

Aus dem Institut für Neuroradiologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. D. Petersen

**Der prädiktive Wert des S-100 Proteins
für die Erkennung ischämischer zerebraler Komplikationen
nach kardiochirurgischen Eingriffen**

Inauguraldisseration

Zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- medizinische Fakultät -

vorgelegt von
Nicola Orłowski
aus Lübeck

Böblingen 2007

1. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Missler

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Matthias Bechtel

Tag der mündlichen Prüfung:

14.02.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

14.02.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

1. EINLEITUNG	5
1.1. S-100 Protein	6
1.2. Genexpression	8
1.3. Funktion	9
1.4. Heutige Verwendung der Messung des S-100 Proteins.....	11
1.4.1. Die neuronenspezifische Enolase (NSE) und das S-100 Protein.....	13
1.4.2. Das gliale saure Faserprotein (GFAP) und das S-100 Protein	14
1.5. S-100 in der Herzchirurgie.....	15
2. ZIEL DER ARBEIT	16
3. MATERIAL UND METHODEN	17
3.1. