Lysepuffer (1 fach):** 50 mM Tris-HCl pH 7,6; 250 mM NaCl; 3 mM EDTA; 3 mM EGTA; 1% Triton-X-100; 0,5% NP 40; 10% Glycerol; Protease-Inhibitoren ( $\beta$ -Glycerolphosphat 2 mM; DTT 2mM; Leupeptin 10 $\mu$ M; Natriumorthovanadat 0,1 mM; pNPP = p-Nitrophenyl Phosphate 2mM)

**EMSA-Puffer:** 10 mM Hepes; 50 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10 % Glycerol

**Fixierlösung:** 15 % Methanol; 5 % Eisessig; 5 % Glycerol in Aqua bidest

### **2.1.3 Oligonukleotide**

<b>Oligonukleotid</b>	<b>Hersteller</b>
NF- $\kappa$ B HIV site (Labeln)	<i>Invitrogen</i>
NF- $\kappa$ B consensus HIV site (spezifisches Oligonukleotid, ohne $^{32}$ P gelabelt)	<i>Invitrogen</i>
NF- $\gamma$ consensus (spezifisches Oligonukleotid, ohne $^{32}$ P gelabelt)	<i>Biomers</i>

## **2.2 Methodik der NF- $\kappa$ B Bestimmung**

### **2.2.1 Isolation von mononukleären Zellen mittels Ficoll**

Die so genannte Ficoll Dichtegradientenzentrifugation macht es möglich die zellulären Blutbestandteile, insbesondere die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PMNCs), nach ihrer Dichte aufzutrennen und zu isolieren. Entsprechend ihrer spezifischen Dichte sammeln sich dabei die Lymphozyten und Monozyten, sichtbar als deutlicher Ring, in der Interphase zwischen einem Überstand aus Plasma, Thrombozyten und Ficoll an, während die Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Gefäßes als Unterphase sedimentieren.

Das abgenommene und mit Heparin antikoagulierte Vollblut wurde sofort nach der Abnahme auf Eis gelagert und während den gesamten nachfolgenden Verarbeitungsschritten auf Eis beziehungsweise in einer 4°C kalten Zentrifuge

gekühlt. Das heparinisierte Vollblut wurde zunächst im Verhältnis 1:2 mit einfach PBS verdünnt. Jeweils fünf bis sieben ml des verdünnten Blutes wurde anschließend sorgsam auf fünf ml Ficoll in einem 15 ml Falcon geschichtet und anschließend für 22 Minuten bei 420 gE zentrifugiert. Somit ergab sich die oben beschriebene Dreischichtung in Ober-, Inter-, und Unterphase.

Nach Asservierung des Plasmas der Oberphase zur weiteren Zytokinanalyse wurde die Interphase behutsam bis zur Ficollgrenze abgenommen. Durch zwei folgende Waschschrte mit PBS für sieben Minuten bei 270 gE konnten die Thrombozyten und das Ficoll weitestgehend beseitigt werden.

Die gewonnenen Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt, in deren Vertiefung bei aufgelegtem Deckglas ein definiertes Volumen umschlossen wird.

Unter dem Mikroskop wurden 4 x 16 Quadrate ausgezählt und die Zellkonzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Mittelwert aus den 4 großen Quadraten} \\ \times \text{verwendetes Volumen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000.$$

### 2.2.2 Stimulation

Die aufgereinigten mononukleären Zellen wurden nach Bestimmung der Zellzahl in einem RPMI-Medium inkubiert, wobei sie zur Hälfte mit humanem TNF- $\alpha$  (*Sigma*) stimuliert wurden, während die andere Hälfte als unstimulierte Kontrolle mit demselben Medium versetzt wurde. Um eine optimale NF- $\kappa$ B Aktivierung zu erreichen wurden jeweils  $4 \times 10^6$  Zellen in einem ml Medium mit 10 ng TNF- $\alpha$  für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Durch Voruntersuchungen in einer dieser Studie vorangehenden Dissertation (Cordes 2008) ergaben sich diese optimalen Stimulationsbedingungen. Dabei wurden zum einen verschiedene Stimulationsdauern als auch unterschiedliche TNF- $\alpha$  Konzentrationen auf ihre NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität hin untersucht.

### 2.2.3 Gesamtzelllysat

Die inkubierten Zellen wurden mit PBS durch Zentrifugation einmal gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Zellen wurden für mindestens 40 Minuten auf Eis mit einfach konzentriertem Lysepuffer lysiert.

Anschließend wurde das Lysat 35 Minuten bei 20000 gE und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet aus Zellresten verworfen.

Der Überstand enthielt alle Proteine der Zelle und wurde bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

#### 2.2.4 Proteinbestimmung

Um in den so gewonnen Proteinisolaten eine einheitliche Proteinkonzentration zu erhalten, wurden die Proteine, nach photometrischer Konzentrationsbestimmung des Gesamtzelllysates mittels Biorad Protein-Assay, auf eine Konzentration von 10 µg pro 5 µl EMSA-Puffer entsprechend 2 mg/ml mit einer Toleranz von 5% eingestellt.

Die absolute Proteinkonzentration einer unbekanntem Lösung erhält man mit dem Biorad Protein-Assay, indem man zuvor eine Messreihe mit einem Protein bekannter Konzentration durchführt. In diesem Falle wurde hierfür BSA von der Firma Pierce verwendet. Das Verfahren basiert auf der Beobachtung, dass das Absorptionsmaximum für eine saure Lösung von Coomassie Brilliant Blue G-250 nach Bindung an ein Protein von 465 nm (braun) nach 595 nm (blau) verschoben wird. Die Amplitude der Absorption bei 595 nm ist zu der Proteinmenge in einem großen Bereich direkt proportional. Die Proteinverdünnungen wurden ebenfalls bei -80°C aufbewahrt.

#### 2.2.5 Radioaktive Markierung der Oligonukleotid-Sequenzen

##### Oligonukleotid für NF-κB:

Für das EMSA Verfahren benötigt man ein radioaktiv gelabeltes Oligonukleotid, welches die spezifische Erkennungssequenz der NF-κB Familie aufweist. Hierbei wurde in die neu synthetisierte DNA das Isotop Phosphor <sup>32</sup>P als α<sup>32</sup>P-Cytosintriphosphat zusammen mit den übrigen unmarkierten Nukleotiden eingebaut. Es wurde die folgende NF-κB Sequenz verwendet:

##### Oligosequenz (HIV κB - Site) (Invitrogen):

**sense:** 5' GGATCCTCAACAGAGGGGACTTTCCGAGGCCA 3'

**reverse:** 5' GGATCCTGGCCTCGGAAAGTCCCCTCTGTTGA 3'

In einem ersten Schritt mussten die beiden Einzelstränge zunächst annealed, also miteinander verbunden werden. Dazu wurden die Ursprungsoligonukleotide in einer Konzentration von 1 µg/µl in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) gelöst. Jeweils 10 µl Oligonukleotide wurden auf 100 µl H<sub>2</sub>O aufgefüllt (10 µl sense Einzelstrang + 10 µl reverse Einzelstrang + 80 µl H<sub>2</sub>O), anschließend im Wasserbad auf 94°C erhitzt und dann langsam im ausgeschalteten Wasserbad auf Raumtemperatur heruntergekühlt.

Zur Markierung wurde Klenow als verkürzte DNA-Polymerase I verwendet, welche in der Lage ist 3' Enden von DNA-Fragmenten aufzufüllen, indem es die 5' Überhänge als Matrize nutzt. Dieser Schritt war notwendig, da die doppelsträngigen NF-κB Oligonukleotide Überhänge aufwiesen. Für das Reaktionsgemisch wurde 1 µl doppelsträngiges Ursprungsoligonukleotid zusammen mit je 0,5 mM unmarkiertem dATP, dGTP und dTTP sowie 5 µl radioaktiv markiertes α<sup>32</sup>P-CTP (entspricht 50µCi) mit 0,5 µl Klenow in 2 µl Eco Pol Puffer auf 20 µl H<sub>2</sub>O aufgefüllt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (25°C) inkubiert.

Um abschließend die Radioaktivität überprüfen zu können, wurden im Anschluss daran die neu synthetisierten Oligonukleotide mittels QIAquick Nucleotide Removal Kit (*Qiagen*) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

#### **Oligonukleotid für NF-γ:**

Das radioaktiv markierte Oligonukleotid der spezifischen NF-γ Erkennungssequenz wurde in etwas abgewandelter Weise hergestellt. Hierbei wurde das Isotop Phosphor <sup>32</sup>P im Gegenzug als γ<sup>32</sup>P-Adenosintriphosphat zur Markierung eingebaut. Von der Firma Biomers wurde als Ursprungsoligonukleotid die folgende NF-γ Sequenz verwendet:

#### **Oligosequenz NF-γ (Biomers):**

**sense:** 5' CCAAACCTCGCCAGAACCAATCAGAAAA 3'

**reverse:** 5' TTTTCTGATTGGTTCTGGCGAGTTTGG 3'

Auch diese beiden Einzelstränge mussten zunächst wieder annealed werden. Wie zuvor bei NF-κB wurden hierfür die Ursprungsoligonukleotide in einer Konzentration von 1 µg/µl in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) gelöst. Jeweils 10 µl

Oligonukleotide wurden auf 100 µl H<sub>2</sub>O aufgefüllt (10 µl sense Einzelstrang + 10 µl reverse Einzelstrang + 80 µl H<sub>2</sub>O), anschließend im Wasserbad auf 94°C erhitzt und dann langsam im ausgeschalteten Wasserbad auf Raumtemperatur heruntergekühlt

Da diese Oligonukleotide im Gegensatz zu den NF-κB-Strängen keine Überhänge aufwiesen, wurde als Enzym die T4 Polynucleotide Kinase verwendet, die die endständige Phosphatgruppe von ATP an freie 5'-OH Enden von Nukleotiden überträgt. Für diese Reaktion wurden 5 pmol des doppelsträngigen NF-γ Oligonukleotids mit 5 µl γ<sup>32</sup>P - Adenosontriphosphat (entspricht 50 µCi) zusammen mit 0,5 µl T4 Kinase in 2 µl PNK-Puffer auf 20µl H<sub>2</sub>O aufgefüllt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die neu synthetisierten Oligonukleotide ebenfalls mittels QIAquick Nucleotide Removal Kit (*Qiagen*) nach Herstellerangaben aufgereinigt, um abschließend die Radioaktivität zu überprüfen.

### 2.2.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die oben beschriebenen Oligonukleotide wurden verwendet, um die sequenzspezifische Bindung von Proteinen an doppelsträngige DNA zu ermitteln. Hierbei wurden die eingestellten Proteinisolate der Patienten mit den radioaktiv markierten DNA-Sequenzmotiven inkubiert und die dabei entstehenden Komplexe in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Hierbei wurden immer alle Proteinisolate eines Patienten für alle fünf Messzeitpunkte und jeweils das unstimulierte neben dem stimulierten Isolat, auf einem Gel zusammen aufgetrennt. Somit entstand für jeden Patient ein Gel mit NF-κB Banden und ein Gel mit NF-γ Banden (siehe Abbildung eins und zwei).

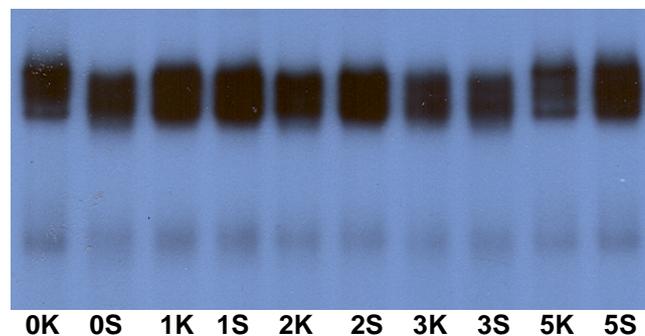
DNA-Fragmente, an denen ein Protein gebunden ist, wandern im Gel langsamer und können dadurch von ungebundener DNA getrennt werden. Synthetische Kompetitoren wie Poly-dIdC verhindern dabei eine unspezifische DNA-Bindung durch andere Proteine.

Hierbei wurden 10 µg Proteinlysat in 5µl EMSA- Puffer mit 30.000 cpm <sup>32</sup>P-markiertem NF-κB Oligonukleotid (HIV-Sequenz) respektive 30.000 cpm <sup>32</sup>P-markiertem NF-γ Oligonukleotid für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Zugabe von 1 mM DTT und 1 µg Poly-dIdC in einem Gesamtvolumen von 10 µl inkubiert.

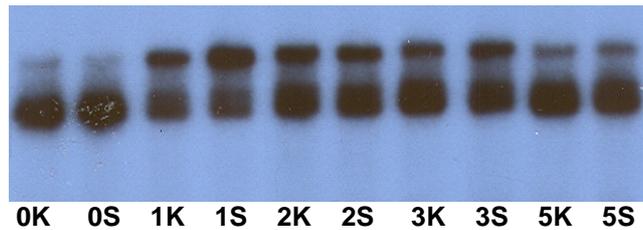
Nachdem ein 7%iges natives Polyacrylamidgel zunächst bei 100 V 30 Minuten äquilibriert worden war, wurden die Proben in die Taschen des Gels geladen und in 0,5fachem TBE-Laufpuffer bei 200V über eine Laufzeit von drei Stunden aufgetrennt.

Im Anschluss an den Lauf wurde das Gel zunächst für 30 Minuten im Fixierbad fixiert und anschließend für zehn Minuten gewässert. Anschließend wurde das Gel auf Whatmanpapier aufgezogen und für die Dauer einer Stunde bei 80°C in einem Vakuumgeltrockner getrocknet.

Um die auf dem Gel unsichtbaren Banden zu visualisieren, wurden die getrockneten Gele ca. drei Tage auf einem Agfa Cronex-5-Film bei -80°C exponiert. Wenn NF- $\kappa$ B-Untereinheiten in dem Zelllysate vorhanden waren, dann wurden diese - aufgrund der Interaktion mit dem gelabelten Oligonukleotid auf dem Gel - als deutlich sichtbare Banden nach oben verlagert, da der Komplex aus NF- $\kappa$ B Protein und Oligonukleotid eine geringere elektrophoretische Mobilität aufweist als das Oligonukleotid alleine. Die Intensität der geshifteten Bande kann daraufhin als ein Maß für die Menge an NF- $\kappa$ B in dem Proteingemisch angesehen werden.



**Abbildung 1:** Geshiftete NF- $\kappa$ B Banden eines Patienten an allen fünf Messzeitpunkten (0-5). Jeweils die unstimulierte Probe K neben der mit 10 ng TNF $\alpha$  stimulierten Probe S.



**Abbildung 2:** Geshiftete NF- $\kappa$ B Banden eines Patienten an allen fünf Messzeitpunkten (0-5). NF- $\kappa$ B entspricht der unteren prominenten Bande. Jeweils die unstimulierte Probe K neben der mit 10 ng TNF $\alpha$  stimulierten Probe S.

### 2.2.7 Kompetitortest

Durch einen Kompetitortest erfolgte der Nachweis einer spezifischen DNA-Protein-Wechselwirkung, um die jeweils richtige Bande für NF- $\kappa$ B respektive NF- $\kappa$ A zu verifizieren.

Hierbei wurde zunächst ein nicht gelabeltes Oligonukleotid für 30 Minuten mit den Proben inkubiert, um dann anschließend für weitere 30 Minuten das radioaktiv markierte Oligonukleotid hinzuzugeben. Das jeweils unmarkierte Oligonukleotid enthielt ebenso wie das jeweils markierte NF- $\kappa$ B-HIV-site beziehungsweise die NF- $\kappa$ A- Erkennungssequenz. War nun die jeweils beobachtete NF- $\kappa$ B- beziehungsweise NF- $\kappa$ A- Bande spezifisch, sollte diese beim Hinzugeben der zugehörigen, ungelabelten Wildtyp Sequenz vollständig verschwinden, jedoch in Gegenwart der ungelabelten „mutierten“ Sequenz persistieren.

### 2.2.8 Densitometrie mittels Phosphor Imaging Technik

Um die, mittels Agfa Cronex-5-Film visualisierten, elektrophoretisch aufgetrennten, radioaktiv markierten NF- $\kappa$ B bzw. NF- $\kappa$ A Proteine nun auch quantifizieren zu können, wurde ein Phosphorimager (FLA-3000) der Firma *Fuji* verwendet. Zur Analyse wurde das Programm „AIDA Image Analyzer for Windows“ der Firma *Raytest* benutzt.

Hierzu wurden die getrockneten Polyacrylamidgele jeweils fünf Stunden auf den Imaging Plates bei Raumtemperatur exponiert. Dadurch wird die Energie der radioaktiv markierten Probe auf die Phosphorkristallstruktur der Bildplatte

übertragen. Als reiner  $\beta$ -Strahler emittiert Phosphor  $^{32}\text{P}$  seine Energie in Form von Elektronen, welche auf der Bildplatte eingefangen werden. Das spezifische Absorptionsverhalten, welches die somit in einer bestimmten Form in der Kristallstruktur assoziierten Elektronen aufweisen, kann in der Folge genutzt werden. Wird das eingefangene Elektron mit Laserlicht dieser bestimmten Wellenlänge angeregt (ca. 600 nm), emittiert es Licht einer anderen Wellenlänge (ca. 400 nm), welches detektiert und ausgewertet werden kann. Die Software quantifiziert und integriert die gemessenen Signalintensitäten über vordefinierte Flächen und gibt sie als numerischen Wert in der Einheit PSL (photostimulierte Lumineszenz) aus. Die somit erhaltene Intensität für die Radioaktivitätsverteilung wurde abschließend noch von der gemessenen Hintergrundaktivität des Gels abgezogen, um nur die spezifische Intensität der jeweiligen Bande zu errechnen.

### **2.3 Probandenkollektiv und Studiendesign**

Die Untersuchung erfolgte mit Zustimmung der Ethikkommission der Universität Ulm nach der Deklaration von Helsinki (Ethikantrag Nr. 145/2005). An dieser Arbeit nahmen freiwillig elektiv operierte, gefäßchirurgische Patienten teil. Dabei handelte es sich um eine prospektiv-deskriptive laborchemische Untersuchung von Patienten mit schweren, elektiven, gefäßchirurgischen Eingriffen (Bauchaortenaneurysma (BAA)), kontrolliert durch gefäßchirurgische Patienten mit elektiv-operativen Eingriffen an peripheren Gefäßen (Operation der Arteria Carotis (AC)). In dem Studienzeitraum vom 1. Januar 2007 bis 30. Juni 2008 wurden dabei insgesamt 50 Patienten in die Studie aufgenommen. Darunter 30 Patienten in die BAA Gruppe und 20 in die AC Gruppe. Folgende Ein- bzw. Ausschlusskriterien wurden hierbei angewendet:

*Einschlusskriterien:*

#### Versuchsgruppe:

- Präoperative Patienten vor elektiver gefäßchirurgischer Versorgung eines abdominellen oder thorakalen Aortenaneurysmas
- Alter > 40 Jahren und < 80 Jahre
- ASA (American Society of Anesthesiologists) - Klassifizierung 1-4
- Einverständniserklärung des Patienten

Kontrollgruppe:

- Alter > 40 Jahre und < 85 Jahre
- ASA-Klassifizierung 1-4
- Einverständniserklärung des Patienten

*Ausschlusskriterien* (für Versuchsgruppe und Kontrollgruppe):

- Alter < 40 Jahre und > 85 Jahre
- Präoperativ nachgewiesene bakterielle Infektion
- Neoplastische Erkrankungen
- Z.n. Organtransplantation
- Immunmodulatorische Therapien: Corticosteroide, G-CSF, Immunsuppression
- Dauerhafte Einnahme von Antioxidantien (Vitaminpräparate)
- Ablehnung des Patienten

Von den 50 Patienten wurden allerdings nur 48 in die Auswertung mit einbezogen, da zwei BAA-Patienten durch nicht verwertbare Banden ausschieden.

## **2.4 Blutentnahme**

Die Blutentnahme erfolgte nach dem Standard der Universität Ulm an peripheren Venen. Es wurde jeweils an einem präoperativem Tag (Tag 0) und an dem ersten, zweiten, dritten und fünften postoperativen Tag zwischen 20 und 30 ml Blut mit Heparin-Monovetten für die Analyse entnommen. Zusätzlich wurden jeweils zwei bis drei ml EDTA-Blut, zwei bis drei ml Citrat-Blut und fünf bis sieben ml Heparin-Blut für die Erstellung eines maschinellen Blutbildes abgenommen. Dies erfolgte in der Abteilung für Klinische Chemie der Universität Ulm.

## **2.5 Dokumentation**

Für jeden Patienten wurden alle erhobenen Daten in einem Dokumentationsbogen mit Hilfe einer Microsoft Access<sup>®</sup> Datenbank elektronisch erfasst.

### **2.5.1 Patientendaten**

Als Grunddaten für jeden einzelnen Patienten wurden hierbei in die Datenbank aufgenommen:

- Name, Vorname, Geburtsdatum und Geschlecht des Patienten
- Tag der Operation
- Diagnose, Vorerkrankungen und Medikation
- ASA Klassifikation
- intra- und postoperative Besonderheiten
- intraoperativer Blutverlust und Substitution mit Erythrozyten-, Thrombozytenkonzentraten oder Plasma
- Clampingzeit (bei BAA-Patienten) und Schmerztherapie mit Periduralkatheter

### **2.5.2 Klinische Daten**

Zusätzlich zu den Grunddaten der einzelnen Patienten wurden zu jedem Messzeitpunkt auch klinische Daten erfasst. Dabei wurden jeweils die schlechtesten Werte innerhalb der entsprechenden 24 Stunden aufgenommen:

- Körpertemperatur in °Celsius
- Herzfrequenz in 1/min
- Mittlerer arterieller Druck in mmHG
- systolischer Blutdruck in mmHG
- APACHE-II-Score
- SAPS-II

### **2.5.3 Laborwerte**

Zu jedem Messzeitpunkt wurden zusätzlich folgende Laborwerte durch die klinische Chemie der Universität Ulm bestimmt und in der Datenbank erfasst:

#### Aus Lithium-Heparin-Plasma:

- Elektrolyte: Natrium, Kalium
- Nierenfunktionsparameter: Harnstoff, Kreatinin
- Leberstoffwechsel: Bilirubin gesamt
- Proteine: C-reaktives Protein
- Glukose

#### Aus Citrat-Plasma:

- Gerinnungsparameter: Prothrombinzeit (Quick-Wert), partielle

Thrombinzeit

Aus EDTA-Plasma:

- Kleines Blutbild: Leukozyten, Erythrozyten, Hämatokrit, Thrombozyten
- Differential Blutbild: neutrophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten

## **2.6 Erhebung klinischer Scores**

Zu allen fünf Messzeitpunkten wurden aus den erfassten Parametern und Daten der APACHE-II-Score und der SAPS-II-Score manuell errechnet.

### **2.6.1 APACHE-II-Score**

Der Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) Score errechnet sich aus Punktwerten für 12 klinische und laborchemische Parametern, dem Glasgow-Coma-Scale, dem Alter und dem zugrunde liegenden Gesundheitsstatus (siehe Abbildung 1). Dabei wird immer der jeweils schlechteste Wert innerhalb der entsprechenden 24 Stunden verwendet. Anhand der somit erhaltenen Punktwerte errechnet sich der Score der einen Wert von 0 bis 68 annehmen kann. Gesunde Patienten würden altersabhängig Werte zwischen 0 und 6 erreichen.

### **2.6.2 SAPS-II-Score**

Der Simplified Acute Physiology II (SAPS II) Score errechnet sich aus Punktwerten für 12 klinische und laborchemischen Parametern, für das Alter, den Aufnahmegrund -unterteilt in geplant oder ungeplant Chirurgisch oder auf Grund einer Krankheit der inneren Medizin - und für drei Variablen, die schwerwiegende Grunderkrankungen erfassen, wie AIDS, metastasiertes Krebsleiden oder maligne hämatologische Erkrankungen. (siehe Abbildung 2) Auch hier werden wieder die jeweils schlechtesten Werte innerhalb der entsprechenden 24 Stunden verwendet. Anhand der Punktwerte dieser 17 Variablen errechnet sich der Score, der zwischen 0 und 163 rangiert.

Tabelle 1: APACHE II Score Erhebungsbogen

APACHE II Score Erhebungsbogen (Deutsch)

NEGATIVSTE WERTE	ABWEICHUNGEN NACH OBEN					ABWEICHUNGEN NACH UNTEN					Punkte
	+4	+3	+2	+1	+0	+1	+0	+1	+2	+3	
Temperatur – rektal (°C)	≥ 41°C	39-40,9°C	38,5-38,9°C	38,0-38,4°C	36-38,4°C	34-35,9°C	33-33,9°C	32-33,9°C	30-31,9°C	≤ 29,9°C	
Mittlerer arterieller Druck (mmHg)	≥ 160	130-159	110-129	70-109	70-109	50-69	50-69	40-54	≤ 40		
Herzfrequenz HF /min	≥ 180	140-179	110-139	70-109	70-109	55-69	55-69	40-54	≤ 30		
Atemfrequenz AF /min	≥ 30	35-49	25-34	10-11	10-11	8-9	8-9	≤ 3			
Chlorid mmol/l (Nüchternwert)	≤ 500	350-499	200-349	< 200	< 200						
Albumin mmol/l (Nüchternwert) Abweichende Serumgefrierhöhe APACHE II Score: 0-7,25, ab 7,25 Skala umrechnet per 0,25 mmol/l	≤ 7,7	7,6-7,69	7,5-7,59	7,3-7,49	7,3-7,49	7,25-7,32	7,15-7,24	≤ 7,15			
pH arteriell	≥ 7,7	7,6-7,69	7,5-7,59	7,3-7,49	7,3-7,49	7,25-7,32	7,15-7,24	≤ 7,15			
Natrium mmol/l	≥ 180	160-179	155-159	130-149	130-149	120-129	111-119	≤ 110			
Kalium mmol/l	≥ 7	6-6,9	5,5-5,9	3,5-5,4	3,5-5,4	3-3,4	2,5-2,9	≤ 2,5			
Kreatinin mg/100ml (Bei akuten Nierenversagen Punkte auf 0 setzen)	≥ 3,5	3-3,4	1,5-1,9	0,6-1,4	0,6-1,4	< 0,6	< 0,6				
Hämokrit %	≥ 80	50-59,9	45-49,9	30-45,9	30-45,9	20-29,9	20-29,9	< 20			
Leukozyten (x1000)	≥ 40	20-39,9	15-19,9	3-14,9	3-14,9	1-2,9	1-2,9	< 1			
Glasgow-Coma-Skala (GCS)											
Punkte = 15 – aktueller Glasgow-Coma-Score											
Punkte gesamt:											
Age Points: ≤ 44 Jahre = 0 Punkte    45-54 = 2 Punkte    55-64 = 3 Punkte    65-74 = 5 Punkte    ≥ 75 = 6 Punkte											
Durch Blipole gestörte Zirkulation und fragilen arterieller portaler Hochdruck Obere gastrointestinale Blutungen in der Vorgeschichte, ausgehend von einem sonstigen Hochdruck Vorhergehende Epilepsien mit hepatischer Insuffizienz/hepatischer Enzephalopathie/hepatischem Koma New York Heart Association (NYHA) Class IV Chronische respiratorische, diuretische oder gefäßbedingte Erkrankungen, die mit einer schweren Einschränkung bei leichten Aufgaben einhergehen (z.B. Unfähigkeit Haushalt zu führen) bekannte chronische Hypoxie, Hypertension, sekundäre Polyzytämie, schwere pulmonale Hypertonie (chronisch) oder Abhängigkeit von Beatmung chronische Dialyse Der Patient hatte eine Therapie, welche die Abwehrkraft gegen Infektionen schwächt (z.B. Immunsuppressiva, Chemotherapie, Bestrahlung, langfristige oder hochdosierte Steroide) Erkrankungen, die mit einer Immunschwäche einhergehen (z.B. Leukämie, Lymphom, AIDS)											
Nicht-operierter Patient Postoperativer Patient nach Notfall-OP Postoperativer Patient nach Elektiv-OP											
bei einem JA 5 Punkte bei einem JA 5 Punkte bei einem JA 2 Punkte											
+    +    +    +    +    +    +    +    +    +    =											
APACHE II Score:											

\*% berechnet sich aus AUBO: (mmHg) = paco2/pao2 oder wird vom Blut-Gewicht zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 2:** SAPS II Erhebungsbogen

**SAPS II**

maßgeblich sind die **schlechtesten Werte** (höchste Punktzahl) in einem **24-Stunden-Zeitraum** seit dem zur Intensiv-Aufnahme führenden Ereignis (Unfall, OP, Komplikation)

	Punkte bei abnormal niedrigen Werten				„normal“	Punkte bei abnormal hohen Werten				
Alter (Jahre)					<40	40-59 <b>7</b>	60-69 <b>12</b>	70-74 <b>15</b>	75-79 <b>16</b>	≥80 <b>18</b>
Herzfrequenz (pro Min.)			<40 <b>11</b>	40-69 <b>2</b>	70-119	120-159 <b>4</b>	≥160 <b>7</b>			
Blutdruck (syst., mmHg)			<70 <b>13</b>	70-99 <b>5</b>	100-199	≥200 <b>2</b>				
Temperatur (°C)					<39.0	≥39.0 <b>3</b>				
nur bei Beatmung o. Pulmonalis-Katheder PaO <sub>2</sub> (mmHg) / FiO <sub>2</sub>		<100 <b>11</b>	100-199 <b>9</b>	≥200 <b>6</b>	-					
Urinausscheidung (L/Tag)			<0.5 <b>11</b>	0.5-0.99 <b>4</b>	≥1,0					
Harnstoff (mg/dl) oder Harnstoff-Stickstoff (mg/dl)					<60 <28	60-179 28-83 <b>6</b>	≥180 ≥84 <b>10</b>			
Leukozyten (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )				<1.0 <b>12</b>	1.0-19,9	≥20 <b>3</b>				
Kalium (mmol/L)				<3 <b>3</b>	3.0-4.9	≥5.0 <b>3</b>				
Natrium (mmol/L)				<125 <b>5</b>	125-144	≥145 <b>1</b>				
Serum Bikarbonat (mEq/L)			<15 <b>6</b>	15-19 <b>3</b>	≥20					
Bilirubin (mg/dl)					<4.0	4.0-5.9 <b>4</b>	≥6.0 <b>9</b>			
Glasgow Coma Scale (vor Sedierung)	<6 <b>26</b>	6-8 <b>13</b>	9-10 <b>7</b>	11-13 <b>5</b>	14-15					
Vorerkrankungen					-	metastas. Karzinom <b>9</b>	maligne hämatolog. Erkr. <b>10</b>		AIDS <b>17</b>	
Zuweisung auf ICU					elektiv chirurgisch	medizinisch (ohne OP) <b>6</b>	ungeplant chirurgisch <b>8</b>			

Le Gall et al. „A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study.“ JAMA (1993) 270: 2957-83

**2.7 Statistik**

Die statistische Auswertung der für die einzelnen Patienten in der Microsoft Access® Datenbank erfassten Daten erfolgte primär mittels des Programms Excel® 2003 von Microsoft. Hiermit wurden die Graphen für die Einzelpatientenverläufe der beiden Studiengruppen erstellt, sowie die Berechnungen des Medians, Minimums und Maximums durchgeführt. Diese Werte finden sich im Ergebnisteil als Median (Minimum; Maximum) wieder. Zusätzlich wurden zu diesen Werten Boxplotdiagramme mittels dem Programm „SigmaPlot 7,0 Notebook“ erstellt, welche die Zielgrößen der beiden Gruppen vergleichend für jeden Messzeitpunkt gegenüberstellen. Hierbei sind die BAA-Patienten als grauer Plot und die Carotis-Patienten als weißer Plot dargestellt. Der Boxplot selbst repräsentiert den Median,

die 5-, 25-, 75- und 95%-Perzentile. Die Korrelationsanalyse wurde mittels des Programms „SPSS 8.0 für Windows“ durchgeführt. Hierbei wurde der Spearmans Korrelationskoeffizient ( $r_{SP}$ ) verwendet, welcher eine Korrelationsanalyse für nicht normalverteilte Rangpaare erlaubt und somit für die hier gewonnenen Daten zulässig ist. Dieser Koeffizient kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen, wobei ein  $r_{SP} < 0$  für einen gegensinnig monotonen Zusammenhang, ein  $r_{SP} > 0$  für einen gleichsinnig monotonen Zusammenhang und ein  $r_{SP} = 0$  für keinen monotonen Zusammenhang steht.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Kollektivbeschreibung

Von den 50 in die Studie aufgenommenen Patienten galt keiner als initialer Drop out. Allerdings mussten zwei Patienten im Nachhinein aus der Wertung ausgeschlossen werden, da die mit ihren Proben erzeugten Banden im Elektrophoretic Mobility Shift Assay nicht auswertbar waren. Es handelte sich hierbei um zwei Patienten der Studiengruppe (BAA), womit letztendlich 28 BAA-Patienten und 20 Carotis Patienten in die Auswertung einbezogen wurden. Hinsichtlich des Alters der Patienten in den beiden Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied in den beiden Gruppen, wohingegen ein solcher bei der Geschlechterverteilung zu beobachten war. Das Vorerkrankungsprofil der beiden Gruppen im Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen zeigte bei arterieller Hypertonie (aHT), Dyslipoproteinämie (DLP), Diabetes Mellitus Typ II (DM II) und Koronarer Herzerkrankung (KHK) beziehungsweise Myokardinfarkt (MI) keine signifikanten Unterschiede. Signifikant unterscheiden sich die beiden Gruppen lediglich hinsichtlich der Verteilung von Apoplex. Die folgende Tabelle zeigt die genaue Gegenüberstellung dieser Angaben.

**Tabelle 3:** Demographische Daten der Patientengruppen, als absolute Zahlen und prozentuale Angabe der Vorerkrankungen, Fett = deutliche Gruppenunterschiede, aHT = arterielle Hypertonie, DLP = Dyslipoproteinämie, DM II = Diabetes Mellitus Typ II, KHK = koronare Herzerkrankung, MI = Myokardinfarkt, BAA = Bauchortenaneurysma, w = weiblich, m = männlich

Patienten	BAA	Carotis
Anzahl	28	20
<b>Geschlecht (w/m)</b>	<b>1/27</b>	<b>11/9</b>
Durchschnittsalter	67,7 Jahre	70,02 Jahre
Vorerkrankungen		
<i>aHT</i>	75%	80%
<i>DLP</i>	57%	50%
<i>DM II</i>	21%	20%
<b>Apoplex</b>	<b>4%</b>	<b>50%</b>
<i>KHK / MI</i>	39%	40%

Beim Vergleich der drei Zielgrößen Bindungsaktivität, Aktivierungskapazität relative Aktivierungskapazität an Tag null - also dem präoperativen Messzeitpunkt - zeigten sich außer für die Bindungsaktivität keine signifikanten Unterschiede in den zwei Studiengruppen. Auch die Leukozytenwerte, der CRP-Wert, der APACHE-II Score und der SAPS-II wichen nicht signifikant voneinander ab.

Der folgenden Tabelle vier sind die genauen Werte dieser Zielgrößen zu entnehmen.

**Tabelle 4:** Zielgrößen an Messtag null (präoperativ) angegeben als Median (Minimum-Maximum),  
CRP = C-reaktives Protein, BAA = Bauchaortenaneurysma

Patienten	BAA	Carotis
Bindungsaktivität	7248,8 (1725,7-29810,4)	4802 (1334,1-26375,8)
Aktivierungskapazität	1,21 (0,72-2,44)	1,14 (0,77-1,58)
Leukozyten	6,8 (3,6-10,5)	5,3 (3,1-11,6)
CRP	1,95 (0,4-10,6)	2,45 (0-24,5)
APACHE-II	7 (3-10)	6 (3-12)
SAPS-II	14 (7-20)	15 (0-25)

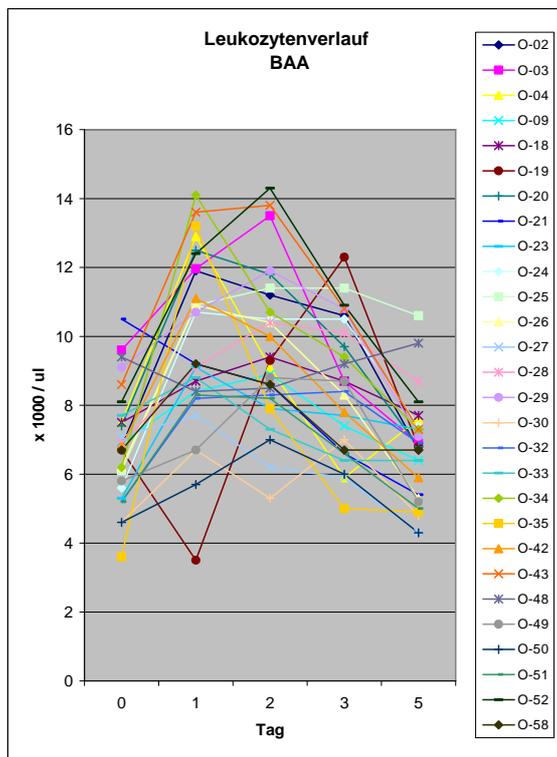
### **3.2 Verlauf laborchemisch standardisierter Entzündungsparameter**

Im Folgenden soll der Verlauf zweier laborchemisch-standardisierter Entzündungsparameter über die fünf Messzeitpunkte für die zwei Studiengruppen betrachtet werden. Hierbei handelt es sich um den Verlauf der Leukozytenzahl und den Verlauf des C-reaktiven Proteins (CRP), welche beide im klinischen Alltag eine große Rolle bei der Entzündungsdiagnostik und –verlaufsbeobachtung spielen.

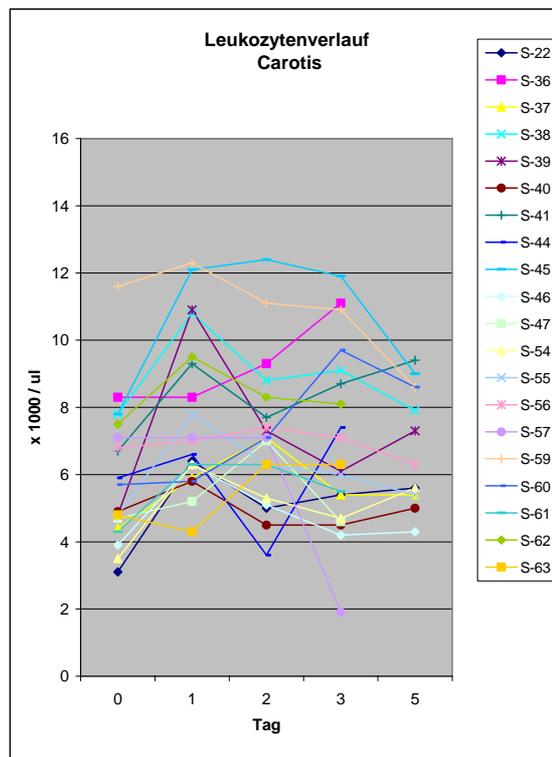
#### **3.2.1 Leukozytenverlauf**

Die Leukozytenzahl wird in der Klinik unter anderem zur Diagnostik und Therapiekontrolle bei Infektionen und Entzündungen, Tumorerkrankungen oder

Knochenmarksdepression verwendet. Der Normbereich für Erwachsene liegt hierbei bei  $4,4 \cdot 10^3 - 11,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ .



**Abbildung 3:** Leukozytenverlauf der Bauchaortenaneurysma-Patienten (BAA) (O-02 – O-58) über die fünf Messzeitpunkte in  $\times 10^3/\mu\text{l}$



**Abbildung 4:** Leukozytenverlauf der Carotis-Patienten (S-22 – S-63) über die fünf Messzeitpunkte in  $\times 10^3/\mu\text{l}$

Wird der Verlauf der Leukozytenwerte der 28 BAA-Patienten in Abbildung drei betrachtet, so ist eine relativ einheitliche Tendenz über die fünf Messzeitpunkte zu erkennen. Postoperativ steigt der Großteil der Werte über Tag eins und Tag zwei an, um dann über Tag drei bis Tag fünf wieder abzufallen.

Trotz dieses einheitlichen Anstiegs der Leukozytenzahl bleiben aber immer noch 12 Patienten (43%) im Gesamtverlauf unter der oberen Grenze des Normbereiches von  $11,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ . Maximal werden Werte bis zu  $14,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  erreicht, was das 1,4-Fache der Obergrenze des Normbereiches ist.

Auch im Verlauf der Leukozytenwerte der 20 Carotis-Patienten in Abbildung vier ist wieder eine relativ einheitliche Tendenz über die fünf Messzeitpunkte zu erkennen. Postoperativ steigt der Großteil der Werte ebenfalls an Tag eins und zwei an, um an Tag drei wieder abzufallen und an Tag fünf noch weiter zurückzugehen.

Im Vergleich mit der Studiengruppe liegen hier die Werte allerdings etwas tiefer und erreichen mit  $12,4 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  nur das 1,2-fache der Normwertobergrenze im Vergleich zu dem 1,4-fachen in der Studiengruppe. Das wird auch daran ersichtlich, dass im Gesamtverlauf in der Vergleichsgruppe 15 Patienten und damit 75%, unter der Obergrenze des Normbereichs von  $11,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  bleiben. Das sind 33% mehr als in der Studiengruppe.

Diese graphisch sichtbaren Tendenzen im Verlauf der Leukozytenwerte werden auch bei Betrachtung des Verlaufs des Medians dieser Größe in Tabelle fünf bei den BAA Patienten und sechs bei den Carotis-Patienten deutlich.

**Tabelle 5:** Bauchaortenaneurysma-Patienten: Median, Minimum und Maximum der Leukozyten-Werte an den fünf Messzeitpunkten, angegeben in  $\times 10^3 / \mu\text{l}$

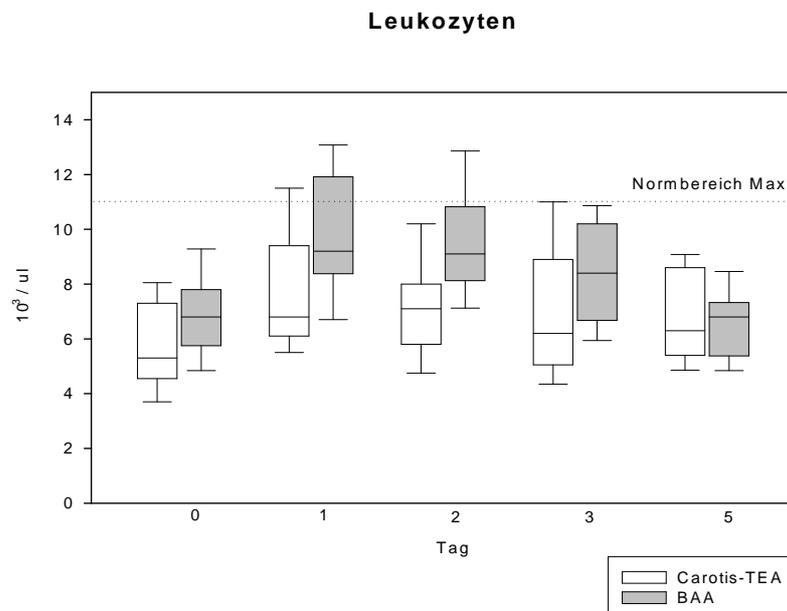
Tag	0	1	2	3	5
Median	6,8	9,2	9,2	8,6	6,8
Minimum	3,6	3,5	5,3	5	4,3
Maximum	10,5	14,1	14,3	12,3	10,6

Der präoperative Median der Leukozytenzahlen der 28 BAA- Patienten liegt etwa im Mittelfeld des klinischen Normbereiches bei  $6,8 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  ( $3,6 \cdot 10^3/\mu\text{l} - 10,5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ). Postoperativ kommt es bereits an Tag eins zu einem Anstieg des Medians auf den Maximalwert von  $9,2 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  ( $3,5 \cdot 10^3/\mu\text{l} - 14,1 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ), welcher an Tag zwei gleichwertig bei  $9,2 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  ( $5,3 \cdot 10^3/\mu\text{l} - 14,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) persistiert. Wie graphisch bereits sichtbar, kommt es daraufhin über Tag drei mit  $8,6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  ( $5 \cdot 10^3/\mu\text{l} - 12,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) bis an Tag fünf zu einem Rückgang des Medians auf den präoperativen Wert von  $6,8 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  ( $4,3 \cdot 10^3/\mu\text{l} - 10,6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ).

**Tabelle 6:** Carotis-Patienten: Median, Minimum und Maximum der Leukozyten-Werte an den fünf Messzeitpunkten, angegeben in  $\times 10^3/\mu\text{l}$

Tag	0	1	2	3	5
Median	5,3	6,8	7,1	6,2	6,3
Minimum	3,1	4,3	3,6	1,9	4,3
Maximum	11,6	12,3	12,4	11,9	9,4

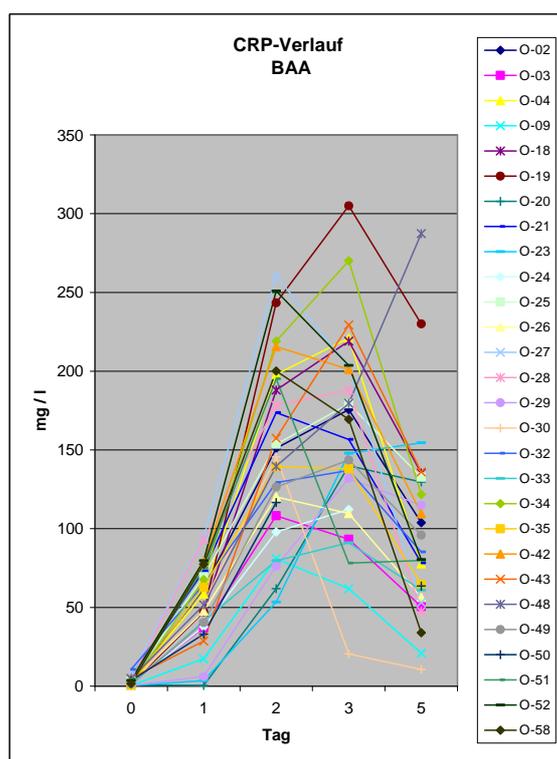
Der präoperative Median der Leukozytenzahlen der 20 Carotis-Patienten liegt im unteren klinischen Normbereich bei  $5,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  ( $3,1 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  -  $11,6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) und somit bereits an Tag null tiefer als in der Studiengruppe. Auch postoperativ liegt die Vergleichsgruppe im Median immer unter der Studiengruppe. An Tag eins kommt es zu einem Anstieg des Medians auf  $6,8 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  ( $4,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  -  $12,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ), welcher an Tag zwei noch etwas weiter auf  $7,1 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  ( $3,6 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  -  $12,4 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) ansteigt und hier einen Tag später als in der Studiengruppe sein Maximum erreicht. Wie auch hier bereits graphisch sichtbar, kommt es daraufhin über Tag drei mit  $6,2 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  ( $1,9 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  -  $11,9 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) bis an Tag fünf zu einem Rückgang des Medians auf  $6,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  ( $4,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  -  $9,4 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ). Damit wird im Gegensatz zur Studiengruppe hier jedoch der präoperative Ausgangswert an Tag fünf nicht erreicht, da der Median hier noch höher liegt. Allerdings konnten an Tag fünf sieben Carotis-Patienten nicht mehr erfasst werden, da sie zu diesem Zeitpunkt bereits entlassen waren. Diese Unterschiede in den beiden Gruppen werden in Abbildung fünf deutlich, welche die Leukozytenwerte beider Gruppen als Boxplots nebeneinander im Vergleich zeigt. Hier wird auch nochmals deutlich, dass sehr viele Patienten in ihrem Gesamtverlauf innerhalb des Normbereiches (gestrichelte Linie = Maximalwert von  $11,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) liegen.



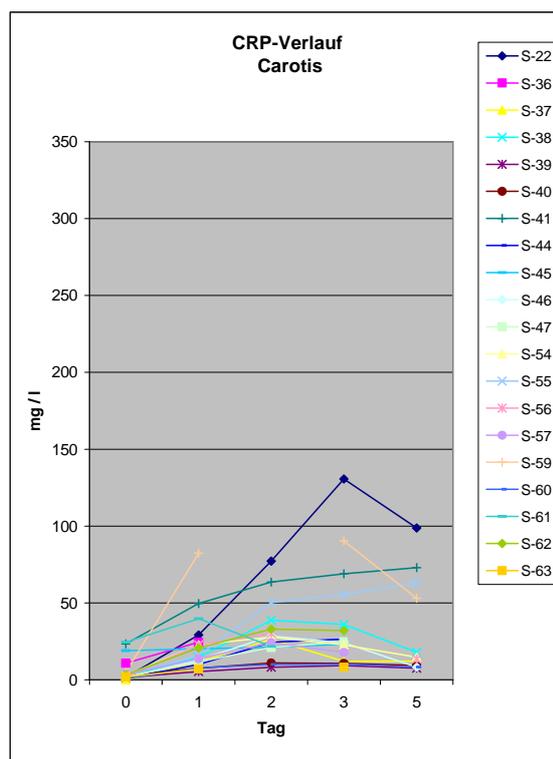
**Abbildung 5:** Verlauf der Leukozytenwerte der Bauchaortenaneurysma-Patienten (grau) und Carotis-Patienten (weiß) in G/l über die fünf Messzeitpunkte, dargestellt als Boxplots (Mediane, 5-, 25-, 75- und 95%-Perzentile). Die Obergrenze des Normbereiches bei  $11,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  ist als gestrichelte Linie eingezeichnet.

### 3.2.2 CRP-Verlauf

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein Akutes Phase Protein, welches klinisch einen großen Stellenwert als Suchtest und Verlaufskontrolle bei akut-entzündlichen, nekrotisierenden und neoplastischen Erkrankungen innehat. Als Vorteil des CRP gegenüber anderen Entzündungsparametern wie Leukozytenzahl oder Blutsenkungsgeschwindigkeit gilt sein rascherer und steilerer Anstieg. Der Normwert erstreckt sich beim Erwachsenen bis 5 mg/l.



**Abbildung 6:** CRP-Verlauf der Bauchortenaneurysma-Patienten (BAA) (O-02 – O-58) über die fünf Messzeitpunkte in mg/l



**Abbildung 7:** CRP-Verlauf der Carotis-Patienten (S-22 – S-63) über die fünf Messzeitpunkte in mg/l

Der graphische Verlauf der CRP-Werte der 28 BAA-Patienten weist in Abbildung sechs sehr einheitliche Tendenzen auf. Mit Ausnahme eines Patienten kommt es bereits an Tag eins zu einem großen Anstieg, welcher sich über Tag zwei und drei noch verstärkt, um bis Tag fünf wieder abzufallen. Hierbei steigen alle Patienten in ihren CRP-Werten weit über den Normbereich hinaus. Maximal werden CRP-Werte bis 305 mg/l erreicht, was das 30-fache der Obergrenze des Normbereiches ist, während es bei den Leukozyten an dieser Stelle lediglich das 1,4-fache ist.

Das Erste, was in der Gesamtschau der Patienten-CRP-Verläufe der Vergleichsgruppe (Abbildung sieben) auffällt, ist, dass im Vergleich zur Studiengruppe hier die Werte um einiges niedriger sind. So liegt hier der maximal erreichte Wert bei 130,6 mg/l, während bei den BAA-Patienten mit 305 mg/l fast das Dreifache gemessen wird. Zudem bleiben zwei Carotis-Patienten im Gesamtverlauf innerhalb des Normbereiches. Auch hier ist ein Anstieg an Tag eins, zwei und drei sichtbar, dem ein Abfall an Tag fünf folgt, jedoch ist dieser Verlauf bei weitem nicht so steil wie in der Studiengruppe. Bei Betrachtung des Verlaufs der Mediane der CRP-Werte über die fünf Messzeitpunkte wird dieser Unterschied noch deutlicher (siehe Tabelle sieben und acht).

**Tabelle 7:** Bauchaortenaneurysma-Patienten: Median, Minimum und Maximum der CRP-Werte an den fünf Messzeitpunkten, angegeben in mg/l

Tag	0	1	2	3	5
Median	1,95	52,15	148,3	156,7	80,4
Minimum	0,4	0,5	53,4	20,5	10,6
Maximum	10,6	94,4	260,7	305	287,4

Der präoperative Median des CRP-Wertes der 28 BAA-Patienten liegt mit 1,95 mg/l (0,4 mg/l - 10,6 mg/l) im Normbereich. Postoperativ kommt es an Tag eins zu einem starken Anstieg des Medians um das etwa 25-Fache, auf 52,15 mg/l (0,5 mg/l - 94,4 mg/l). Dieser setzt sich über Tag zwei mit 148,3 mg/l (53,4 mg/l - 260,7 mg/l) bis an Tag drei mit 156,7 mg/l (20,5 mg/l - 305 mg/l) fort und fällt bis an Tag 5 auf 80,4 mg/l (10,6 mg/l - 287,4 mg/l) wieder ab.

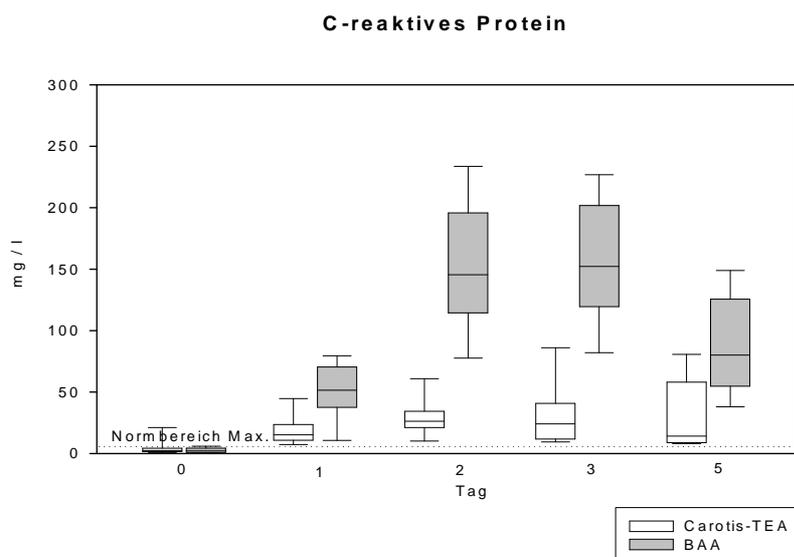
**Tabelle 8:** Carotis-Patienten: Median, Minimum und Maximum der CRP-Werte an den fünf Messzeitpunkten, angegeben in mg/l

Tag	0	1	2	3	5
Median	2,45	15,2	26,3	24,1	14,2
Minimum	0	5,3	8,2	8,2	7,6
Maximum	24,5	82,3	77,2	130,6	98,7

Der präoperative CRP-Wert der 20 Carotis-Patienten liegt im Median bei 2,45 mg/l (0 mg/l - 24,5 mg/l). Am ersten postoperativen Tag erfolgt auch in der

Vergleichsgruppe ein Anstieg des Medians auf 15,2 mg/l (5,3 mg/l - 82,3 mg/l). Hierbei handelt es sich um einen Anstieg um das 6,2-fache, ganz im Gegensatz zu dem 25-fachen Anstieg in der Studiengruppe. An Tag zwei steigt der Median der Vergleichsgruppe auf 26,3 mg/l (8,2 mg/l - 77,2 mg/l), um über Tag drei mit 24,1 mg/l (8,2 mg/l - 130 mg/l) bis auf Tag fünf mit 14,2 mg/l (7,6 mg/l - 98,7 mg/l) wieder abzufallen. Somit kommt es hier nicht nur zu einem weniger starken Werteanstieg als in der Studiengruppe, sondern der Werterückgang beginnt auch bereits einen Tag früher als in dieser.

Im folgenden Boxplot-Diagramm (Abbildung acht) sind die beiden Gruppen im Bezug auf ihre CRP-Werte gegenüber gestellt, was die Unterschiede noch klarer vor Augen führt. Im Gegensatz zur Leukozytenzahl wird hier der Normbereich (gestrichelte Linie) in beiden Gruppen postoperativ zu jedem Zeitpunkt deutlich überschritten.



**Abbildung 8:** Verlauf der Leukozytenwerte der Bauchortenaneurysma-Patienten (grau) und Carotis-Patienten (weiß) in G/l über die fünf Messzeitpunkte, dargestellt als Boxplots (Mediane, 5-, 25-, 75 und 95%-Perzentile). Obergrenze des Normbereichs bei 5 mg/l ist mit einer gestrichelten Linie eingezeichnet.

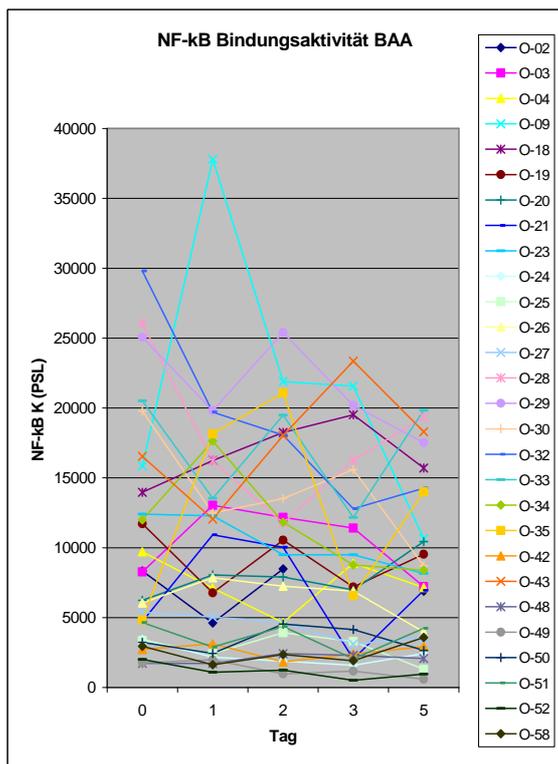
### **3.3 Verlauf der von NF- $\kappa$ B abgeleiteten Zielgrößen**

Im Folgenden sollen nun die einzelnen von NF- $\kappa$ B abgeleiteten Zielgrößen in ihrem Verlauf betrachtet werden. Dabei wird ein Augenmerk auf Zeitpunkt, Ausmaß und Dauer etwaiger Veränderungen gelegt.

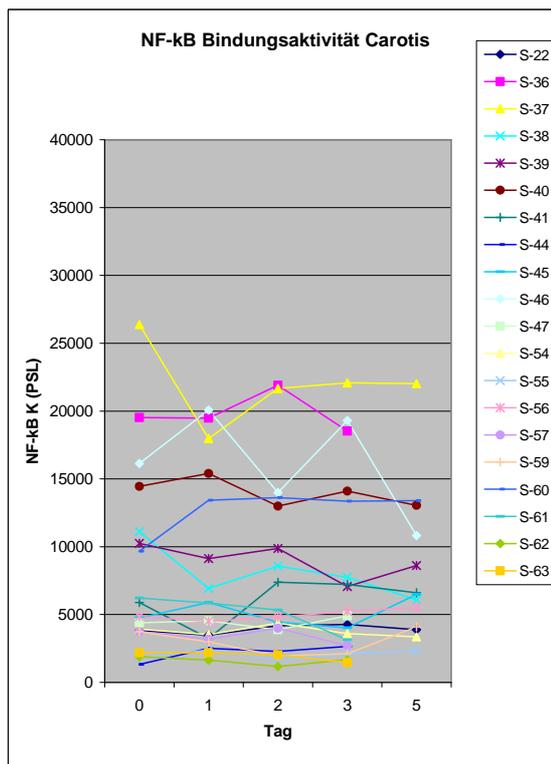
#### **3.3.1 NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität (NF- $\kappa$ B K)**

Die NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität (NF- $\kappa$ B Kontrolle = NF- $\kappa$ B K = BA) bezeichnet den unstimulierten, reinen NF- $\kappa$ B Wert, der an den jeweiligen Messzeitpunkten in PSL (photostimulierte Lumineszenz) gemessen wird.

In Abbildung neun (BAA-Gruppe) und zehn (Carotis-Gruppe) ist der zeitliche Verlauf der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität über die fünf Messzeitpunkte für alle Patienten einer Gruppe graphisch dargestellt. Werden diese Verläufe der einzelnen Patienten im Vergleich betrachtet, ist bereits auf den ersten Blick ersichtlich, dass es sich hierbei um eine Größe handelt, die an den einzelnen Messpunkten sehr starke Unterschiede bei den verschiedenen Patienten aufweist. In beiden Gruppen zeigen die Patienten eine große Streubreite, wobei die Vergleichsgruppe geringere Werteschwankungen innerhalb der Patientenverläufe aufweist. Zudem finden sich bei den Carotis-Patienten tendenziell niedrigere Verläufe, als bei den BAA-Patienten. Dies wird bereits dadurch deutlich, dass in der Vergleichsgruppe 45% der Patienten in ihrem gesamten Verlauf über die fünf Messzeitpunkte mit ihrer NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität kleiner/gleich 5000 PSL bleiben, während es in der Studiengruppe nur 29% sind.



**Abbildung 9:** Verlauf der NF-κB Bindungsaktivität (=NF-κB K) der Bauchaortenaneurysma-Patienten (BAA) (O-02 – O-58) über die fünf Messzeitpunkte in PSL



**Abbildung 10:** Verlauf der NF-κB Bindungsaktivität (=NF-κB K) der Carotis-Patienten (S-22 – S-63) über die fünf Messzeitpunkte in PSL

Dieser Unterschied zeigt sich auch beim Vergleich der Mediane der NF-κB Bindungsaktivität der beiden Gruppen (siehe Tabellen neun und zehn). Auch hier liegt die Vergleichsgruppe an allen Messzeitpunkten niedriger als die Studiengruppe. Allerdings ist auch hier wieder eine große Streubreite zu beobachten. Bereits bei dem Median der NF-κB Bindungsaktivität an Tag null wird dies deutlich, da hier die Minima und Maxima große Differenzen von etwa 28000 PSL in der Studiengruppe und etwa 25000 PSL in der Vergleichsgruppe aufweisen. Im Verlauf des Medians über die folgenden Messzeitpunkte bleibt diese große Streubreite ebenfalls bestehen.

**Tabelle 9:** Bauchaortenaneurysma-Patienten: Median, Minimum und Maximum der NF-κB Bindungsaktivität (NF-κB K) an den fünf Messzeitpunkten, angegeben in PSL

Tag	0	1	2	3	5
Median	7248,75	7950,60	8990,35	6977,10	7183,90
Minimum	1724,70	1084,20	972,50	515,60	599,30
Maximum	29810,40	37787,50	25406,20	23349,20	19835,60

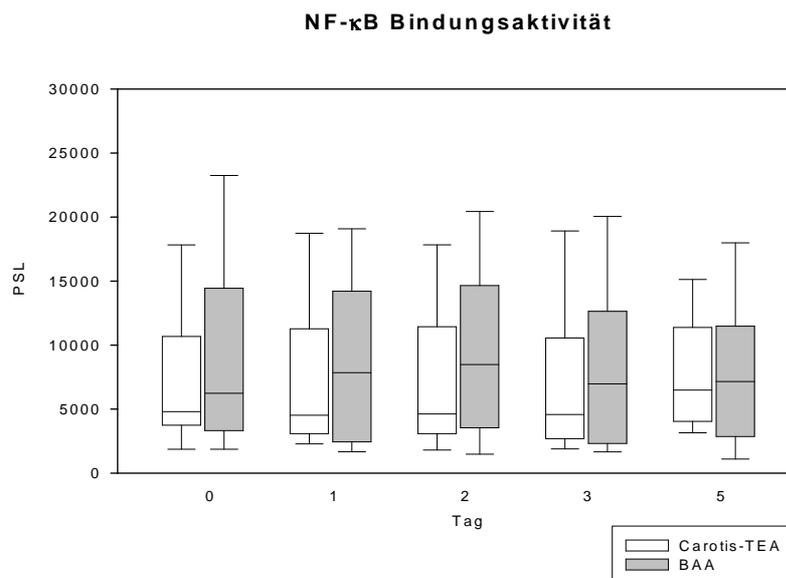
**Tabelle 10:** Carotis-Patienten: Median, Minimum und Maximum der NF-κB Bindungsaktivität (NF-κB K) an den fünf Messzeitpunkten, angegeben in PSL

Tag	0	1	2	3	5
Median	4801,95	4520,20	4623,85	4583,70	6484,40
Minimum	1334,10	1646,50	1174,20	1471,30	2330,90
Maximum	26374,80	20075,60	21898,30	22080,50	22024,60

Zusammenfassend lässt sich in der Studiengruppe von Tag null mit einem Median von 7248,75 PSL (1724,7 PSL – 29810,4 PSL) über Tag eins mit 7950,6 PSL (1084,2 PSL – 37787,5 PSL) zu Tag zwei mit 8990,35 PSL (972,5 PSL – 25406,2 PSL) ein Werteanstieg der Bindungsaktivität im Median beobachten. An Tag drei sinkt die Bindungsaktivität im Median unter den präoperativen Wert auf 6977,1 PSL (515,6 PSL – 23349,2 PSL) um an Tag fünf wieder leicht auf 7183,9 PSL (599,3 PSL – 19835,6 PSL) anzusteigen, aber immer noch unter dem Ausgangswert zu bleiben (siehe Tabelle neun).

Indessen fällt der Werteanstieg der Bindungsaktivität im Median in der Vergleichsgruppe während der ersten vier Tagen geringer aus als in der Studiengruppe. Präoperativ liegt hier der Median bei 4801,95 PSL (1334,1 PSL – 26374,8 PSL), sinkt an Tag eins auf 4520,2 PSL (1646,5 PSL – 20075,6 PSL), steigt an Tag zwei wieder leicht auf 4623,85 PSL (1174,2 PSL – 21898,3 PSL), um an Tag drei wieder minimal auf 4583,7 PSL (1471,3 PSL – 22080,5 PSL) zu sinken. Lediglich an Tag fünf übertrifft der Median mit 6484,4 PSL (2330,9 PSL – 22024,6 PSL) alle vorangegangenen Werte deutlich. Dieser finalen Anstieg findet sich auch in der Studiengruppe wieder, wobei hier der präoperative Wert nicht übertroffen wird.

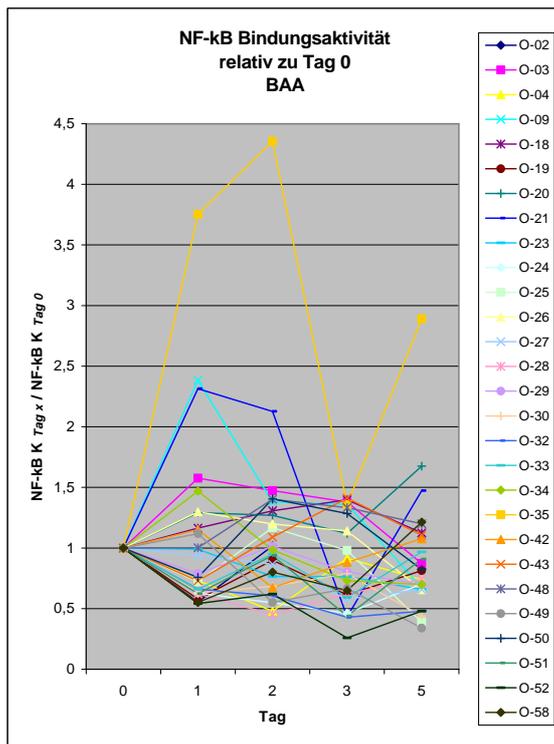
In der nachfolgenden Abbildung 11 wird der Verlauf der Mediane der Bindungsaktivität, wie oben beschrieben, als Boxplots dargestellt. Dies dient darüber hinaus einer Gegenüberstellung der beiden Gruppen.



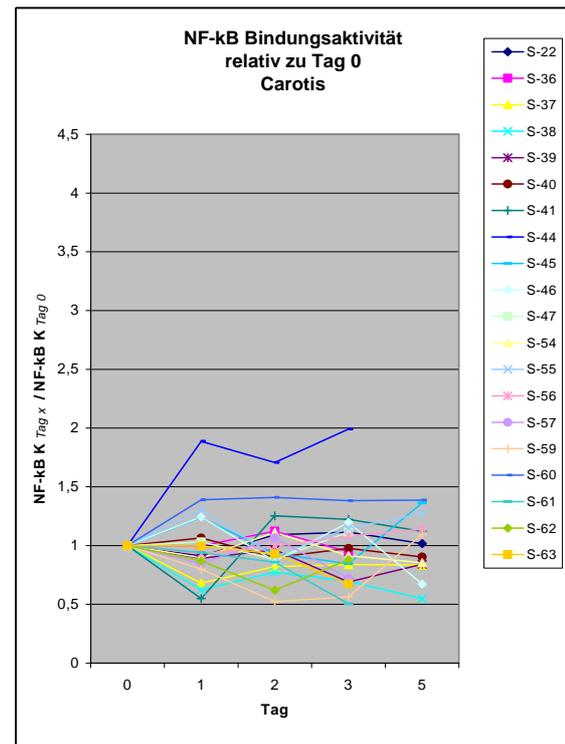
**Abbildung 11:** Verlauf der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität der Bauchortenaneurysma-Patienten (grau) und Carotis-Patienten (weiß) in PSL über die fünf Messzeitpunkte, dargestellt als Boxplots (Mediane, 5-, 25-, 75 und 95%-Perzentile)

### 3.3.2 NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität relativ zu Tag null

Da die NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität eine große Streubreite aufweist, erscheint es sinnvoller diese zum Zweck der Deskription jeweils für die einzelnen Patienten an den unterschiedlichen Messzeitpunkten auf Tag null zu beziehen. Somit ergeben sich an Tag eins bis Tag fünf Quotienten, um die sich die jeweilige Bindungsaktivität im Vergleich zu Tag null verändert. Diese Zielgröße wird im Folgenden als NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität relativ zu Tag null bezeichnet und besitzt keine Einheit, da es sich hierbei lediglich um einen Multiplikationsfaktor handelt.



**Abbildung 12:** Verlauf der NF-κB Bindungsaktivität relativ zu Tag null der Bauchortenaneurysma-Patienten (BAA) (O-02 – O-58) über die fünf Messzeitpunkte



**Abbildung 13:** Verlauf der NF-κB Bindungsaktivität relativ zu Tag null der Carotis-Patienten (S-22 – S-63) über die fünf Messzeitpunkte

Wird zunächst der graphische Verlauf der NF-κB Bindungsaktivität relativ zu Tag null der 28 Patienten der Studiengruppe betrachtet (Abbildung 12), zeigen sich ebenfalls heterogene Verläufe. Die meisten Patienten bewegen sich hierbei im Bereich zwischen 0,25 und 2,5. Lediglich ein Patient (O-35) reißt aus diesem Feld aus und erreicht Werte bis 4,36. Die Vergleichsgruppe (Abbildung 13) liegt im Vergleich zur Studiengruppe rein graphisch betrachtet mit ihren 20 Patientenverläufen in einem engeren Bereich. Dieser erstreckt sich von  $> 0,5$  bis  $< 2$ , während der der BAA-Patienten eine Spannweite von  $> 0,25$  bis  $< 2,5$  aufweist. Am ersten postoperativen Tag liegen 18 Patienten in der Studiengruppe (64,3%) im Bereich kleiner / gleich eins und die restlichen 10 Patienten (35,7%) im Bereich größer eins. Somit ist an Tag eins bei weniger als der Hälfte ein Anstieg der Bindungsaktivität im Vergleich zum präoperativen Wert zu beobachten, während die Bindungsaktivität der Mehrheit in demselben Zeitraum abfällt oder gleich bleibt. Dies widerspricht dem, bei der absoluten Bindungsaktivität beobachteten Anstieg an Tag eins.

Auch in der Vergleichsgruppe liegt der Großteil mit 14 Patienten (70%) am ersten postoperativen Tag im Bereich kleiner / gleich eins, während nur sechs Patienten (30%) über eins liegen, was jedoch im Gegensatz zur Studiengruppe hier dem Abfall des Medians der absoluten Bindungsaktivität an Tag eins entspricht.

Wird der Verlauf des Medians der Bindungsaktivität in Relation zu Tag null in der Studiengruppe betrachtet (vergleiche Tabelle 11), so lässt sich am ersten postoperativen Tag einen Abfall des Medians auf 0,77 (0,54 – 3,75) beobachten, der dort sein Verlaufsminimum erreicht, um an Tag zwei seinen Maximalwert bei 0,97 (0,45 – 4,36) zu erlangen und über Tag drei mit 0,79 (0,26 – 1,41) bis an Tag fünf mit 0,78 (0,34 – 2,89) wieder fast auf den Wert an Tag eins abzusinken.

**Tabelle 11:** Bauchaortenaneurysma-Patienten: Median, Minimum und Maximum der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität relativ zu Tag null an den fünf Messzeitpunkten

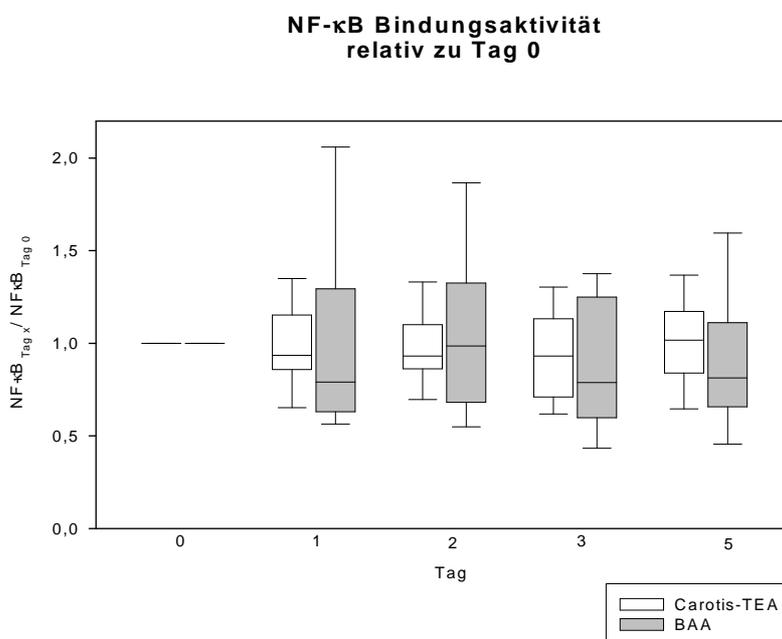
Tag	0	1	2	3	5
Median	1,00	0,77	0,97	0,79	0,78
Minimum	1,00	0,54	0,45	0,26	0,34
Maximum	1,00	3,75	4,36	1,41	2,89

Im Verlauf des Medians der BA relativ zu Tag null in der Vergleichsgruppe, zeigen sich im Gegensatz zur Studiengruppe kaum Veränderungen (vergleiche Tabelle 12). An Tag eins, zwei und drei bleibt er konstant bei 0,93 und steigt lediglich an Tag fünf auf 1,02 (0,55 - 1,39) an, während in der Studiengruppe kein einziges Mal ein Wert über 1 erreicht wird. Wie auch schon graphisch beschrieben, weist auch in die Abfolge der Zahlenwerte in der Vergleichsgruppe geringere Schwankungen auf als in der Versuchsgruppe. Zudem liegt der Median der Vergleichsgruppe zu jedem Messzeitpunkt, mit Ausnahme des zweiten Tages, über dem der Studiengruppe, was bei der absoluten Bindungsaktivität nie der Fall ist.

**Tabelle 12:** Carotis-Patienten: Median, Minimum und Maximum der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität relativ zu Tag null an den fünf Messzeitpunkten

Tag	0	1	2	3	5
Median	1,00	0,93	0,93	0,93	1,02
Minimum	1,00	0,55	0,52	0,50	0,55
Maximum	1,00	1,89	1,71	1,99	1,39

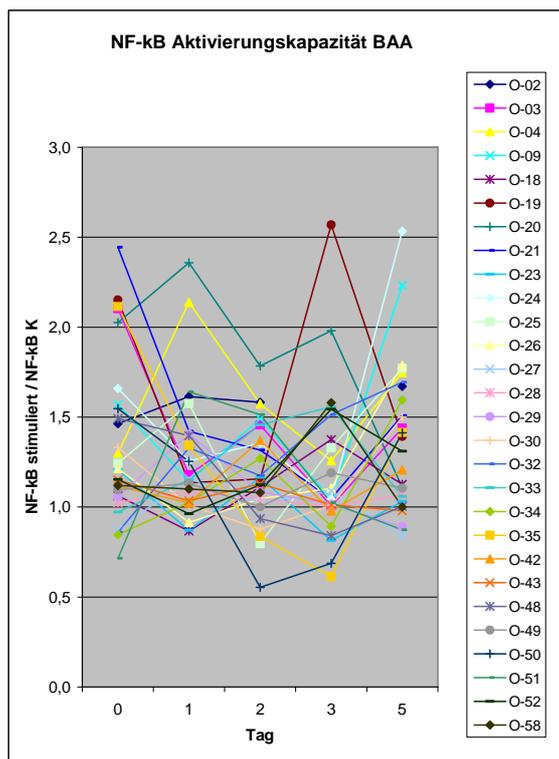
Folgendes Boxplot-Diagramm (Abbildung 14) führt den Unterschied zwischen den beiden Gruppen noch einmal graphisch vor Augen. Die relative Konstanz der Vergleichsgruppe im Gegensatz zur Versuchsgruppe ist hier offensichtlich.



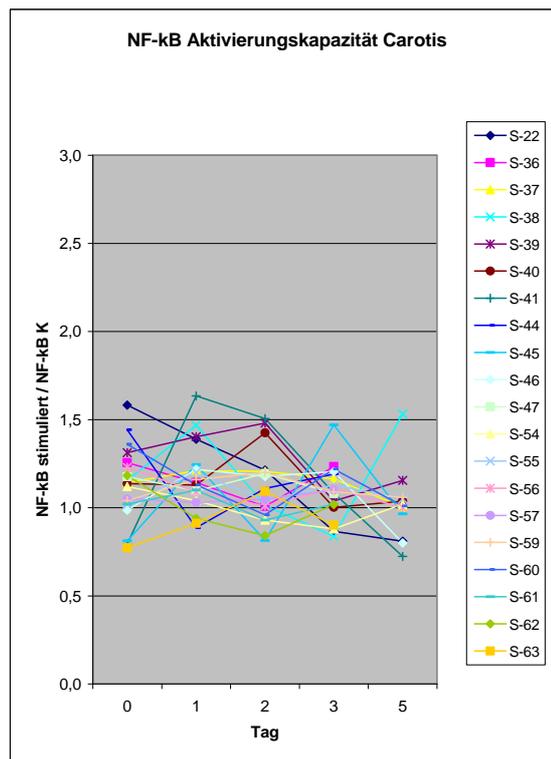
**Abbildung 14:** Verlauf der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität relativ zu Tag null der Bauchaortenaneurysma-Patienten (grau) und Carotis-Patienten (weiß) über die fünf Messzeitpunkte, dargestellt als Boxplots (Mediane, 5-, 25-, 75 und 95%-Perzentile)

### 3.3.3 NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität

Die NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität (NF- $\kappa$ B stimuliert / NF- $\kappa$ B K) bezeichnet das Vielfache, um das die Bindungsaktivität durch Stimulation mit 10 ng TNF- $\alpha$  im Vergleich zum unstimulierten Ausgangswert gesteigert werden kann und ist somit ein durch in-vitro-Stimulation erzeugter Wert. Da es sich hierbei um einen Quotienten handelt, besitzt diese Zielgröße keine Einheit.



**Abbildung 15:** Verlauf der NF-κB Aktivierungskapazität der Bauchortenaneurysma-Patienten (BAA) (O-02 – O-58) über die fünf Messzeitpunkte



**Abbildung 16:** Verlauf der NF-κB Aktivierungskapazität der Carotis-Patienten (S-22 – S-63) über die fünf Messzeitpunkte

Bei der Betrachtung des graphischen Verlaufs der NF-κB Aktivierungskapazität der 28 Patienten der Studiengruppe (BAA) (Abbildung 15), wird ersichtlich, dass zehn Patienten (35,7%), und somit weniger als die Hälfte, in ihrem gesamten Verlauf kleiner / gleich 1,5 bleiben. Die restlichen 18 Patienten (64,3%) erreichen in ihrem Gesamtverlauf auch Werte über 1,5, wobei der höchste Wert eines Patienten (O-19) hier bei 2,6 und der niedrigste Wert eines Patienten (O-50) bei 0,6 liegt. Kein einziger Patient bewegt sich in seinem Verlauf ausschließlich über 1,5 oder ausschließlich unter 1,0. Es muss allerdings vermerkt werden, dass hier keine einheitlichen Tendenzen zu erkennen sind. Rein graphisch betrachtet, liegen die meisten Patienten zwischen 1,0 und 1,5 und reißen mit einzelnen Werten aus dieser Spanne aus.

Der graphische Verlauf der NF-κB Aktivierungskapazität der 20 Patienten der Vergleichsgruppe (Abbildung 16) zeigt, dass 17 Patienten (85%), und somit deutlich mehr als in der Studiengruppe mit 35,7%, in ihrem gesamten Verlauf kleiner/gleich 1,5 bleiben. Die restlichen drei Patienten (15%) erreichen in ihrem

Gesamtverlauf auch Werte über 1,5, wobei der höchste Wert eines Patienten (S-22; S-41) hier bei 1,6 und der niedrigste Wert eines Patienten (S-41) bei 0,7 liegt. Somit sind in der Gruppe der Carotis-Patienten, im Vergleich zur Versuchsgruppe, deutlich mehr Patienten zu finden, die in ihrem Gesamtverlauf unter 1,5 liegen. Hierbei handelt es sich um eine Differenz von 49,3%. Umgekehrt weisen auch deutlich weniger Patienten Werte über 1,5 auf. In der Vergleichsgruppe finden sich hier lediglich 15%, während es in der Studiengruppe 64,3% sind. Zudem zeigen sich bei den Carotis-Patienten maximal Werte bis 1,6, während bei den BAA-Patienten Spitzenwerte bis 2,6 erreicht werden. Aber genau wie in der BAA-Gruppe bewegt sich in der Carotis-Gruppe kein einziger Patient in seinem Verlauf ausschließlich über 1,5 oder ausschließlich unter eins. Wie schon in der Versuchsgruppe sind auch hier kaum einheitliche Tendenzen zu erkennen. Rein graphisch betrachtet liegen die meisten Patientenverläufe der Vergleichsgruppe in einem Bereich zwischen 0,8 und 1,3 und reißen mit einzelnen Werten aus dieser Spanne aus. Somit zeigt sich bereits graphisch, dass die Vergleichsgruppe im Gesamtverlauf etwas tiefer liegt als die Versuchsgruppe. In Tabelle 13 und 14 wird dies mit Hilfe des Medians der NF- $\kappa$ B AK deutlich.

**Tabelle 13:** Bauchaortenaneurysma-Patienten: Median, Minimum und Maximum der NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität an den fünf Messzeitpunkten

Tag	0	1	2	3	5
Median	1,21	1,15	1,14	1,05	1,35
Minimum	0,72	0,87	0,55	0,61	0,84
Maximum	2,44	2,36	1,78	2,57	2,53

Der präoperative Wert an Tag null hat in der Studiengruppe (Tabelle 13) einen Median von 1,21 (0,72 - 2,44). Der größte Teil der Patienten liegt hierbei mit der präoperativen Aktivierungskapazität in dem Bereich zwischen  $>1$  und  $\leq 1,5$ . In diesem Bereich befinden sich 15 von 28 Patienten (53,6%). Zusammenfassend verdeutlicht der Verlauf des Medians der Aktivierungskapazität über die fünf Messzeitpunkte, dass der präoperative Wert mit 1,21 (0,72 - 2,44) im Vergleich zu Tag eins mit 1,15 (0,87 - 2,36), Tag zwei mit 1,14 (0,55 - 1,78) und Tag drei mit 1,05 (0,61 - 2,57) höher liegt. Postoperativ fällt er somit zunächst über die ersten drei Tage immer weiter ab, um dann jedoch an Tag fünf sogar über den

präoperativen Wert hinaus zu steigen und einen Wert von 1,35 (0,84 - 2,53) zu erreichen.

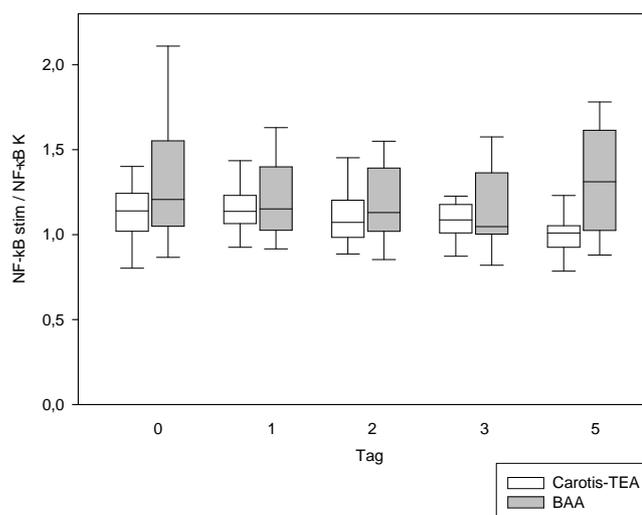
**Tabelle 14:** Carotis-Patienten: Median, Minimum und Maximum der NF-κB Aktivierungskapazität an den fünf Messzeitpunkten

Tag	0	1	2	3	5
Median	1,14	1,14	1,07	1,09	1,01
Minimum	0,77	0,89	0,81	0,84	0,72
Maximum	1,58	1,63	1,51	1,47	1,53

In der Vergleichsgruppe (Tabelle 14) liegt der präoperative Wert der Aktivierungskapazität an Tag null bei einem Median von 1,14 (0,77 - 1,58). Der größte Teil der Patienten liegt hierbei mit der präoperativen Aktivierungskapazität ebenfalls in dem Bereich zwischen  $>1$  und  $\leq 1,5$ . In diesem Bereich befinden sich 12 von 20 Patienten (60%). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Verlauf des Medians der Aktivierungskapazität über die fünf Messzeitpunkte in der Vergleichsgruppe weniger große Schwankungen aufweist. Bei der Vergleichsgruppe gibt es eine maximale Differenz zwischen dem Median zweier verschiedener Messzeitpunkte von 0,13, während in der Studiengruppe eine Differenz von bis zu 0,30 zu finden ist. Der erste postoperative Wert in der Carotis-Gruppe zeigt mit einem Median von 1,14 (0,89 - 1,63) gar keine Veränderung im Vergleich zum präoperativen Wert. An Tag zwei fällt der Median etwas ab auf 1,07 (0,81 - 1,51), um an Tag drei geringfügig auf 1,09 (0,84 - 1,47) anzusteigen. Der fünfte postoperative Tag zeigt mit 1,01 (0,72 - 1,53) den niedrigsten Wert von allen Messzeitpunkten. In der Studiengruppe ist der Verlauf genau gegenläufig. Allerdings konnten sieben Patienten der Carotis-Gruppe an diesem Tag nicht mehr erfasst werden, da sie bereits entlassen worden waren.

In der nachfolgenden Abbildung 17 ist der Verlauf der Mediane, wie oben beschrieben, als Boxplots dargestellt und die beiden Gruppen gegenübergestellt. Hier wird deutlich, dass der Median der Studiengruppe außer an Tag drei zu jedem Zeitpunkt über dem der Vergleichsgruppe liegt. Am größten ist der Unterschied eindeutig an Tag fünf.

**NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität**  
 (NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität nach Stimulation mit TNF / NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität)



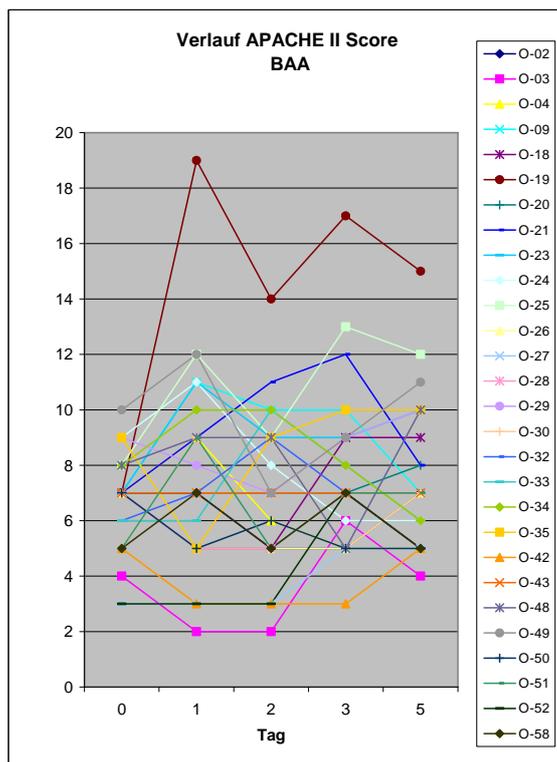
**Abbildung 17:** Verlauf der NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität der Bauchaortenaneurysma-Patienten (grau) und Carotis-Patienten (weiß) über die fünf Messzeitpunkte, dargestellt als Boxplots (Mediane, 5-, 25-, 75 und 95%-Perzentile)

### **3.4 Verlauf der klinischen Scores**

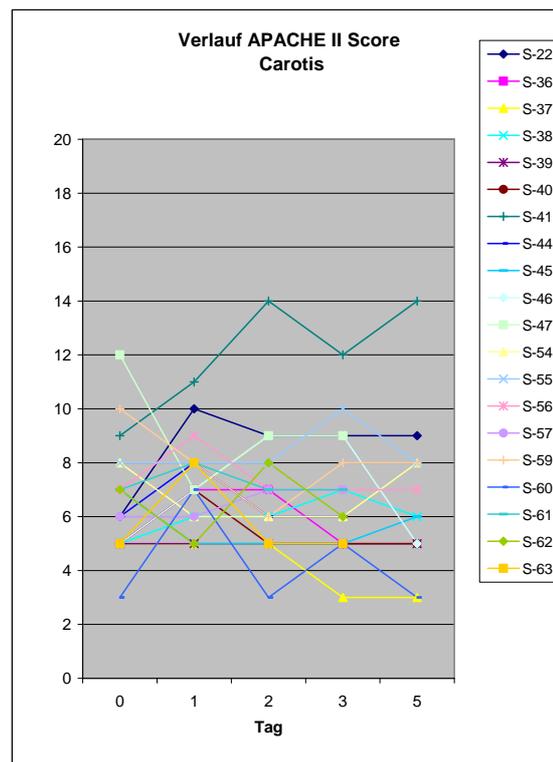
Zu jedem Messzeitpunkt wurden, zusätzlich zu oben beschriebenen laborchemisch erfassten Werten, Scorewerte für die einzelnen Patienten anhand klinischer Parameter berechnet (siehe Material und Methoden). Hierbei wurden der SAPS II und der APACHE II Score bestimmt, deren Verläufe im Folgenden beschrieben werden sollen.

#### **3.4.1 Verlauf des APACHE II Scores**

Der Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II Score (APACHE II) erreicht als prognostischer Score zur Schweregradklassifikation für Intensivpatienten Werte zwischen 0 und 68. Ein Normbereich im eigentlichen Sinne existiert hierbei nicht. Ein gesunder Patient würde abhängig vom Alter Werte zwischen 0 und 6 erreichen.



**Abbildung 18:** Verlauf des Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) Scores der Bauchaortenaneurysma-Patienten (BAA) (O-02 – O-58) über die fünf Messzeitpunkte



**Abbildung 19:** Verlauf des Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) Scores der Carotis-Patienten (S-22 – S-63) über die fünf Messzeitpunkte

Wird der graphische Verlauf des APACHE II Scores der BAA-Patienten in der Gesamtschau in Abbildung 18 betrachtet, sind kaum einheitliche Tendenzen und nur geringe Werteänderungen innerhalb der einzelnen Patientenverläufe erkennbar. An Tag eins scheinen die Werte des Scores tendenziell anzusteigen und danach über die folgenden Tage wieder etwas abzufallen. Klare Tendenzen sind hierbei jedoch nicht auszumachen. Lediglich als auffällig zu bezeichnen ist der Verlauf von Patient O-19, der alle anderen Patienten übersteigt und Scorewerte bis 19 (Tag eins) erreicht, während die übrigen Patienten maximal bis zu einem Wert von 13 gelangen.

Auch in der Gesamtschau der Vergleichsgruppe in Abbildung 19 sind kaum einheitliche Tendenzen auszumachen. Auch hier steigen, rein graphisch betrachtet, die Werte an Tag eins leicht an, um im Anschluss daran wieder etwas zurückzugehen. Insgesamt liegen die Werte der Carotis-Patienten auch minimal niedriger, als die der BAA-Patienten. In der Vergleichsgruppe bricht ebenfalls ein Patient (S-41) aus dem Kollektiv aus, da er mit Maximalwerten bis 14 höhere Werte als die restlichen Patienten erreicht, die höchstens Werte bis 12 aufweisen.

Dieses uneinheitliche Gesamtbild spiegelt sich sehr deutlich im Median der APACHE II Scorewerte wieder (Tabelle 15 und 16). Dieser zeigt in der Studiengruppe über den gesamten Erfassungszeitraum keinerlei Veränderungen und stagniert bei einem Wert von 7 (siehe Tabelle 15). Hierbei befinden sich präoperativ innerhalb des dem Alter entsprechenden Normbereiches lediglich vier Patienten (14,3%).

**Tabelle 15:** Bauchaortenaneurysma-Patienten: Median, Minimum und Maximum des Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) Scores an den fünf Messzeitpunkten

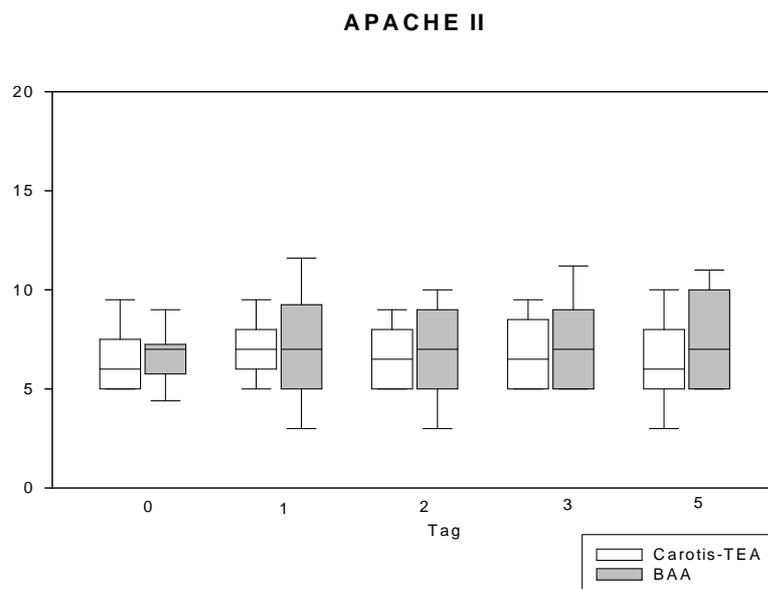
Tag	0	1	2	3	5
Median	7	7	7	7	7
Minimum	3	2	2	3	4
Maximum	10	19	14	17	15

Im Verlauf des Medians der APACHE II Scorewerte der Vergleichsgruppe sind die graphischen Tendenzen sichtbarer, als bei den BAA Patienten (vgl. Tabelle 16). In dieser liegt der präoperative Median bei 6 (3 - 12). Hierbei befinden sich acht Patienten (40%) in ihrem altersentsprechenden Normbereich, also knapp 25% mehr als in der Studiengruppe. Am ersten postoperativen Tag steigt der Median auf 7 (5 - 11) an um über Tag zwei mit 6,5 (3 - 14) und Tag drei mit ebenfalls 6,5 (3 - 12) bis an Tag fünf wieder auf 6 (3 - 14) abzufallen.

**Tabelle 16:** Carotis-Patienten: Median, Minimum und Maximum des Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) Scores an den fünf Messzeitpunkten

Tag	0	1	2	3	5
Median	6	7	6,5	6,5	6
Minimum	3	5	3	3	3
Maximum	12	11	14	12	14

Im folgenden Diagramm (Abbildung 20) sind die beiden Gruppen noch als Boxplots einander gegenübergestellt. Auch hier werden die geringen Werteveränderungen sehr deutlich sichtbar. Darüber hinaus lässt sich ablesen, dass die Studiengruppe zu jedem Messzeitpunkt, außer Tag eins, höher liegt als die Vergleichsgruppe.



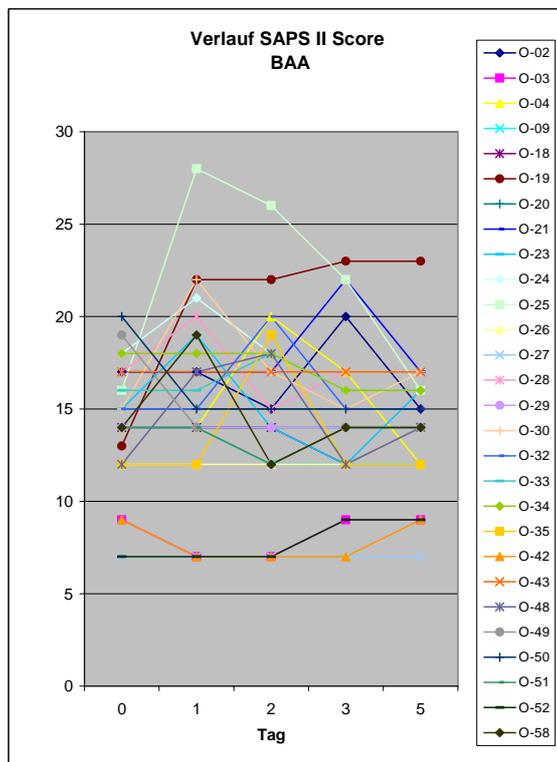
**Abbildung 20:** Verlauf des Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) Scores der Bauchaortenaneurysma-Patienten (grau) und Carotis-Patienten (weiß) über die fünf Messzeitpunkte (von links nach rechts: Tag 0, 1, 2, 3, 5), dargestellt als Boxplots (Mediane, 5-, 25-, 75 und 95%-Perzentile)

### 3.4.2 Verlauf des SAPS II Scores

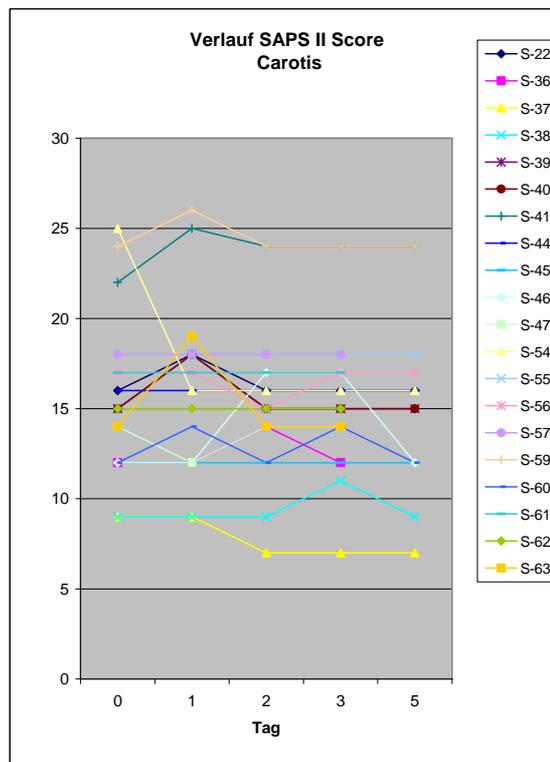
Der Simplified Acute Physiology II Score (SAPS II) dient ebenfalls als prognostischer Score zur Schweregradklassifikation und erreicht Werte zwischen 0 und 163. Der altersabhängige Normbereich für gesunde Patienten liegt hier zwischen 0 und 18 (siehe Material Methoden).

Wird der graphische Verlauf des SAPS II Scores der BAA-Patienten im Übersichtsdiagramm Abbildung 21 betrachtet, sind kaum einheitliche Tendenzen erkennbar. An Tag eins scheint der Wert allgemein etwas anzusteigen, während an den restlichen Tagen überhaupt keine eindeutige Richtung mehr erkennbar ist. Klare Tendenzen sind hier somit, wie bereits bei dem APACHE II Score, nicht auszumachen. Andererseits gibt es aber auch keine so deutlichen Ausreißer wie bei ersterem. Patient O-19 erweist sich wiederum als etwas auffällig, da er auch hier zum Großteil über dem restlichen Kollektiv liegt, allerdings mit einer geringeren Differenz als bei dem APACHE II Verlauf. Zudem fällt Patient O-25 ins

Auge, der sich am ersten und zweiten postoperativen Tag deutlich über dem Restkollektiv befindet.



**Abbildung 21:** Verlauf des Simplified Acute Physiology II (SAPS II) Scores der Bauchaortenaneurysma-Patienten (BAA) (O-02 – O-58) über die fünf Messzeitpunkte



**Abbildung 22:** Verlauf des Simplified Acute Physiology II (SAPS II) Scores der Carotis-Patienten (S-22 – S-63) über die fünf Messzeitpunkte

Der Verlauf des SAPS II Scores im Übersichtsdiagramm Abbildung 22 der Carotis-Patienten zeigt ähnlich wenige einheitliche Tendenzen, wie bei den BAA-Patienten. Auch hier kommt es rein graphisch an Tag eins zu einem leichten Werteanstieg, der über die darauf folgenden Tage wieder rückläufig ist. Allerdings weisen die Patienten innerhalb ihrer Verläufe weniger Werteschwankungen auf als in der Studiengruppe. Patient S-41 und S-59 reißen nach oben hin aus und liegen mit ihren Werten im Gesamtverlauf über dem restlichen Kollektiv. Die Maximaldifferenz beträgt hierbei sieben.

Tabelle 17 und 18 machen diese uneinheitlichen Tendenzen durch den Verlauf des Medians deutlich. Präoperativ liegt der Median in der Studiengruppe bei 14 (7 - 20) (siehe Tabelle 17). Hierbei befinden sich lediglich sieben Patienten (25%) in ihrem altersentsprechenden Normbereich. Am ersten postoperativen Tag kommt es zu einem leichten Anstieg auf 15 (7 - 28), der an Tag zwei bei 15 (7 - 26)

persistiert, um an Tag drei wieder auf 14 (7 - 23) zurückzufallen und diesen Wert bis Tag fünf beizubehalten.

**Tabelle 17:** Bauchaortenaneurysma-Patienten: Median, Minimum und Maximum des Simplified Acute Physiology II (SAPS II) Scores an den fünf Messzeitpunkten

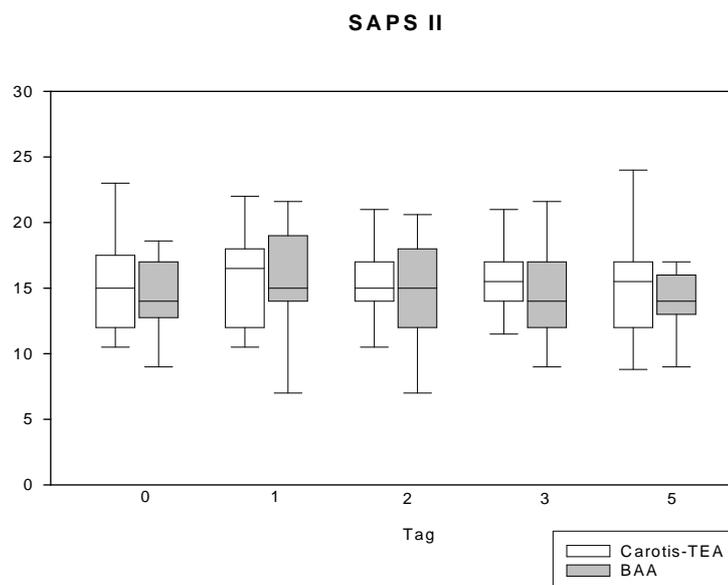
Tag	0	1	2	3	5
Median	14	15	15	14	14
Minimum	7	7	7	7	7
Maximum	20	28	26	23	23

**Tabelle 18:** Carotis-Patienten: Median, Minimum und Maximum des Simplified Acute Physiology II (SAPS II) Scores an den fünf Messzeitpunkten

Tag	0	1	2	3	5
Median	15	16,5	15	15,5	15,5
Minimum	9	9	7	7	7
Maximum	25	26	24	24	24

Auch der Verlauf des Medians der SAPS II Scorewerte in der Vergleichsgruppe weist keine nennenswerten Schwankungen auf (siehe Tabelle 18). Allerdings liegt der Median der SAPS II Scorewerte in der Vergleichsgruppe, außer an Tag zwei, immer um 1 bis 1,5 höher als in der Studiengruppe, was bei dem APACHE II Score umgekehrt ist. Präoperativ findet sich ein Median von 15 (9 - 25), wobei 7 Patienten (35%) innerhalb ihrer altersentsprechenden, gesunden Norm liegen, was 10% mehr sind als in der Studiengruppe. Diese Diskrepanz zwischen den Gruppen ist geringer als beim APACHE II Score. Postoperativ steigt der Median an Tag eins auf 16,5 (9 - 26), fällt an Tag zwei wieder auf 15 (7 - 24), um an Tag drei und fünf wieder leicht auf 15,5 (7 - 24) anzusteigen. Auch hier sind also nur sehr geringe Schwankungen beobachtbar.

Das folgende Boxplotdiagramm (Abbildung 23) stellt die oben beschriebenen Verläufe und Unterschiede noch im Gruppenvergleich heraus und macht deutlich, dass die Versuchsgruppe im Median etwas tiefer liegt als die Vergleichsgruppe. Von relevanten Unterschieden kann allerdings nicht gesprochen werden.



**Abbildung 23:** Verlauf des Simplified Acute Physiology II (SAPS II) Scores der Bauchaortenaneurysma-Patienten (grau) und Carotis-Patienten (weiß) über die fünf Messzeitpunkte (von links nach rechts: Tag 0, 1, 2, 3, 5), dargestellt als Boxplots (Mediane, 5-, 25-, 75 und 95%-Perzentile)

### 3.5 Korrelationsanalyse

Nachdem im Vorfeld nun alle Zielgrößen in ihrem Verlauf deskriptiv erläutert wurden, sollen sie nun noch auf ihre Kreuzkorrelationen untereinander überprüft werden. Insbesondere soll hier der Frage nachgegangen werden, ob zwischen den von NF- $\kappa$ B abgeleiteten Zielgrößen, Korrelationen mit den oben genannten Entzündungsparametern oder Scores bestehen. Die Korrelationsanalyse wurde mit Hilfe des Spearmans Korrelationskoeffizienten durchgeführt, wobei jeweils eine der drei von NF- $\kappa$ B abgeleiteten Größen (BA oder BA relativ zu Tag 0 oder AK) mit den Leukozytenwerten, CRP-Werten, den SAPS II-Werten und den APACHE II-Werten korreliert wurden. Hierbei wurde einerseits die Kreuzkorrelation an den verschiedenen Messzeitpunkten und andererseits die Korrelation der NF- $\kappa$ B Zielgröße präoperativ, zu den postoperativen Entzündungsparametern bzw. Scores, betrachtet.

Im Bezug auf die Bindungsaktivität der Studiengruppe ergeben sich fast keine statistisch signifikanten Korrelationen. Im Einzelnen zeigt die Bindungsaktivität der

BAA-Patienten weder mit den Leukozytenwerten noch mit den CRP-Werten oder dem SAPS II Score an den fünf Messzeitpunkten eine signifikante Kreuzkorrelation. Auch die präoperative Bindungsaktivität zeigt keine signifikante Korrelation zu den postoperativen Entzündungs- oder Scorewerten. Lediglich zu dem APACHE II Score ergibt sich eine statistisch signifikante positive ( $r=0,05$ ) Kreuzkorrelation an Tag zwei ( $r_{SP} = 0,385$ ).

In der Vergleichsgruppe finden sich bei der Bindungsaktivität mehr signifikante Korrelationen als in der Studiengruppe, wobei es sich hier um gegenläufige Korrelationen handelt. So zeigt sich an Tag fünf eine signifikant ( $r=0,05$ ) gegensinnige Kreuzkorrelation zum CRP-Wert ( $r_{SP}= -0,687$ ) und am selben Tag eine hochsignifikant ( $r=0,01$ ) gegensinnige Kreuzkorrelation zum SAPS II-Wert ( $r_{SP}=-0,624$ ) und APACHE II-Wert ( $r_{SP}=-0,752$ ). Auch an Tag eins findet sich eine hochsignifikant gegensinnige Kreuzkorrelation zum SAPS II-Wert ( $r_{SP}=-0,568$ ). Ebenso finden sich signifikant gegensinnige Kreuzkorrelationen ( $r=0,05$ ) zwischen der präoperativen Bindungsaktivität und dem postoperativen CRP-Wert an Tag fünf ( $r_{SP}=-0,685$ ), dem postoperativen SAPS II-Wert an Tag eins ( $r_{SP}=-0,473$ ) und Tag fünf ( $r_{SP}= -0,698$ ) und dem postoperativen APACHE II-Wert an Tag fünf ( $r_{SP}=-0,808$ ), wobei es sich bei beiden letzteren um hochsignifikant negative Korrelationen handelt ( $r=0,01$ ).

Bei der Korrelationsanalyse der Bindungsaktivität relativ zu Tag null findet sich in beiden Gruppen lediglich eine signifikante Korrelation. Diese ergibt sich als signifikant gegensinnige Kreuzkorrelation ( $r=0,05$ ) in der Studiengruppe an Tag eins mit dem SAPS II-Wert ( $r_{SP}=-0,438$ ). Auch bezüglich der Aktivierungskapazität ergibt sich in beiden Gruppen nur eine einzige statistisch signifikante Korrelation: Die präoperative Aktivierungskapazität der Studiengruppe ist hierbei signifikant gegensinnig ( $r=0,05$ ) mit dem CRP-Wert am ersten postoperativen Tag korreliert ( $r_{SP}=-0,393$ ). Somit finden sich insgesamt sehr wenig statistisch signifikante Korrelationen.

Allerdings fällt bei der Betrachtung der Korrelation der präoperativen Bindungsaktivität bzw. Aktivierungskapazität mit den postoperativen Scorewerten auf, dass in der Studiengruppe die Korrelationen zwischen der präoperativen Bindungsaktivität oder Aktivierungskapazität mit den klinischen Scores vorwiegend positiv sind, während sie bei der Vergleichsgruppe vorwiegend negativ sind.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Einleitung**

Die Sepsis stellt ein häufiges, komplexes und schwerwiegendes Problem auf Intensivstationen dar (Engel et al. 2007) und ist daher unter anderem mit enormen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden (Daniels 2007). Trotz hoher Inzidenz- und Mortalitätsraten sind ihre pathophysiologischen Vorgänge noch nicht gänzlich aufgeklärt.

In der Pathogenese scheinen sowohl eine Überregulation der inflammatorischen Immunantwort, als auch eine potentielle Immunparalyse eine Rolle zu spielen (Hotchkiss et al. 2003). Hierzu existieren einerseits Theorien, die davon ausgehen, dass es initial zu einer Überregulation im Sinne eines SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrom) kommt, welche dann eine Phase der kompensatorischen, anti-inflammatorischen Antwort nach sich zieht (Gogos et al. 2000). Andererseits gibt es auch Untersuchungen, die zeigen, dass eine Immunparalyse als Erstreaktion möglich ist (Weighardt et al. 2002).

Diese gegensätzlichen Befunde belegen die Notwendigkeit eines immunologisch-inflammatorischen Monitorings in der Klinik, um besonders gefährdete Patienten zu identifizieren und adäquat zu therapieren.

Der Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) hat in der Regulation des Immunsystems eine entscheidende Bedeutung, da er sowohl eine pro- als auch eine anti-inflammatorische Wirkung vermittelt (Lawrence et al. 2001). Er scheint somit auch in der Pathophysiologie der Sepsis eine wichtige Rolle zu spielen (Liu & Malik 2006). In Patientenstudien gibt es Hinweise, dass die verstärkte Aktivität von NF- $\kappa$ B als Prädiktor für einen ungünstigen septischen Verlauf herangezogen werden kann (Böhrer et al. 1997; Arnalich et al. 2000; Paterson et al. 2000). Diese erhöhte Aktivität kann sich zum einen erst im Verlauf der Sepsis entwickeln (Paterson et al. 2000) oder z.B. schon präoperativ festgestellt werden (Foulds et al. 2001) und korreliert positiv mit einem letalen Ausgang. Andererseits herrscht Gewissheit, dass es ohne funktionierenden NF- $\kappa$ B Signalweg zu einer verstärkten Anfälligkeit für die Entwicklung einer Sepsis kommt (Gadjeva et al. 2004) und, dass eine ausreichende Aktivität von NF- $\kappa$ B für die

Terminierung einer Entzündung nötig ist, um eine angemessene anti-inflammatorische Antwort zu vermitteln (Hayden et al. 2006).

Diese Befunde unterstreichen zum einen, dass die Messung der Aktivität von NF- $\kappa$ B möglicherweise zum inflammatorischen Monitoring der Sepsis herangezogen werden kann. Zum anderen deuten die gegensätzlichen Befunde an, dass die genauen Mechanismen, in die der NF- $\kappa$ B Signalweg eingebunden ist, noch nicht exakt verstanden sind und es somit noch unklar ist, ob NF- $\kappa$ B nun ein eher schädlicher oder eher protektiver Faktor in der Sepsis ist (Senftleben 2003).

Zur Bestimmung des Aktivitätszustandes der NF- $\kappa$ B Signalkaskade werden von verschiedenen Wissenschaftlern unterschiedliche Methoden angewendet, die zum Großteil keinen Vergleich der einzelnen Studien untereinander ermöglichen (Böhrer et al. 1997; Nolan et al. 2000; Foulds et al. 2001). Den Goldstandard zur Messung der NF- $\kappa$ B Aktivität stellt der Electromobility Shift Assay (EMSA) dar, der die DNA-Bindungsaktivität der einzelnen NF- $\kappa$ B Proteine direkt anzeigt. Allerdings erlaubt der radioaktive Assay nur eine halbquantitative Aussage. Als Bezug werden abermals verschiedene Aspekte herangezogen, wie z.B. die Aktivität eines gesunden Kollektives (Arnalich et al. 2001) oder die Aktivität derselben Person am ersten gemessenen Zeitpunkt (Böhrer et al. 1997). Diese unterschiedlichen Herangehensweisen erschweren den Vergleich zusätzlich.

Die vorliegende Studie baut vor diesem Hintergrund auf einer vorangegangenen Dissertation auf, die sich mit der Etablierung und Evaluation einer standardisierten Methodik zur quantitativen Bestimmung der NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität in humanen Blutzellen mittels EMSA beschäftigte (Cordes 2008). Für diese Arbeit wurde die NF- $\kappa$ B Aktivität in mononukleären Zellen und T-Zellen gesunder Probanden untersucht. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse belegten, dass Immunzellen gesunder Probanden in deutlichem Umfang in der Lage waren, auf einen inflammatorischen Reiz im Sinne einer verstärkten p50/p65 Aktivität zu reagieren. Die Kapazität dieser Aktivierung erwies sich dabei am geeignetsten zur Beschreibung des Funktionszustandes des NF- $\kappa$ B Signalweges. Eine Einzelmessung einer unkontrollierten NF- $\kappa$ B Aktivität erschien hier aufgrund der großen individuellen Streuung weniger geeignet.

Die vorliegende Studie sollte nun diese im Vorfeld evaluierte und etablierte Methodik auf ein krankes Patientenkollektiv anwenden, um deren Ausweitungsmöglichkeit auf nicht gesunde Probanden zu überprüfen.

## **4.2 Probandenkollektiv**

Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs wurde in mononukleären Zellen des peripheren Blutes in der perioperativen Phase bei Patienten mit ausgedehnten abdominellen gefäßchirurgischen Eingriffen untersucht. Das schwere chirurgische Trauma diente als Modell der systemisch ablaufenden pathophysiologischen Vorgänge, wie sie zum Beispiel beim SIRS ablaufen, da es bekanntlich im Rahmen großer operativer Eingriffe regelhaft zu vergleichbaren inflammatorischen Prozessen kommt (Dietz & Daniel 2000; Hamilton-Davies et al. 1997; Janssens & Hanrath 1994). Die Kontrollgruppe besteht aus Patienten mit gering traumatisierenden gefäßchirurgischen Eingriffen.

Die Studiengruppe bildete sich aus 28 Patienten, welche eine Bauchortenaneurysma Operation erhielten, während die Vergleichsgruppe aus 20 Patienten bestand, bei denen eine Carotis Thrombendarterektomie (TEA) durchgeführt wurde. Die Carotis-Operation ist hierbei deutlich kürzer, weniger invasiv und mit einem besseren postoperativen Outcome verbunden, so dass diese Probandenkonstellation die Unterscheidung von Bagatelltrauma-assoziierten Effekten einerseits, von Vorgängen, die bei schwer traumatisierenden operativen Eingriffen und SIRS von Bedeutung sind andererseits, ermöglicht.

Hinsichtlich der demographischen Daten ist zu vermerken, dass sich die beiden Gruppen lediglich in zwei Punkten unterscheiden, nämlich im Bezug auf die Geschlechterverteilung und die Apoplexrate. Die Geschlechterverteilung zeigt eine starke Diskrepanz. Während in der Versuchsgruppe das Verhältnis weiblich/männlich 1/27 ist, liegt es in der Vergleichsgruppe bei 11/9. Dieser Unterschied lässt sich für die Versuchsgruppe durch die Epidemiologie des zugrunde liegenden Krankheitsbildes erklären. Das allgemeine Geschlechterverhältnis bei Bauchortenaneurysmen liegt hier bei eins zu fünf (weiblich zu männlich) (Singh et al. 2001). Was die Stenosen der Arteria Carotis interna betrifft, liegt hier eine ähnliche Geschlechterverteilung vor. Auch hier erkranken deutlich mehr Männer als Frauen (Eckstein et al. 1999). Diese Tatsache erklärt das Geschlechterverhältnis in der Vergleichsgruppe nur bedingt, da hier mehr Frauen als Männer operiert wurden. Vor diesem Hintergrund muss die Geschlechterverteilung der Carotis Patienten als zufallsbedingt betrachtet werden, da bei der Auswahl der Patienten das Geschlecht nicht berücksichtigt wurde.

Eine zweite eindeutige Diskrepanz zwischen den beiden Gruppen besteht in der Häufigkeit von Apoplex als Vorerkrankung, welche in der Vergleichsgruppe mit 50% deutlich höher liegt als in der Studiengruppe mit 4%. Dies lässt sich allerdings eindeutig auf die Grunderkrankung zurückführen, da Stenosen der ACI ein eindeutiger Risikofaktor für Schlaganfälle sind und hierbei 18% aller Schlaganfälle auf dieses Krankheitsbild zurückzuführen sind (siehe Erlanger Schlaganfallregister). Somit ist es nicht erstaunlich, dass in der Vergleichsgruppe deutlich mehr Schlaganfälle auftreten als in der Studiengruppe.

#### **4.3 Verlauf laborchemisch standardisierter Entzündungsparameter**

Im Rahmen großer operativer Eingriffe kommt es initial zu einer gesteigerten systemischen Entzündungsreaktion durch Traumatisierung von Gewebe, ausgeprägten Blutverlust mit Störungen der Mikrozirkulation und inadäquater Gewebsoxygenierung, vor allem im Bereich des Splanchnikusgebietes (Janssens & Hanrath 1994; Hamilton-Davies et al. 1997; Dietz & Daniel 2000; Chang et al. 2009). Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Studie anhand des postoperativen Anstiegs der Leukozytenzahl und des C-reaktiven Proteins bestätigt werden.

Im Bezug auf die Leukozytenzahl scheint das operative Trauma eine relativ einheitliche Reaktion hervorzurufen. In beiden Studiengruppen kommt es hierbei postoperativ zu einem reaktiven Anstieg der Leukozytenzahl, welche bereits am ersten postoperativen Tag sichtbar ist und relativ rasch ab Tag drei wieder rückläufig wird. Hierbei liegt der Median der Leukozytenzahl der Vergleichsgruppe zu jedem Messzeitpunkt unter dem der Studiengruppe, wobei in der Studiengruppe Maximalwerte bis  $14,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  erreicht werden, während in der Vergleichsgruppe nur ein Maximum bis  $12,4 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  zu verzeichnen ist. Darüber hinaus wird der Maximalwert des Medians in der Vergleichsgruppe erst an Tag zwei und nicht bereits an Tag eins, wie in der Studiengruppe erreicht. Das könnte darauf hindeuten, dass ein größeres Trauma, wie es in der BAA-Gruppe auftritt, zu einer höheren und gleichzeitig schnelleren Leukozytenaktivierung führt, was sich in der Leukozytenzahl widerspiegelt. Dies wird durch mehrere wissenschaftliche Studien belegt. Die neuesten aus dem Jahr 2008 und 2009 beobachteten ähnliche Verhältnisse für die Leukozytenzahl bei Patienten mit thorakalen

Aortenaneurysma-Operationen (Eggebrecht et al. 2008; Chang et al. 2009). Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Gruppen liegt darin, dass in der Studiengruppe an Tag fünf im Median wieder der präoperative Ausgangswert erreicht wird, während die Vergleichsgruppe hier noch über dem Tag null Wert liegt. Erklären ließe sich das so, dass an Tag fünf in der Vergleichsgruppe bereits sieben von 20 Patienten nicht mehr erfasst werden konnten, deren Allgemeinzustand zu diesem Zeitpunkt bereits so gut war, dass sie entlassen werden konnten. Wird die These von oben weitergeführt, wären das wahrscheinlich diejenigen Patienten mit der geringeren Leukozytenzahl, da es ihnen bereits klinisch besser ging. Somit wurden an Tag fünf nunmehr Patienten mit höheren Leukozytenzahlen erfasst, was sich in einem höheren Median widerspiegelt, als der der BAA-Gruppe, in der alle Patienten gleichermaßen erfasst werden konnten. Die Tatsache, dass in der Vergleichsgruppe bereits der Ausgangswert um  $1,5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  niedriger als in der Studiengruppe liegt, könnte darauf hindeuten, dass die BAA-Patienten sich auch präoperativ durch ihre schwerwiegendere Grunderkrankung von den Carotis-Patienten unterscheiden. Trotz allem kommt es in keiner der beiden Gruppen im Median zu einem Anstieg über den Normbereich von  $4,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  –  $10 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ , wobei sich knapp die Hälfte der Studiengruppe und  $\frac{3}{4}$  der Vergleichsgruppe im Gesamtverlauf unter der Obergrenze bewegen. Das bedeutet, dass der Leukozytenanstieg zwar sichtbar ist, aber genau genommen keine so großen Spitzen zeigt, wie es bei schweren Infektionen oder Tumorerkrankungen zu erwarten wäre. Somit ist dieser Anstieg mit großer Wahrscheinlichkeit lediglich auf die Operation zurückzuführen. Zudem zeigt dies, dass es postoperativ zu keinem stark klinisch relevanten inflammatorischen Geschehen, wie man es bei einer Sepsis oder SIRS erwarten würde, kommt und die Patienten zum Großteil komplikationslos operiert wurden. Beim CRP-Wert ist ebenfalls ein eindeutiger postoperativer Anstieg sichtbar, welcher die Zunahme der Leukozytenzahl weit übertrifft. Dieser Wert reagiert normalerweise deutlich sensibler als die Leukozytenzahl auf operative Traumen (Eggebrecht et al. 2008). So werden in der Studiengruppe beispielsweise Maximalwerte erreicht, die das 30,5-fache der Obergrenze des Normbereiches sind, während es bei den Leukozyten an dieser Stelle lediglich das 1,4-fache ist. Somit löst das durch die Operation gesetzte Trauma einen eindeutig reaktiven Anstieg der CRP-Konzentration aus, welcher um einiges steiler und höher verläuft

als der der Leukozytenzahl. Zudem scheint dieser Anstieg auch länger zu persistieren, als der der Leukozyten. Auch diese Beobachtung wird in der oben erwähnten, im Jahre 2008 von Eggenbrecht et al. durchgeführten, Studie bestätigt (Eggenbrecht et al. 2008). Der bereits bei den Leukozyten deutliche Gruppenunterschied ist beim CRP-Wert noch viel auffälliger. Während beispielsweise in der Studiengruppe Maximalwerte bis 305 mg/l erreicht werden, finden sich in der Vergleichsgruppe nur Maxima bis 130,6 mg/l. Zudem kommt es in der Vergleichsgruppe, im Vergleich zur Studiengruppe, zu einem weniger starken Anstieg der CRP-Werte bis Tag zwei. Bereits einen Tag früher als bei der Studiengruppe fallen diese Werte wieder ab. Somit wird auch hier, wie bereits beim Leukozytenverlauf, deutlich, dass das größere Trauma der Aneurysma-Operation eine deutlich größere reaktive Antwort nach sich zieht, als das geringe Trauma der Carotis-Operation.

#### **4.4 Verlauf der von NF- $\kappa$ B abgeleiteten Zielgrößen**

In vitro Studien haben gezeigt, dass alle oben genannten trauma-assoziierten Faktoren zelluläre Signaltransduktionswege induzieren können (Flohe et al. 1997; Abraham 2000; Guha & Mackman 2001; Chen LY et al. 2009). Es handelt sich dabei um spezifisch aktivierbare, kaskadenförmig ablaufende, molekulare Mechanismen, wodurch die Zelle auf extrazelluläre „Stresssignale“, wie sie zusammen mit Ischämie/Reperfusion, Bakteriämie und oxidativem Stress auftreten, reagiert. Tiermodelle zeigen übereinstimmend, dass eben diese Prozesse, wie sie auch im Verlauf großer chirurgischer Eingriffe auftreten können, zur Aktivierung des in dem vorliegenden Projekt betrachteten IKK/NF- $\kappa$ B Systems führen (Chang et al. 2001; Kato et al. 2002; Theo et al. 2002; Kuboki et al. 2008). Ferner sind im Tiermodell Sepsis, ARDS und Multiorganversagen mit einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B assoziiert (Shenkar et al. 1996; Abraham 2000; Gjertsson et al. 2001; Liu & Malik 2006). Es gibt Hinweise, dass NF- $\kappa$ B in der Frühphase von Entzündungsreaktionen über positive Rückkopplungsmechanismen und andauernde Transkription proinflammatorischer Gene die Inflammation unterhält oder gar weiter aufschaukelt. Allerdings kommt es im weiteren Verlauf auch zur Induktion antiinflammatorischer Gene durch NF- $\kappa$ B, wodurch es auch an der Auflösung einer Inflammation entscheidend beteiligt ist (Lawrence et al. 2001).

Vor diesem Hintergrund soll nun der Frage nachgegangen werden, ob in der vorliegenden Studie hinsichtlich Zeitpunkt, Ausmaß und Dauer der Veränderung der Bindungsaktivität und der Aktivierungskapazität von NF- $\kappa$ B in mononukleären Zellen bei Patienten mit schwerem und leichtem chirurgischen Trauma Unterschiede bestehen. Bereits durch den Verlauf von CRP und Leukozyten wurde deutlich, dass es zu einer inflammatorischen Reaktion auf das Trauma kommt. Nun stellt sich die Frage, inwieweit dies auch im NF- $\kappa$ B System sichtbar zu machen ist.

#### **4.4.1 NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität (NF- $\kappa$ B K)**

Die NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität (NF- $\kappa$ B Kontrolle = NF- $\kappa$ B K = BA) bezeichnet den unstimulierten, reinen NF- $\kappa$ B Wert, der an den jeweiligen Messzeitpunkten in PSL gemessen wird. Im Vergleich der beiden Gruppen, können hier Unterschiede hinsichtlich Zeitpunkt, Ausmaß und Dauer der Veränderung der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität festgestellt werden.

Zusammenfassend wird in der Studiengruppe postoperativ einen Werteanstieg der Bindungsaktivität im Median bis zu einem Peak an Tag zwei beobachtet. An Tag drei fällt sie unter den präoperativen Wert, um an Tag fünf wieder leicht anzusteigen, aber immer noch unter dem Ausgangswert zu bleiben. Dieser Verlauf könnte dafür sprechen, dass es durch das Trauma der Operation zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B kommt, was bereits, wie oben beschreiben, in etlichen Studien belegt ist (Chang et al. 2001; Kato et al. 2002; Theo et al. 2002; Kuboki et al. 2008). Der Abfall an Tag drei unter den präoperativen Wert könnte als eine Art „Erschöpfungsreaktion“ gedeutet werden, der eine Regenerationsphase folgt, welche im Anstieg an Tag fünf sichtbar wird.

In der Vergleichsgruppe zeigt sich hingegen während der ersten vier Tage kein so großer Werteanstieg der Bindungsaktivität im Median, wie das in der Studiengruppe der Fall ist. Lediglich an Tag fünf übertrifft der Median alle vorangegangenen Werte deutlich. Somit scheint die Carotis TEA Operation kaum eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B Systems hervorzurufen, was ihren Status als vergleichendes Bagatelltrauma verdeutlicht. Der finale Anstieg der Bindungsaktivität an Tag fünf muss wahrscheinlich auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass zu diesem Zeitpunkt bereits sieben Patienten der Vergleichsgruppe nicht mehr erfasst werden konnten, da sie aufgrund ihres guten

Allgemeinzustandes aus der stationären Behandlung entlassen worden waren. Somit wurden an diesem Punkt nur noch Patienten mit potentiell schlechterem AZ erfasst, was sich in einer höheren Bindungsaktivität widerspiegelt. Zudem liegt der Median der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität der Vergleichsgruppe zu jedem Messzeitpunkt unter dem der Versuchsgruppe mit einer Maximaldifferenz von etwa 4300 PSL an Tag 2. Wie schon bei dem Median der Leukozytenzahl beobachtet, liegt die NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität der BAA-Patienten auch präoperativ über der der Carotis-Patienten. Diese Tatsache könnte sich ebenfalls wieder auf die schwerwiegendere Grunderkrankung der Studiengruppe zurückführen lassen, die sich somit bereits präoperativ auch in der Bindungsaktivität zeigt.

Somit sieht man hier, wie auch schon bei den Leukozyten und CRP-Werten, einen Unterschied zwischen dem Einfluss des schweren Traumas und des Bagateltraumas auf die NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität. Während diese durch das schwere Trauma der BAA-Operation im Median aktiviert wird, zeigt sich bei der Carotis TEA keine Aktivierung, sondern sogar ein leichter Abfall.

#### **4.4.2 NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität relativ zu Tag null**

Da die NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität eine sehr große Streubreite aufweist, erscheint es sinnvoll, diese jeweils für die einzelnen Patienten an den unterschiedlichen Messzeitpunkten auf Tag null zu beziehen, ähnlich wie bei Böhler et al. (Böhler et al. 1997). Somit ergeben sich an Tag eins bis fünf Quotienten, um die sich die jeweilige Bindungsaktivität im Vergleich zu Tag null verändert. Diese Zielgröße wird im Folgenden als NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität relativ zu Tag null (BA rel. 0) bezeichnet und besitzt keine Einheit, da es sich hierbei lediglich um einen Multiplikationsfaktor handelt.

Zusammenfassend sind auch hier in der Studiengruppe größere Veränderungen wahrnehmbar als in der Vergleichsgruppe. Erstere erreicht ihr postoperatives Maximum des Medians der BA rel. 0 ebenfalls an Tag zwei, um danach wieder zurückzugehen, während die Vergleichsgruppe über Tag eins, zwei und drei konstant bleibt, um erst wieder an Tag fünf anzusteigen, wie auch schon bei der absoluten BA beobachtet. Allerdings muss festgehalten werden, dass hier der Median der BA rel. 0 in der Vergleichsgruppe an allen postoperativen Tagen außer Tag zwei über dem der Studiengruppe liegt, was bei der absoluten BA genau umgekehrt ist. Darüber hinaus wird in der Studiengruppe zu keinem und in der

Vergleichsgruppe nur an einem Zeitpunkt postoperativ ein größerer Wert als eins erreicht. Dies bedeutet, dass die Bindungsaktivität postoperativ bei dem Großteil der Patienten nicht den präoperativen Ausgangswert überschreitet sondern tendenziell niedriger liegt. Somit findet eigentlich keine Aktivierung der reinen BA über den Ausgangswert hinaus statt. Und damit muss die bei der absoluten BA beobachtete Aktivierung von NF- $\kappa$ B auf die zu große Streuung zurückgeführt werden und kann nicht als gegebene Tatsache interpretieren werden. Wahrscheinlicher ist, dass es hier postoperativ initial zu einer Art „Immunparalyse“ kommt, welche auch von Adib-Conquy et al. bereits als mögliche Konstellation beschrieben wurde, bei der es posttraumatisch zu einem Rückgang der NF- $\kappa$ B Aktivität kommt (Adib-Conquy et al. 2000 + 2001). Trotz allem ist aber auch bei dieser Größe der Unterschied zwischen beiden Gruppen sichtbar, da in der Studiengruppe nach einem postoperativen Abfall der BA rel. 0, ein mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Operation zurückzuführender, reaktiver Anstieg erfolgt, welcher bei seinem Peak an Tag zwei über dem Median der Vergleichsgruppe liegt. Unterdessen sind in der Vergleichsgruppe keine relevanten Veränderungen beobachtbar.

#### 4.4.3 NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität

Die NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität (NF- $\kappa$ B stimuliert / NF- $\kappa$ B K) bezeichnet das Vielfache, um das die Bindungsaktivität durch Stimulation mit 10 ng TNF- $\alpha$  im Vergleich zum unstimulierten Ausgangswert gesteigert werden kann und ist somit ein durch in-vitro-Stimulation erzeugter Wert. Da es sich hierbei um einen Quotienten handelt, besitzt diese Zielgröße keine Einheit.

Auch bei dieser Größe finden sich wieder Unterschiede in Umfang, Dauer und Ausmaß der Veränderungen zwischen beiden Gruppen.

In der Studiengruppe fällt der Median vom präoperativen Wert von 1,21 postoperativ zunächst über die ersten drei Tage immer weiter bis auf 1,05 ab, um dann jedoch an Tag fünf sogar über den präoperativen Wert auf 1,35 anzusteigen. Das könnte so gedeutet werden, dass die Patienten initial, im präoperativen, gesunden Zustand noch relativ viele Kapazitäten in ihrem inflammatorischen System besitzen, die durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  aktiviert werden können. Durch das Trauma der Operation gehen diese Kapazitäten zunächst über die ersten drei postoperativen Tage zurück, da der Körper hier bereits inflammatorisch tätig ist

und dadurch weniger „inflammatorische Ressourcen“ besitzt. Der Anstieg an Tag fünf könnte auf eine Erholung hinweisen und bedeuten, dass die Patienten jetzt wieder mehr inflammatorische Kapazitäten besitzen, die gerade nicht mobilisiert sind. Die Tatsache, dass dieser terminale Anstieg den präoperativen Wert übertrifft, könnte so interpretiert werden, dass der Körper nach einem stattgehabten inflammatorischen Ereignis in der Erholungsphase - durch diese vor kurzem stattgefundene inflammatorische Aktivität - mehr Ressourcen besitzt, die aktiviert werden können. Durch eben dieses inflammatorische Ereignis würde also eine Art „Triggerung“ des Immunsystems stattfinden, was sich dann auch in der NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität widerspiegelt. Dies würde im Umkehrschluss wiederum die Tatsache erklären, dass bereits die präoperative AK in der Studiengruppe im Median mit 1,21 höher liegt als in der Vergleichsgruppe mit 1,14, da die BAA-Patienten durch den permanenten Stimulus ihre schwerwiegendere Grunderkrankung bereits der oben beschriebenen „Triggerung“ unterliegen und somit von Anfang an über größere Kapazitäten verfügen.

Der erste postoperative Wert in der Carotis-Gruppe zeigt mit einem Median von 1,14 gar keine Veränderung im Vergleich zum präoperativen Wert. An Tag zwei fällt er etwas auf 1,07 ab, um an Tag drei geringfügig auf 1,09 anzusteigen. Der fünfte postoperative Tag zeigt mit 1,01 den tiefsten Wert aller Messzeitpunkten, was in der Studiengruppe genau umgekehrt ist. Dieser Verlauf an Tag fünf steht somit im starken Gegensatz zu dem der Versuchsgruppe, die hier den höchsten Median aller fünf Messzeitpunkte aufweist. Allerdings könnte das daran liegen, dass in der Vergleichsgruppe zu diesem Zeitpunkt bereits sieben von 20 Patienten entlassen waren, denen es schon so gut ging, dass sie keine weitere stationäre Behandlung benötigten. Wird die These weiterverfolgt, dass der Anstieg an Tag fünf in der Versuchsgruppe, darauf zurückzuführen sei, dass es den Patienten wieder besser geht, würde der Verlauf in der Vergleichsgruppe diese These nicht widerlegen, da die gesündesten Patienten hier nicht mehr erfasst werden konnten. Im Vergleich der beiden Gruppen weist somit bereits präoperativ die Versuchsgruppe im Median mit 1,21 eine höhere AK auf als die Vergleichsgruppe mit 1,14. Dies spiegelt sich auch darin wider, dass in der Vergleichsgruppe initial 35% der Patienten nicht stimulierbar sind, da sie Aktivierungskapazitäten von  $\leq 1$  aufweisen, was 13,6% mehr sind als in der Studiengruppe mit 21,4%.

Auch postoperativ liegt die Studiengruppe außer an Tag drei im Median immer über der Vergleichsgruppe. Das zeigt, dass in der Gruppe der BAA-Patienten zwar initial höhere inflammatorische Kapazitäten vorhanden sind, diese jedoch stärker ausgeschöpft werden als in der Vergleichsgruppe, da bei den Carotis-Patienten die maximale Differenz zwischen höchstem und tiefstem Median bei 0,13 und bei den BAA-Patienten bei 0,30 liegt. Zudem liegt die Studiengruppe an Tag drei im Median mit 1,05 unter dem der Carotis Patienten mit 1,09.

Wie auch schon bei allen im Vorfeld beschriebenen Größen sind auch hier im Verlauf des Medians der Aktivierungskapazität über die fünf Messzeitpunkte in der Vergleichsgruppe weniger große Schwankungen als in der Studiengruppe sichtbar. Diese geringeren Schwankungen in der Vergleichsgruppe weisen, wie schon bei den anderen Größen, darauf hin, dass der operative Eingriff an der Carotis ein geringeres Trauma setzt, als eine Bauchortenaneurysma Operation und darum die NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität geringfügiger verändert wird. Dafür würde sprechen, dass der Median am ersten postoperativen Tag sogar dem präoperativen Wert entspricht und nicht gleich abfällt wie in der Studiengruppe. Erst am zweiten postoperativen Messzeitpunkt sieht man einen Abfall, der ebenso wie in der Studiengruppe ein Hinweis darauf sein könnte, dass das Immunsystem bereits aktiviert ist und somit die Kapazität, gemessen an NF- $\kappa$ B, vermindert ist.

Somit initiiert das operative Trauma bei der Aktivierungskapazität, im Gegensatz zu den anderen betrachteten Größen, einen Werteabfall, wodurch die Ausschöpfung der inflammatorischen Ressourcen durch das Trauma deutlich zu werden scheint, welche um so größer zu sein scheint, je größer der traumatische Eingriff ist.

Diese Beobachtungen und Theorien können nicht durch Studien belegt werden, da das Modell der NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität ein bisher unerforschter neuer Ansatz ist, der der Bestätigung oder Widerlegung durch nachfolgende Studien bedarf.

#### **4.5 Verlauf der klinischen Scores**

Neuere klinische Studien am Menschen zeigen, dass eine exzessive Steigerung der Aktivität von NF- $\kappa$ B während des „Systemic Inflammatory Response Syndrom“ (SIRS) und Sepsis mit einer erhöhten Mortalität einherzugehen scheint (Böhler et

al. 1997; Arnalich et al. 2000; Paterson et al. 2000). Der prädikative Wert entsprach hierbei dem APACHE II Score (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation), einem etablierten Bewertungssystem für Schweregrad und Prognose der Erkrankung von Intensivpatienten (Böhrer et al. 1997; Arnalich et al. 2000). Ferner war in einer Arbeit an Patienten mit chirurgischer Versorgung von thorakalen Aortenaneurysmen eine erhöhte präoperative Aktivierung des NF- $\kappa$ B Systems mit vermehrten postoperativen Komplikationen in Form von Multiorganversagen assoziiert (Foulds et al. 2001). Andererseits demonstriert eine weitere Studie an Patienten mit schwerem Trauma, dass NF- $\kappa$ B Aktivierung die Apoptose neutrophiler Granulozyten hemmen und die Entstehung von Multiorganversagen vermindern kann (Nolan et al. 2000).

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Studie zu jedem Messzeitpunkt zusätzlich zu oben beschriebenen laborchemisch erfassten Werten, Scorewerte für die einzelnen Patienten anhand klinischer Parameter berechnet. Hierbei wurde der Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II) und der Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II Score (APACHE II) bestimmt, welche im klinischen Alltag als prognostische Scores zur Schweregradklassifikation für Intensivpatienten verwendet werden. In der vorliegenden Studie sollten sie die Quantifizierung des klinischen Zustandes der Patienten erlauben, um somit Vergleiche zu den anderen Zielgrößen herstellen und die Auswirkungen der Operation auf den körperlichen Zustand der Patienten erfassen zu können.

Der APACHE II Score kann Werte zwischen 0 und 68 erreichen, wobei hier höhere Werte mit schlechterem klinischen Outcome und größerem Mortalitätsrisiko korrelieren (Knaus et al. 1985). Der altersabhängige Normbereich liegt hier zwischen 0 und 6. Der SAPS II Score dient ebenfalls als prognostischer Score zur Schweregradklassifikation mit ähnlicher Aussagekraft wie der APACHE II Score und erreicht Werte zwischen 0 und 163 (Le Gall et al. 1993). Der altersabhängige Normbereich für gesunde Patienten liegt hier zwischen 0 und 18. Der Unterschied zwischen den beiden Scores liegt darin, dass sie teilweise unterschiedliche klinische Parameter einbeziehen und hier auch die Schwerpunkte anders legen.

#### 4.5.1 Verlauf des APACHE II Scores

Bereits rein graphisch betrachtet, zeigt dieser Score in der Studiengruppe und in der Vergleichsgruppe relativ uneinheitliche Tendenzen bei den verschiedenen Patienten. In der Studiengruppe spiegelt sich dies nachdrücklich im Verlauf des Medians über die fünf Messzeitpunkte wieder. Dieser zeigt über den gesamten Erfassungszeitraum keinerlei Veränderungen und stagniert bei einem Wert von sieben. Da dieser Wert nur einen Punktwert über der Obergrenze des Normbereiches liegt, ist er als sehr gering anzusehen und stellt in keinem Fall eine Reaktion auf das operative Trauma dar.

In der Vergleichsgruppe liegt der präoperative Median bei sechs und somit einen Punkt tiefer als in der Studiengruppe. Hierbei liegen acht Patienten (40%) in ihrem altersentsprechenden Normbereich, während sich in der Studiengruppe hier lediglich vier (14,3%) Patienten finden. Somit liegen in der Vergleichsgruppe präoperativ deutlich mehr Patienten in ihrem altersentsprechenden Normbereich als in der Studiengruppe. Dies könnte sich auf die schwerwiegenderen Grunderkrankungen der Patienten der Studiengruppe zurückführen lassen, die anhand klinischer Parameter ebenfalls erfasst werden und hier auch schon präoperativ ins Gewicht fallen. Somit zeigt sich auch beim APACHE II Score so wie bei den anderen Zielgrößen bereits präoperativ ein Gruppenunterschied. Am ersten postoperativen Tag steigt der Median in der Vergleichsgruppe auf sieben an, um über Tag zwei und Tag drei mit jeweils 6,5 bis an Tag fünf wieder auf sechs abzufallen. Somit ist in bei den Carotis-Patienten im Gegensatz zu den BAA-Patienten eine leichte Reaktion des Scores auf die Operation zu bemerken. Trotz allem kann hier allerdings kaum von relevanten Werteveränderungen gesprochen werden, da die Differenzen sehr gering sind.

Aus der Tatsache, dass trotz des großen operativen Eingriffes der Aneurysma Operation keinerlei Medianveränderungen in der Studiengruppe bemerkbar und nur geringe Veränderungen in der Vergleichsgruppe sichtbar sind, muss abgeleitet werden, dass der APACHE II Score ungeeignet für den hier angestrebten Zweck ist. Somit lässt sich mit diesem Score hier keine Aussage über den postoperativen klinischen Zustand der Patienten machen. Erklären lässt sich diese Tatsache damit, dass dieser Score eigentlich für die Beurteilung von schwer kranken Intensivpatienten entworfen wurde. Somit ist er für die postoperativen Veränderungen der Studienpatienten zu unsensibel, da diese „zu gesund“ für

diesen Score sind. Das wird deutlich, wenn der Verlauf der Scorewerte bei Patient O-19, dem einzigen Ausreißer der Studiengruppe, betrachtet wird. Dieser übersteigt alle anderen Patienten und erreicht Scorewerte bis 19, während die restlichen Patienten maximal 13 erlangen. Bei Patient O-19 handelt es sich um einen 67-jährigen Patienten mit arterieller Hypertonie, Hyperlipoproteinemie und PAVK im Stadium 2a, der als einziger Patient, von allen in die Studie eingeschlossenen, alle fünf postoperativ erfassten Tage wegen vorwiegend renalen Komplikationen auf der Intensivstation verbracht hat. Alle anderen Patienten hatten eine postoperative Intensivaufenthaltsdauer von null bis maximal drei Tagen. Dadurch lässt sich der hohe Scorewert bei diesem Patienten leicht erklären und die eigentliche Auslegung des APACHE II Scores für Intensivpatienten wird somit deutlich.

In der Vergleichsgruppe bricht ebenfalls ein Patient (S-41) aus dem Kollektiv aus, da er mit Maximalwerten bis 14 höhere Werte als die restlichen Patienten erreicht, die maximal Werte bis 12 aufweisen.

Hierbei handelt es sich um einen 76-jährigen Patienten, der sich nicht durch postoperative Komplikationen von dem Kollektiv unterscheidet, sondern lediglich im Vorerkrankungsprofil. Dieser Patient weist zusätzlich zu einer aHT, PAVK und einem Zustand nach Apoplex, welches Krankheitsbilder sind, die auch bei den anderen Patienten zu finden sind, noch eine Niereninsuffizienz aus, die hier mit den erhöhten Retentionsparametern in den Scorewert eingeht, der somit höher liegt als bei nierengesunden Patienten.

Zusammenfassend muss also festgehalten werden, dass der APACHE II Score zwar kleine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen aufweist, dass er allerdings für das hier betrachtete Patientengut zu unspezifisch und unsensibel ist. Somit lassen sich keine Aussagen anhand dieses Scores über den Einfluss des operativen Traumas auf den klinischen Zustand der Patienten treffen.

#### **4.5.2 Verlauf des SAPS II Scores**

Im Gegensatz zum APACHE II Score sind bei dem SAPS II Score auch in der Studiengruppe Werteveränderungen zu erkennen. Präoperativ liegt der Median des SAPS II Scores der Studiengruppe bei 14. Am ersten postoperativen Tag kommt es zu einem leichten Anstieg auf 15, der an Tag zwei persistiert, um an Tag drei wieder auf 14 zurückzufallen und diesen Wert bis Tag fünf beizubehalten.

Aber auch hier kann nicht von relevanten Veränderungen gesprochen werden, die das schwere Trauma der Operation widerspiegeln würden. Dafür sind die Änderungen zu gering und befinden sich zudem nur knapp über dem Durchschnittsalter von 67,7 Jahren entsprechenden Normbereich von 12.

Auch der Verlauf des Medians der SAPS II Scorewerte in der Vergleichsgruppe weist keine nennenswerten Schwankungen auf und verläuft ebenfalls nur knapp oberhalb des Normbereiches, der hier für ein Durchschnittsalter von 70,02 bei 15 liegt. Allerdings liegt der Median der SAPS II Scorewerte in der Vergleichsgruppe, bis auf Tag zwei, immer um eins bis 1,5 höher als in der Studiengruppe, was bei dem APACHE II Score umgekehrt ist. Postoperativ steigt der Median an Tag eins von einem präoperativen Wert von 15 auf 16,5, fällt an Tag zwei wieder auf 15, um an Tag 3 und 5 auf 15,5 wieder leicht anzusteigen. Auch hier sind also nur sehr geringe Schwankungen beobachtbar, die kaum das operative Trauma wiedergeben. Die Tatsache, dass die Vergleichsgruppe höhere Werte aufweist als die Studiengruppe, deutet darauf hin, dass andere Werte mehr ins Gewicht fallen als beispielsweise beim APACHE II Score. Der Unterschied zwischen den beiden Scores liegt zum einen in einer unterschiedlichen Punktevergabe für die einbezogenen Parameter, wobei beim APACHE II Score pro Parameter maximal vier Punkte für pathologische Normabweichungen vergeben werden, während beim SAPS II Score hier Punkte bis 26 vergeben werden. Außerdem werden einigen Parametern in dem einen Score erfasst und in dem anderen nicht. So geht in den APACHE II Score der Hämatokrit und die Atemfrequenz mit ein, welche im SAPS II Score nicht berücksichtigt werden, während hier das Bilirubin ins Gewicht fällt, welches der APACHE II Score nicht erfasst. Die übrigen Parameter sind in beiden Scores ähnlich oder gleich.

Die Tatsache, dass die Vergleichsgruppe beim SAPS II Score im Median höhere Werte aufweist als die Studiengruppe, ist allerdings lediglich auf das Durchschnittsalter der beiden Gruppen zurückzuführen. Dieses liegt in der Studiengruppe mit 67,7 Jahren etwas tiefer als in der Vergleichsgruppe mit 70,02 Jahren. Dieser Unterschied fällt bei der Erhebung des SAPS II Scores ins Gewicht, da für ein Alter von 60 bis 69, 12 Punkte und für ein Alter von 70 bis 74, 15 Punkte vergeben werden. Beim APACHE II Score erhalten alle Patienten zwischen 65 und 74 hingegen dieselbe Punktzahl von fünf, wodurch der Unterschied hier nicht sichtbar ist.

Als Ausreißer fällt in der Studiengruppe wieder Patient O-19 auf, der sich auch hier über dem Kollektiv befindet, was sich wieder auf seinen längeren Intensivaufenthalt zurückführen lässt. Zudem sticht hier noch Patient O-25 heraus, der an den ersten beiden postoperativen Tagen alle anderen Patienten übertrifft. Dies lässt sich auf eine postoperativ aufgetretene Bilirubinerhöhung zurückführen, die beim SAPS II Score sehr stark berücksichtigt wird und beim Restkollektiv der Studiengruppe nicht auftritt. In der Vergleichsgruppe hingegen gibt es ebenfalls einen Patient mit ähnlich gewichtigen Bilirubinerhöhungen, der auch nach oben hin ausreißt (S-59). Der zweite Ausreißer ist hier wieder, wie schon beim APACHE II Score, Patient S-41, der durch seine erhöhten Retentionswerte das Kollektiv übertrifft.

Alles in allem wird jedoch deutlich, dass auch der SAPS II Score zu unspezifisch ist, um die Auswirkungen der Operation darzulegen. Auch hier handelt es sich nämlich um einen Score, der für Intensivpatienten entworfen wurde, was an den Ausreißern sichtbar wird. Dadurch ist er für diese Studie ebenfalls zu unsensibel. Somit wird ersichtlich, dass es den Studienpatienten postoperativ „zu gut“ ging, um hier relevante Scoreanstiege zu zeigen. Diese Tatsache impliziert auch, dass es bei keinem Patient zu postoperativem MODS oder gar Tod kam und somit auch keine Aussage hinsichtlich des prädikativen Wertes der Zielgrößen bezüglich MODS oder Mortalität gemacht werden kann, wie das beispielsweise bei Foulds et al. möglich war (Foulds et al. 2001). Hier entsprach der prädikative Wert der NF- $\kappa$ B Aktivität dem des APACHE II Scores. Somit kann auch nicht von den präoperativen Werten der NF- $\kappa$ B Zielgrößen auf das postoperative klinische Outcome der Patienten geschlossen werden wie bei Foulds et al., da dieses zu unsensibel erfasst wurde. Auch die Studien von Böhler et al. und Arnalich et al., bei denen der Anstieg der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität vergleichbar mit dem APACHE II Score war, können mit dem vorliegenden Projekt nicht bestätigt oder widerlegt werden, da es den hiesigen Patienten im Gegensatz zu denen der anderen Studien „zu gut“ ging (Böhler et al. 1997; Arnalich et al. 2000).

#### **4.6 Korrelationsanalyse**

Die oben beschriebenen klinischen Studien am Menschen zeigen, dass eine exzessive Steigerung der Aktivität von NF- $\kappa$ B während des „Systemic

Inflammatory Response Syndrom“ (SIRS) und Sepsis mit einer erhöhten Mortalität einherzugehen scheint (Arnalich et al. 2000; Paterson et al. 2000; Böhler et al. 1997). Der prädikative Wert entspricht hierbei dem APACHE II Score (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation) (Arnalich et al. 2000; Böhler et al. 1997). Ferner war in einer Arbeit an Patienten mit chirurgischer Versorgung von thorakalen Aortenaneurysmen eine erhöhte präoperative Aktivierung des NF- $\kappa$ B Systems mit vermehrten postoperativen Komplikationen in Form von Multiorganversagen assoziiert (Foulds et al. 2001). Andererseits demonstriert eine weitere Studie an Patienten mit schwerem Trauma, dass NF- $\kappa$ B Aktivierung die Apoptose neutrophiler Granulozyten hemmen und die Entstehung von Multiorganversagen vermindern kann (Nolan et al. 2000).

Vor diesem Hintergrund wurden am Ende des vorliegenden Projektes Korrelationsanalysen mit Hilfe des Spearmans Korrelationskoeffizienten durchgeführt, um eventuell den vorausgehenden Studien vergleichbare Ergebnisse zu untersuchen.

In der Studiengruppe finden sich hierbei lediglich bei der Bindungsaktivität (BA) und der BA relativ zu Tag null signifikante Kreuzkorrelationen mit Score- bzw. Entzündungsparametern an den verschiedenen Messzeitpunkten. An Tag zwei zeigt hier die BA eine signifikant positive Korrelation ( $r=0,05$ ) mit dem APACHE II Score, was bedeutet, je höher die BA an Tag zwei ist, umso höher ist auch der APACHE II-Wert und umgekehrt. An Tag eins findet sich eine signifikant negative Korrelation ( $r=0,05$ ) zwischen der BA relativ zu Tag null und dem SAPS II Score. Dies impliziert, dass je höher die BA relativ zu Tag null an Tag eins ist, desto niedriger ist an diesem Tag der SAPS II-Wert und umgekehrt. Für die restlichen von NF- $\kappa$ B abgeleiteten Zielgrößen sind keine signifikanten Korrelationen in der Studiengruppe zu finden. Somit zeigen sich bei den BAA-Patienten insgesamt sehr wenige signifikante Kreuzkorrelationen, wodurch sich keine statistisch soliden Aussagen machen lassen.

In der Vergleichsgruppe finden sich lediglich bei der BA signifikante Korrelationen. Diese sind zwar häufiger als in der Studiengruppe, allerdings handelt es sich hierbei ausschließlich um signifikant gegensinnige Korrelationen. So ist die BA an Tag fünf signifikant negativ ( $r=0,05$ ) mit dem CRP Wert korreliert und hochsignifikant negativ ( $r=0,01$ ) mit dem APACHE II und dem SAPS II Wert. Mit letzterem ist sie zudem noch an Tag eins hochsignifikant negativ korreliert. Das

bedeutet, je höher die BA in der Vergleichsgruppe an Tag fünf ist, umso niedriger ist hier der CRP-, SAPS II- und APACHE II-Wert und umgekehrt. Für die restlichen Zielgrößen lassen sich in der Vergleichsgruppe keine signifikanten Kreuzkorrelationen ableiten. Somit finden sich auch in der Vergleichsgruppe insgesamt zu wenige Kreuzkorrelationen, um daraus eindeutige Schlüsse ziehen zu können.

Bei Korrelationsanalysen zwischen dem präoperativen Wert der von NF- $\kappa$ B abgeleiteten Zielgrößen (Bindungsaktivität und Aktivierungskapazität) mit den postoperativen klinischen Zielgrößen (Leukozyten, CRP, SAPS II, APACHE II) ergab sich in der Studiengruppe lediglich eine signifikant negative Korrelation ( $r=0,05$ ) zwischen der präoperativen AK und dem CRP-Wert an Tag eins. Dies könnte darauf hindeuten, dass, je tiefer die Aktivierungskapazität präoperativ ist, desto höher der CRP-Wert an Tag eins ist und umgekehrt.

In der Vergleichsgruppe finden sich signifikant gegensinnige Kreuzkorrelationen ( $r=0,05$ ) zwischen der präoperativen BA und dem postoperativen CRP-Wert an Tag fünf, dem postoperativen SAPS II-Wert an Tag eins und Tag fünf und dem postoperativen APACHE II-Wert an Tag fünf, wobei es sich bei beiden letzteren um hochsignifikant negative Korrelationen handelt ( $r=0,01$ ). Dies impliziert, dass je höher die präoperative BA in der Vergleichsgruppe ist, desto niedriger ist der CRP-Wert an Tag fünf, der SAPS II-Wert an Tag eins und fünf und der APACHE II-Wert an Tag fünf und umgekehrt.

Somit finden sich insgesamt auch hier sehr wenig statistisch signifikante Korrelationen.

Allerdings fällt bei der Betrachtung der Korrelation der präoperativen BA bzw. AK mit den postoperativen Scorewerten auf, dass die Korrelationen zwischen der präoperativen Bindungsaktivität oder Aktivierungskapazität und den klinischen Scores in der Studiengruppe vorwiegend positiv sind, während sie bei der Vergleichsgruppe vorwiegend negativ sind. In der Vergleichsgruppe finden sich bei der BA, wie oben beschrieben, sogar signifikante bis hochsignifikante negative Korrelationen.

Diese Beobachtung unterstreicht einerseits auf ein Neues den Unterschied zwischen der Studiengruppe und der Vergleichsgruppe. Andererseits sind die Verhältnisse dadurch ähnlich, wie in den oben beschriebenen Studien, in denen der prädikative Wert der NF- $\kappa$ B Aktivität dem APACHE II Score entsprach

(Arnalich et al. 2000; Böhler et al. 1997) bzw. eine erhöhte präoperative Aktivierung des NF- $\kappa$ B Systems mit vermehrten postoperativen Komplikationen in Form von Multiorganversagen assoziiert war (Foulds et al. 2001). Allerdings sind in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Korrelationen in diesem Zusammenhang zu finden, sondern lediglich Tendenzen, welche sich in der Studiengruppe und der Vergleichsgruppe jedoch deutlich unterscheiden. In der Studiengruppe, welche mit ihren Patienten den Probanden der von Foulds et al. beschriebenen Studie ähnelt, da diese einem großen Trauma ausgesetzt sind, wäre diese Tendenz somit eher mit dem Ergebnis der oben beschriebenen Studien vergleichbar. Allerdings muss an diesem Punkt darauf verwiesen werden, dass in der vorliegenden Studie kaum klinisch relevante Veränderungen in den Score-Werten aufgetreten sind, wodurch auch hier wieder keine statistisch soliden Aussagen daraus abgeleitet werden dürfen.

#### **4.7 Schlussfolgerung und Ausblick**

Zusammenfassend lässt sich in dieser Studie beobachten, dass es postoperativ zu einer reaktiven inflammatorischen Antwort kommt, was am Anstieg der Leukozyten und des CRPs deutlich wird. Dabei ist der CRP Anstieg deutlich relevanter als der Leukozytenanstieg, was belegt, dass es sich hier mit großer Wahrscheinlichkeit um eine alleinige Reaktion auf das operative Trauma und nicht noch um ein zusätzliches inflammatorisches oder gar septisches Geschehen handelt. Zudem sind an diesen laborchemischen Parametern auch deutliche Unterschiede zwischen der Studien- und Vergleichsgruppe zu sehen, was das Bagateltrauma der Carotis-Operation im Gegensatz zu dem großen Trauma der Aortenaneurysma-Operation verdeutlicht und die Unterteilung in Studien- und Vergleichsgruppe verifiziert.

Hinsichtlich der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität ist dieser Gruppenunterschied ebenfalls auszumachen, der sich bereits präoperativ durch einen höheren Median in der Studiengruppe bemerkbar macht und eventuell durch die schwerwiegendere Vorerkrankung der Studiengruppe bedingt sein könnte. Dieses Phänomen tritt auch bei den Leukozytenwerten auf und könnte hier auf die Grunderkrankung zurückgeführt werden. Der vermeintliche postoperativ reaktive NF- $\kappa$ B Bindungsanstieg der Studiengruppe bis Tag zwei, der deutlich über den

stagnierenden Werten der Vergleichsgruppe liegt, wird durch die Ergebnisse der NF- $\kappa$ B BA relativ zu Tag null widerlegt. Letztere macht nämlich deutlich, dass es postoperativ im Median im Vergleich zum präoperativen Zustand nicht zu einem Werteanstieg, sondern – abfall kommt, wodurch angenommen werden muss, dass die Veränderungen der absoluten BA auf eine zu große Streuung zurückzuführen sind.

Aus dem Verlauf der BA relativ zu Tag null lässt sich folgern, dass es posttraumatisch eher zu einer Art „Immunparalyse“ wie bereits durch Adib-Conquy et al. bei Traumatpatienten beschrieben, kommt (Adib-Conquy et al. 2000). Diese Herunterregulierung der NF- $\kappa$ B Aktivität scheint in der vorliegenden Studie um so größer zu sein, je größer das Trauma ist, da sie in der Vergleichsgruppe weniger stark ausgeprägt ist als in der Studiengruppe.

Auch bei der AK ist bereits präoperativ ein Gruppenunterschied zu sehen, da die Studiengruppe hier etwas höher liegt als die Vergleichsgruppe. Als Deutungsmöglichkeit bietet sich hier an, anzunehmen, dass die BAA-Patienten durch ihre schwerwiegenderen Vorerkrankungen einer stärkeren „Triggerung“ des Immunsystems unterliegen, was sich im Sinne größerer „inflammatorischer Ressourcen“ in der AK widerspiegelt. Postoperativ ist ein Abfall der AK in beiden Gruppen ersichtlich, wobei der Rückgang in der BAA-Gruppe deutlicher ist, was darauf hindeuten könnte, dass es durch das größere Trauma zu einer stärkeren Ausschöpfung der inflammatorischen Ressourcen kommt. Mit Studien kann diese Beobachtung nicht belegt werden, da die Aktivierungskapazität noch nicht untersucht wurde. Dies bietet neue Ansatzpunkte für nachfolgende Untersuchungen.

Zwischen den übrigen vorbeschriebenen Patientenstudien und diesem Projekt können kaum Parallelen gezogen werden, da keine vergleichbaren signifikanten Ergebnisse erreicht werden. Lediglich die Korrelationsanalyse zwischen dem präoperativen Wert der Aktivierungskapazität und den postoperativen Score-Werten zeigt in der Studiengruppe Tendenzen, die einigen Patientenstudien ähneln, in denen der prädikative Wert der NF- $\kappa$ B Aktivität dem APACHE II Score entsprach (Arnalich et al. 2000; Böhler et al. 1997) bzw. eine erhöhte präoperative Aktivierung des NF- $\kappa$ B Systems mit vermehrten postoperativen Komplikationen in Form von Multiorganversagen assoziiert war (Foulds et al. 2001). Allerdings sind in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Korrelationen in diesem

Zusammenhang zu finden, sondern lediglich Tendenzen, welche sich in der Studiengruppe und der Vergleichsgruppe jedoch deutlich unterscheiden. Aufgrund der kaum sichtbaren Veränderungen in den Score-Werten lassen sich daraus jedoch keine statistisch soliden Aussagen treffen oder die Beobachtungen der oben beschriebenen Studien eindeutig belegen.

Eine mögliche Erklärung ist, dass die Patienten der vorliegenden Studie auch postoperativ „zu gesund“ oder bei „zu gutem“ Allgemeinzustand (AZ) waren, als dass hier klinische Veränderungen mittels der angewendeten Scores hätten erfasst werden können. Die Scores sind, wie oben erläutert, für Intensivpatienten ausgelegt und somit zu unsensibel für dieses Probandenkollektiv. Durch ihren guten AZ unterscheiden sich die Patienten jedoch auch von den Patienten der vorangegangenen Studien, in welchen hauptsächlich moribunde bzw. Sepsispatienten untersucht wurden (Böhrer et al. 1997; Arnalich et al. 2000; Paterson et al. 2000; Nolan et al. 2000) oder Patienten, die nach einem chirurgischen Trauma ein MODS entwickelten (Foulds et al. 2001).

Zudem zeigt dieses Projekt auch in den Erhebungszeitpunkten Unterschiede zu den restlichen Studien, welche sich auch wieder untereinander unterscheiden. Während manche nur einen Messzeitpunkt wählten (Nolan et al. 2000), führten andere mehrere Messungen innerhalb von 24 Stunden (Arnalich et al. 2000) oder 72 Stunden (Paterson et al. 2000) durch. Den längsten Erfassungszeitraum findet man bei Böhrer et al., die innerhalb von 14 Tagen neun Messungen durchführten. Die Studie, die der vorliegenden von der Fragestellung her am nächsten kommt, ist die von Foulds et al., welche die perioperative NF- $\kappa$ B Aktivität an Patienten mit thorakalem Aortenaneurysma untersuchte. Allerdings wird hier die BA präoperativ und zu mehreren festen Zeiten intraoperativ bestimmt, was somit auch keinen Vergleich mit den hier erfassten postoperativen Werten über fünf Tage zulässt. Auch die Fallzahlen und statistischen Verfahren unterscheiden sich in jeder Studie. Darüber hinaus unterscheidet sich diese von den anderen in Punkten der Methodik, wobei sich auch alle anderen Studien darin untereinander unterscheiden. Vor diesem Gesamthintergrund baut die vorliegende Studie auf einer vorangehenden Dissertation auf, die sich mit der Etablierung und Evaluation einer standardisierten Methodik zur quantitativen Bestimmung der NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität in humanen Blutzellen mittels EMSA beschäftigte (Cordes 2008).

Wie auch schon in der Arbeit von Cordes beobachtet, ergibt sich bei der reinen NF- $\kappa$ B BA eine sehr große Streuung, was den Bezug auf einen Referenzwert nötig macht. Dies ist im vorliegenden Projekt durch den Bezug auf Tag null erfolgt, beziehungsweise in der Betrachtung als Aktivierungskapazität impliziert.

Um die Streuung an sich zu verringern, könnten verschiedene Punkte der Methodik noch etwas verändert werden. Beispielsweise wäre es möglich bei der Analyse der Banden den Background nicht pro Gel, wie hier durchgeführt, sondern für jede Lane einzeln herauszurechnen, um somit auch die kleinsten Abstufungen zu erfassen. Eine weitere Änderungsmöglichkeit könnte darin bestehen, als Referenzwert nicht Tag null, sondern einen gesunden Probanden zu verwenden, wie bei Arnalich et al. im Jahr 2000 beschrieben. Der Bezug auf einen konstitutiv Aktivierten Faktor wie NF- $\gamma$  war im vorliegenden Projekt gescheitert, da sich dadurch die Streuung noch weiter vergrößerte. Somit diene dieser hier lediglich als Ladungskontrolle. Allerdings könnte man diesen Bezug mit ähnlichen Faktoren, wie beispielsweise NF-1 versuchen. Eine andere Möglichkeit, die eventuell bessere Ergebnisse für NF- $\gamma$  bringen könnte, wäre, sowohl die NF- $\kappa$ B Proben als auch die NF- $\gamma$  Proben eines Patienten zusammen auf einem Gel laufen zu lassen, um sie „vergleichbarer“ zu machen. Es gibt nämlich Hinweise dafür, dass sich nur Proben auf dem gleichen Gel miteinander vergleichen lassen. Hinsichtlich des Gruppenunterschieds lässt sich festhalten, dass dieser im Bezug auf Leukozyten und CRP sehr deutlich zu sehen ist, während er bei den von NF- $\kappa$ B abgeleiteten Zielgrößen zwar auch sichtbar scheint, allerdings kaum signifikant ist. Das könnte einerseits auf die Methodik zurückzuführen sein, die bereits innerhalb der Gruppen zu sehr starken Streuungen führt. Andererseits könnte das darauf hindeuten, dass die Zielgrößen an sich für diese Auswertung nicht geeignet sind. Eine dritte Erklärungsmöglichkeit wäre, dass auch hier wieder sichtbar wird, dass es den Patienten postoperativ „zu gut“ geht und sich dadurch keine signifikanten Unterschiede ergeben, da das NF- $\kappa$ B System erst bei stärkeren Stimuli signifikant reagiert.

Somit konnte die von Cordes 2008 etablierte Methodik in dieser Studie nicht eindeutig verifiziert werden und sollte in nachfolgenden Studien an „kränkeren“ Patienten untersucht werden. Diese würden wahrscheinlich, entsprechend der oben beschriebenen Patientenstudien, deutlichere Reaktionen im NF- $\kappa$ B System und in den Score-Werten zeigen. Eine andere Möglichkeit wäre, sensiblere

Scoresysteme zu entwickeln, die die klinischen Veränderungen der Patienten postoperativ sichtbarer machen, als es hier durch APACHE II oder SAPS II möglich war. Der Bezug der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität auf ein Referendum scheint aufgrund der großen Streuung der absoluten BA auch hier sinnvoll zu sein. Hierbei könnten verschieden Referenzen im Vergleich untersucht werden, wie beispielsweise eine gesunde Kontrolle, ein konstitutiv aktivierter Transkriptionsfaktor, oder auch wie im vorliegenden Projekt Tag null.

Darüber hinaus bietet die Erforschung des Verhaltens der NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität eine neue Grundlage für nachfolgende Studien, da hiermit nicht nur eine Momentaufnahme eines Einzelwertes beschrieben wird, sondern ein inflammatorisches Potential, welches die Ressourcen des NF- $\kappa$ B Systems impliziert.

## **5. Zusammenfassung**

Der Transkriptionsfaktor „Nukleärer Faktor kappa B“ (NF- $\kappa$ B) hat in der Regulation des Immunsystems eine entscheidende Bedeutung, da er sowohl eine pro- als auch eine anti-inflammatorische Wirkung vermittelt. Konträre Befunde der NF- $\kappa$ B Aktivität in der Sepsis unterstreichen, dass noch unklar ist, ob NF- $\kappa$ B eher eine protektive oder eine schädliche Rolle spielt. Aufgrund unterschiedlicher Methoden zur Bestimmung der NF- $\kappa$ B Aktivität wird der Vergleich unterschiedlicher Studien zusätzlich erschwert. Vor diesem Hintergrund baut die vorliegende Arbeit auf einer vorangegangenen Dissertation auf, welche sich mit der Etablierung und Evaluierung einer standardisierten Bestimmung der Aktivität von NF- $\kappa$ B mittels des „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) in humanen Blutzellen gesunder Probanden beschäftigte. Das vorliegende Projekt sollte die somit etablierte Methodik nun auf ein krankes Probandenkollektiv anwenden.

Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs wurde hierbei in peripheren mononukleären Zellen (PMNC) in der perioperativen Phase bei Patienten mit ausgedehnten gefäßchirurgischen Eingriffen einmal präoperativ und an vier Tagen postoperativ untersucht. Die Studiengruppe bestand aus 28 Patienten, welche eine Bauchaortenaneurysma Operation erhielten. Das schwere chirurgische Trauma diente hierbei als Modell der systemisch auftretenden pathophysiologischen Vorgänge, wie sie zum Beispiel beim „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) ablaufen. Die Kontrollgruppe bestand aus 20 Patienten mit gering traumatisierenden gefäßchirurgischen Eingriffen an der Arteria Carotis interna.

Neben der basalen, unstimulierten Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B wurde zusätzlich die Aktivität nach ex-vivo Stimulation mit dem „Tumor-Nekrose-Faktor Alpha“ (TNF- $\alpha$ ) herangezogen. Der Quotient aus beiden Werten lieferte ein Maß der Aktivierungskapazität von NF- $\kappa$ B. Zudem wurde die unstimulierte Aktivität von NF- $\kappa$ B in einer weiteren Untersuchung auf Tag null bezogen.

Darüber hinaus wurden an jedem der fünf Messzeitpunkte noch laborchemische Entzündungsparameter (Leukozytenzahl und C-reaktives Protein) bestimmt und zudem zwei klinische Scores errechnet, der „Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II“ (APACHE II) und der „Simplified Acute Physiology Score II“ (SAPS II).

Anhand der laborchemischen Entzündungsparameter ließ sich eine eindeutige Reaktion auf das operative Trauma beobachten, welche zudem noch deutliche Gruppenunterschiede zwischen der Studien- und der Kontrollgruppe herausstellte. Ein vermeintlich reaktiver postoperativer Anstieg der NF- $\kappa$ B Bindungsaktivität musste durch den Bezug auf Tag null widerlegt werden, welcher im Vergleich zu Tag null einen Werteabfall zeigte. Dieser fiel in der Studiengruppe stärker aus als in der Vergleichsgruppe. Auch bei der Aktivierungskapazität kam es zu einem postoperativen Werteabfall, welcher ebenfalls in der BAA-Gruppe stärker war als in der Carotis-Gruppe. Unter der Annahme, dass die NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität die inflammatorischen Ressourcen widerspiegelt, würde dieser Abfall durchaus Sinn machen, da angenommen werden kann, dass es durch das operative Trauma zur Ausschöpfung dieser Ressourcen kommt. Diese Beobachtung bietet neue Ansatzpunkte für nachfolgende Studien.

Ein Vergleich mit dem klinischen Zustand der Patienten war anhand der erfassten Scores jedoch nicht möglich, da diese keine relevanten reaktiven Änderungen auf das Trauma zeigten. Dies muss darauf zurückgeführt werden, dass es sich hierbei um Scorsysteme handelt, welche für Intensivpatienten entworfen wurden und im vorliegenden Projekt zu unspezifisch waren, da es den eingeschlossenen Patienten postoperativ „zu gut“ ging, um hier relevante Veränderungen aufzuweisen. Auch Korrelationsanalysen erbrachten keine relevanten Korrelationen zwischen den verschiedenen Zielgrößen. Somit erreicht diese Studie keine signifikanten Ergebnisse, wie sie in einigen Patientenstudien für NF- $\kappa$ B im Zusammenhang mit der Sepsis beschrieben sind, was einerseits auf Unterschiede in der Methodik und andererseits auch auf unterschiedliches Patientengut zurückzuführen ist, welches in anderen Studien deutlich „kränker“ war als in der vorliegenden.

Somit konnte auch die Möglichkeit der Anwendung der von Cordes 2008 etablierten Methodik auf kranke Probanden mit dieser Studie nicht eindeutig verifiziert oder widerlegt werden. Darum sollte in nachfolgenden Studien dieses Verfahren an „kränkeren“ bzw. tatsächlichen Sepsis-Patienten untersucht werden. Zudem sollte der Ansatz der Aktivierungskapazitätsbestimmung in weiteren Studien untersucht werden, da diese Größe einen neuen Blickwinkel auf das NF- $\kappa$ B System bietet, welcher bei ähnlichem Verlauf bei kränkeren Patienten eventuell Potential hätte, als Marker für das Sepsis-Monitoring zu dienen.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, Bone R, Wenzel RP, Balk R, Allred R: 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. *J Am Med Assoc* 273: 934-941 (1995)
2. Abraham E: Alterations in transcriptional regulation of proinflammatory and immunoregulatory cytokine expression by hemorrhage, injury and critical illness. *New Horiz* 4: 184-193 (1996)
3. Abraham E: NF-kappaB activation. *Crit Care Med* 28: N100-N104 (2000)
4. Abraham E: Nuclear Factor-B and its role in sepsis-associated organ failure. *J Infect Dis* 187: 364-369 (2003)
5. Abraham E: Alterations in cell signaling in sepsis. *Clin Infect Dis* 41: 459-464 (2005)
6. Adib-Conquy M, Adrie C, Koine P, Asehonoune K, Fitting C, Pinsky MR, Dhainaut JF, Cavaillon JM: NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1877-1883 (2000)
7. Adib-Conquy M, Asehnoune K, Moine P, Cavaillon J-M: Long-term-impaired expression of nuclear factor- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$  in peripheral blood mononuclear cells of trauma patients. *J Leukoc Biol* 70: 30-38 (2001)
8. Aegerter P, Boumendil A, Retbi A, Minvielle E, Dervaux B, Guidet B: SAPS II revisited. *Intensive Care Med* 31: 416-423 (2005)

9. Alcamo E: Targeted mutation of NTF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF $\kappa$ B in leukocyte recruitment. *J Immunol* 167: 1592-1600 (2001)
10. Altavilla D, Saitta A, Guarini S, Galeano M, Squadrito G, Cucinotta D, Santamaria LB, Mazzeo AT, Campo GM, Ferlito M, Minutoli L, Bazzani C, Bertolini A, Caputi AP, Squadrito F: Oxidative stress causes nuclear factor-kappaB activation in acute hypovolemic hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med* 30: 1055-1066 (2001)
11. Altavilla D, Saitta A, Squadrito G, Galeano M, Venuti SF, Guarini S, Bazzani C, Bertolini A, Caputi AP, Squadrito F: Evidence for a role of nuclear factor-kappaB in acute hypovolemic hemorrhagic shock. *Surgery* 131: 50-58 (2002)-1
12. Altavilla D, Squadrito G, Minutoli L, Deodato B, Bova A, Sardella A, Seminara P, Passaniti M, Urna G, Venuti SF, Caputi AP, Squadrito F: Inhibition of nuclear factor-kappaB activation by IRF1 042, protects against endotoxin-induced shock. *Cardiovasc Res* 54: 684-693 (2002)-2
13. 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. *Crit Care Med* 20: 864-874 (1992)
14. Angus DC, Birmingham MC, Balk RA, Scannon PJ, Collins D, Kruse JA, Graham DR, Dedhia HV, Homann S, Macintyre N: E5 murine monoclonal antiendotoxin antibody in gram-negative sepsis: a randomized controlled trial. E5 Study Investigators. *J Am Med Assoc* 283: 1723-1730 (2000)
15. Van Antwerp D J, Marin S J, Kafri T, Green D R, Verma I M: Suppression of TNF $\alpha$ -induced apoptosis by NF $\kappa$ B. *Science* 274: 787-789 (1996)

16. Armstead VE, Opentanova IL, Minchenko AG, Lefer AM: Tissue factor expression in vital organs during murine traumatic shock: role of transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Anesthesiology* 91: 1844-1852 (1999)
17. Arnalich F, Garcia-Palomero E, Lopez J, Himenez M, Madero R, Renart J, Vazquez JJ, Monitel C: Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect Immun* 68: 1942-1945 (2000)
18. Bailey RW, Bulkley GB, Hamilton SR, Morris JB, Smith GW: Pathogenesis of nonocclusive ischemic colitis. *Ann Surg* 203: 590-599 (1986)
19. Baldwin AS: Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NFκB. *J Clin Invest* 107: 241-246 (2001)
20. Beg A, Baldwin A S: The IκappaB proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Genes Dev* 7: 2064-2070 (1993)
21. Berg AA, Baltimore D: An essential role for NFκB in preventing TNFα induced cell death. *Science* 274: 784-787 (1996)
22. Blackwell TS, Blackwell TR, Hoden EP, Christman BW, Christman JW: In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-κB activation and neutrophilic lung inflammation. *J Immunol* 157: 1630-1637 (1996)
23. Blackwell TS, Christman JW: The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 3-9 (1997)
24. Blackwell TS, Yull FE, Chen CL, Venkatakrishnan A, Blackwell TR, Hicks DJ, Lancaster LH, Christman JW, Kerr LD: Multiorgan nuclear factor kappa B activation in a transgenic mouse model of systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1095-1101 (2000)

25. Böhler H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, Jilmer T, Mannel D, Bottiger BW, Stern DM, Waldherr R, Saeger HD, Ziegler R, Bierhaus A, Martin E, Nawroth PP: role of NFkappaB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest* 100: 972-985 (1997)
26. Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP: A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 317: 653-658 (1987)
27. Capuzzo M, Valponi V, Sgarbi A, Bortolazzi S, Pavoni V, Gilli G, Candini G, Gritti G, Alvisi R: Validation of severity scoring systems SAPS II and APACHE II in a single-center population. *Intensive Care Med* 26:1779-85 (2000)
28. Carswell E A, Old L J, Kassel R L, Green S, Fiore N, Williamson B: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 3666-3670 (1975)
29. Chang CK, Albarillo MV, Schurer W: Therapeutic effect of dimethyl sulfoxide on ICAM-1 gene expression and activation of NF-kappaB and AP-1 in septic rats. *J Surg Res* 95: 181-187 (2001)
30. Chang CK, Chuter TA, Niemann CU, Shlipak MG, Cohen MJ, Reilly LM, Hiramotot JS: Systemic inflammation, coagulopathy and acute renal insufficiency following endovascular thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 49 (5): 1140-1146 (2009)
31. Chen LW, Egan L, Li ZW: The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: Prevention of Systemic Inflammation but Increased Local Injury Following Intestinal Ischemia/Reperfusion. *Nat Med* 9: 575-581 (2003)
32. Chen LY, Pan WW, Chen M, Li JD, Liu W, Chen G, Huang S, Papadimos TJ, Pan ZK: Synergistic induction of inflammation by bacterial products

- lipopolysaccharide and fMLP an important microbial pathogenic mechanism. J Immunol 182 (4): 2518-2524 (2009)
33. Chiavone PA, Sans YA: Evaluation of APACHE II system among intensive care patients at a teaching hospital. Sao Paulo Med J 121: 53-57 (2003)
34. Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS: Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. Intensive Care Med 24: 1131-1138 (1998)
35. Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. Nature 420: 885-891 (2002)
36. Cordes J: Untersuchungen zur standardisierten Messung der NF- $\kappa$ B Aktivierungskapazität in humanen Blutzellen. Med Dissertation, Universität Ulm (2008)
37. Daniels R: Incidence, mortality and economical burden of Sepsis. Em Care Sp Lib (2007)
38. Del Bufalo C, Morelli A, Bassein L, Fasano L, Quarta CC, Pacilli AM, Gunella G: Severity scores in respiratory intensive care: APACHE II predicted mortality better than SAPS II. Respir Care 40: 1042-1047 (1995)
39. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker M, Jaeschke R, Reinhart K, Angus D, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut J-F, Gerlach H, Harvey M, Marini J, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent J-L for the International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee: Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Intensive Care Med 34: 17-60
40. Dietz AH; Daniel V.: Immunomodulating effects of surgical intervention in tumors of the head and neck. Otolaryngol Head Neck Surg 123: 132-139 (2000)

41. Dixit V, Mak T W: NF-kappaB signaling. Many roads lead to Madrid. *Cell* 111: 615-619 (2002)
42. Dorn A, Bollekens J, Adrian S, Christophe B, Mathis D: A Multiplicity of CCAAT Box-Binding Proteins. *Cell* 50: 863-872 (1987)
43. Eggebrecht H, Mehta RH, Metzounve H, Huptas S, Herold U, Jakob HG, Erbel R: Clinical implications of systemic inflammatory response syndrome following thoracic aortic stent-graft placement. *J Endovasc Ther* 15 (2): 135-143 (2008)
44. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K: Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 33: 606-618 (2007)
45. Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Pacer L: Redox regulation of NF-kappaB activation. *Free Radic Biol Med* 22: 1115-1126 (1997)
46. Foulds S, Cheshire NJ, Schachter M, Wolfe JH, Mansfield AO: Endotoxin related early neutrophil activation is associated with outcome after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Br J Surg* 84: 172-177 (1997)
47. Foulds S, Galustian C, Mansfile AO, Schachter M: Transcription factor NF kappa B expression and postsurgical organ dysfunction. *Ann Surg* 233: 70-78 (2001)
48. Franzoso G: mice deficient in NFkB/p52 present with defects in humoral responses, germinal centre reaction, and splenic reactions. *J Exp Med* 187: 147-159 (1998)

49. Fryer RM, Patel HH, Hsu AK, Gross GJ: Stress-activated protein kinase phosphorylation during cardio protection in the ischemic myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1184-H1192 (2001)
50. Fujihara SM, Cleaveland JS, Grosmaire LS: A D-amino acid peptide inhibitor of NF- $\kappa$ B nuclear localization is efficacious in models of inflammatory disease. *J Immunol* 165: 1004-1012 (2000)
51. Gadjeva M, Tomczak MF, Zhang M, Wang YY, Dull K, Rogers AB, Erdman SE, Fox JG, Carroll M, Horwitz BH: A role for NF-kappa B subunits p50 and p65 in the inhibition of lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol* 173: 5786-5793 (2004)
52. Ghosh S, May MJ, Kopp EB: NF-kappa B and rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260 (1998)
53. Ghosh S, Karin M: Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109: 81-96 (2002)
54. Gilmore T D: Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25: 6680-6684 (2006)
55. Gjertsson I, Hultgren OH, Collins LV, Pettersson S, Tarkowski A: Impact of transcription factors AP-1 and NF-kappaB on the outcome of experimental *Staphylococcus aureus* arthritis and sepsis. *Microbes Infect* 3: 527-534 (2001)
56. Gogos C A, Drosou E, Bassaris H P, Skoutelis A: Pro- versus antiinflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 181: 176-180 (2000)

57. Goudeau B, Huetz F, Samson S, Di Santo JP, Cumano A, Beg A: I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\epsilon$  deficiency reveals that a critical NF- $\kappa$ B dosage is required for lymphocyte survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15800-15805 (2003)
58. Grundstrom S, Anderson P, Scheipers P, Sundstedt A: Bcl-3 and NFkappaB p50-p50 homodimers act as transcriptional repressors in tolerant CD4+ T cells. *J Biol Chem* 279: 8460-8468 (2004)
59. Gu Z, Jiang Q, Thang G: Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal protein kinase in ischemic tolerance, *Neuroreport* 12: 3487-3491 (2001)
60. Guha M, Mackman N: LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13: 85-94 (2001)
61. Hamilton-Davies C, Mythen MG, Salmon JB, Jacobson D, Shukla A, Webb AR: Comparison of commonly used clinical indicators of hypovolaemia with gastrointestinal tonometry. *Intensive Care Med* 23: 276-281 (1997)
62. Hatamochi A, Golumbek PT, Van Schaftingen E, de Crombrughe B. A.: CCAAT DNA binding factor consisting of two different components that are both required for DNA binding. *J Biol Chem* 263: 5940–5947 (1988)
63. Hayden M S, West A P, Ghosh S: NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25: 6758-6780 (2006)
64. Hotchkiss R S, Karl I E: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348: 138-150 (2003)
65. Hotchkiss R S, Swanson P E, Freeman B D, Tinsley K W, Cobb J P, Matuschak G M, Buchman T G, Karl I E: Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 27: 1230-1251 (1999)

66. Janssens U, Hanrath P: [Shock]. *Internist (Berl)* 35: 673-689 (1994)
67. Karin M, Lin A: NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3: 221-227 (2002)
68. Kato A, Singh S, McLeish KR, Edwards MF, Lentsch AB: Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G607-G616 (2002)
69. Knaus WA, Zimmerman JE, Wagner DP, Draper A, Lawrence DE: APACHE-Acute Physiology and Chronic Health Evaluation: a Physiologically based classification system. *Crit Care Med* 9: 591-597 (1981)
70. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE: APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 13: 818-829 (1985)
71. Kramer AA, Salhab KF, Shafii AE, Norman J, Carey LC, Mendez C: Induction of tolerance to hemorrhagic or endotoxic shock involves activation of NF-kappaB. *J Surg Res* 83: 89-94 (1999)
72. Kuboki S, Shin T, Huber N, Eismann T, Galloway E, Schuster R, Blanchard J, Edwards MJ, Lentsch AB: Hepatocyte signaling through CXC chemokine receptor-2 is detrimental to liver recovery after ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology* 48 (4): 1213-1223 (2008)
73. Kupfner JG, Arcaroli J, Yum HK, Nadler SG, Abraham E: Role of NF- $\kappa$ B in endotoxemia induced alterations of lung neutrophil apoptosis. *J Immunol* 167: 7044-7051 (2001)
74. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA: Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med* 7: 1291-1297 (2001)

75. Le Gall J-R, Loirat P, Alperovitch A: A Simplified Acute Physiology Score for ICU patients. *Crit Care Med* 12: 975-977 (1984)
76. Le Gall J-R, Lemeshow S, Saulnier F: A New Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American Multicenter Study. *J Am Med Assoc* 270: 2957-2962 (1993)
77. Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee K F, Verma I M: Severe liver degeneration in mice lacking the I $\kappa$ B kinase2 gene. *Science* (80-) 284: 321-325 (1999)
78. Liu SF, Ye X, Malik AB: In vivo inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. *J Immunol* 159: 3976-3983 (1997)
79. Liu SF, Malik AB: NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: 622-645 (2006)
80. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA: A novel polymorphism in the Toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 68:6398-6401 (2000)
81. Markgraf R, Deuschinoff G, Pientka L, Scholten T: Comparison of acute physiology and chronic health evaluations II and III and simplified acute physiology score II: a prospective cohort study evaluating these methods to predict outcome in a German interdisciplinary intensive care unit. *Crit Care Med* 28:26-33 (2000)
82. Menges T, König IR, Hossain H, Little S, Tchatalbachev S, Thierer F, Hackstein H, Franjkovic I, Colaris T, Martens F, Weismüller K, Langfeld T, Stricker J, Hempelmann G, Vos PE, Ziegler A, Jacobs B, Chakroborty T, Bein G: Sepsis syndrome and death in trauma patients are associated with

- variation in the gene encoding tumor necrosis factor. *Crit Care Med* 36: 1652-1654 (2008)
83. Micheau O, Tschopp J: Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114: 181-190 (2003)
84. Milos PM, Zaret KS A ubiquitous factor is required for C/EBP-related proteins to form stable transcription complexes on an albumin promoter segment in vitro. *Genes Dev* 6: 991-1004 (1992)
85. Moerer O., Burchardi H.: Epidemiologie und Kosten der Sepsis. *Klinikerarzt* 33: 177-180 (2004)
86. Montovani R: A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res* 26: 1135-1143 (1998)
87. Moore FA, Moore EE: Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure: *Surg Clin North Am* 75: 257-277 (1995)
88. Moreno R, Miranda DR, Fidler V, Van Schilfgaarde R: Evaluation of two outcome prediction models on an independent database. *Crit Care Med* 26: 50-61 (1998)
89. Neurath M, Pettersson S, Meyer Zum Buschnefelde K-H, Strober W: Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 2: 998-1004 (1996)
90. Nolan B, Collette H, Baker S, Duffy A, De M, Miller C, Bankey P: inhibition of neutrophil apoptosis after severe trauma is NFkappabeta dependent. *J Trauma* 48: 599-604 (2000)

91. Oh TE, Hutchinson R, Short S, Buckley T, Lin E, Leung D: Verification of the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation scoring system in a Hong Kong intensive care unit. *Crit Care Med* 21: 698-705 (1993)
92. Pahl HL: Activators and target genes of rel / NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-6866 (1999)
93. Paterson RL, Galley HF, Dhillon JK, Webster NR: Increased nuclear factor kappa B activation in critically ill patients who die. *Crit Care Med* 28: 1047-1051 (2000)
94. Parriol JE, Parker MM, Natanson C, et al: Septic shock: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 113: 227-242 (1990)
95. Price HI, Deutsch S, Marshall BE, Stephen GW, Behar MG, Neufeld GR: Hemodynamic and metabolic effects of hemorrhage in man, with particular reference to the splanchnic circulation. *Circ Res* 18: 469-474 (1966)
96. Reilly PM, Bulkley GB: Vasoactive mediators and splanchnic perfusion. *Crit Care Med* 21: 55-68 (1993)
97. Reinhart K, Menges T, Gardlund B, Zwaveling J, Smithes M, Vincent J L, Tellado J M, Salgado-Remigio A, Zimlichman R, Withington S, Tschaikowsky K, Brase R, Damas P, Kupper H, Kempeni J, Eiselstein J, Kaul M: Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study. *Crit Care Med* 29: 765-769 (2001)
98. Rogy M A, Coyle S M, Oldenburg H S, Rock C S, Barie P S, Van Zee K J, Smith C G, Moldawer L, Lowry S F: Persistently elevated soluble tumor necrosis factor receptor and interleukin-1 receptor antagonist levels in critically ill patients. *J Am Coll Surg* 178: 132-138 (1994)

99. Sacco RL: Extracranial carotid stenosis. *N Engl J Med* 345 (15): 1113-1118 (2001)
100. Sankar NM, de Crombrughe B: Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF- $\kappa$ B in transcription. *Trends Biochem Sci* 23: 174-178 (1998)
101. Samson SI, Memet S, Vosshenrich CA, Colucci F, Richard O, Ndiaye D: Combined deficiency in  $\kappa$ B $\alpha$  and  $\kappa$ B $\epsilon$  reveals a critical window of NF- $\kappa$ B activity in natural killer cell differentiation. *Blood* 103: 4573-4580 (2004)
102. Sawa Y, Morishita R, Suzuki K, Kagisaki K, Kaneda Y, Maeda K, Kadoba K, Matusda H: A novel strategy for myocardial protection using in vivo transfection of cis element 'decoy' against NF $\kappa$ B binding site: evidence for a role of NF $\kappa$ B in ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 96 II: 280-284 (1997)
103. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS: International Sepsis Definition Conference 2001. *Crit Care Med* 31: 1250-1256 (2003)
104. Sen R, Baltimore D: Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47: 921-928 (1986)
105. Senftleben U: NF-kappaB in critical diseases: a bad guy? *Intensive Care Med* 29: 1873-1876 (2003)
106. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten F R, Krähn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun S C, Karin M: Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 24: 1495-1499 (2001)-1
107. Senftleben U., Li Z-W, Baud V, Karin M: IKK $\beta$  is essential for protecting T cells from TNF alpha induced apoptosis. *Immunity* 14: 217-230 (2001)-2

108. Shenkar R, Schwartz MD, Terda LS, Repine JE, McCord J, Abraham E: Hemorrhage activates NF-kappaB in murine lung mononuclear cells in vivo. *Am J Physiol* 270: L729-L735 (1996)
109. Shimohashi N, Nakumata M, Uchimura K, Sugimoto R, Iwamoto H, Enjoji M, Nawata H: Selenoorganic compound, ebselen, inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production by the modulation of jun-N-terminal kinase and the NF-kappaB signaling pathway in rat Kupffer cells. *J Cell Biochem* 78: 595-606 (2000)
110. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K: Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 55: 10405-10455 (1994)
111. Singh K, Bonna KH, Jacobson BK, Bjork L, Selberg S: Prevalence of risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study: The Tromso Study. *Am J Epidemiol* 154 (3): 236-244 (2001)
112. Sonenshein GE: Rel / NF-kappa B transcription factors and the control of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 8: 113-119 (1997)
113. Stuber F: Effects of genomic polymorphisms on the course of sepsis: is there a concept for gene therapy? *J Am Soc Nephrol* 12: 60-64 (2001)
114. Teoh N, Dela PA, Farrell G: Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology* 36: 94-102 (2002)
115. Visekruna A, Joeris T, Seidel D, Kroesen A, Loddenkemper C, Zeitz M, Kaufmann S H, Schmidt-Ullrich R, Steinhoff U: Proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha and processing of p105 in Crohn disease and ulcerative colitis. *J Clin Invest* 116: 3195-3203 (2006)
116. Ward C, Chilvers ER, Lawson MF: NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *J Biol Chem* 274: 4309-4318 (1999)

117. Weighardt H, Heidecke C D, Westerholt A, Emmanuilidis K, Maier S, Veit M, Gerauer K, Matevossian E, Ulm K, Siewert J R, Holzmann B: Impaired monocyte IL-12 production before surgery as a predictive factor for the lethal outcome of postoperative sepsis. *Ann Surg* 235: 560-567 (2002)
118. Williams DL, Ha T, Li C, Kalbfleisch JH, Ferguson DA Jr.: Early activation of hepatic NFkappaB and NF-IL6 in polymicrobial sepsis correlates with bacteremia, cytokine expression, and mortality. *Ann Surg* 230: 95-104 (1999)
119. Wong DT, Crofts SL, Gomez M, Mc Guire GP, Byrick RJ: Evaluation of predictive ability of APACHE II system and hospital outcome in Canadian intensive care unit patients. *Crit Care Med* 23: 1177-1183 (1995)
120. Yang KY, Arcardi JJ, Abraham E: Early alterations in neutrophil activation are associated with outcome in acute lung injury. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* 167: 1567-1574 (2003)
121. Zhou Y, Yau C, Gray JW, Chew K, Dairkee SH, Moore DH, Eppenberger U, Eppenberger-Castori S, Benz CC: Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer. *BMC Cancer* 7: 59-74 (2007)
122. Zou L, Attuwaybi B, Kone BC: Effects of NF-κB inhibition on mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G713-721 (2003)

## **7. Danksagung**

Herrn Professor Dr. med. Uwe Senftleben danke ich herzlich für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit in seiner Forschungsgruppe zu promovieren.

Für die vielen wertvollen Tipps und die großartige Unterstützung möchte ich mich bei Frau Bettina Stahl und Dr. Florian Wagner sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Frau Rosemarie Meyer und Frau Alexandra Grünenwald, für die hervorragende Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit. Ohne sie wäre diese Studie nicht möglich gewesen.

Zudem möchte ich mich bei Frau Katja Töbelmann für ihre unermüdliche Unterstützung bedanken.

Besonders danke ich meinen Eltern und Markus, die mich während dieser Zeit immer unterstützt und begleitet haben.

---

## **8. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

---

Name, Vorname: Gratza, Andrea  
Geburtsdatum: 18. Juli 1983  
Geburtsort: Augsburg, Deutschland  
Familienstand: ledig

### **Akademische Ausbildung**

---

10/2003 – 11/2009 Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm  
09/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2,5)  
11/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1,5)

### **Praktische Erfahrung**

---

#### ***Praktisches Jahr:***

08/2008 – 07/2009 Innere Medizin, Universitätsklinikum Ulm  
Chirurgie, Universitätsspital Zürich (Schweiz)  
Anästhesie, Université de Franche-Comté  
(Besançon / Frankreich)

#### ***Famulaturen:***

03/2006 Chirurgie, Krankenhaus Friedberg (bei Augsburg)  
08/2006 Anästhesie, Rehabilitations-Krankenhaus Ulm  
02/2007 Gynäkologie, Praxisfamulatur, Ulm  
07/2007 Pädiatrie, Praxisfamulatur, Ulm  
03/2008 Chirurgie, Western Regional Hospital, Pokhara,  
Nepal

## Dissertation

---

10/2006 – 10/2010

Experimentell-klinische Doktorarbeit in der  
Universitätsklinik für Anästhesiologie Ulm,  
Sepsislabor Prof. Dr. med. Uwe Senftleben, Thema:  
*„Aktivierung des NF- $\kappa$ B – Signaltransduktionsweges  
in mononukleären peripheren Blutzellen bei elektiven  
chirurgischen Patienten im Bezug auf deren  
klinischen Verlauf“*

## Schulische Ausbildung

---

09/1990 – 07/1994 Volksschule Augsburg / Hochzoll-Süd  
09/1994 – 06/2003 Rudolf-Diesel-Gymnasium, Augsburg  
06/2003 Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife (1,4)

## Sprachkenntnisse

---

Englisch fließend in Wort und Schrift  
Französisch fließend in Wort und Schrift  
Spanisch Grundkenntnisse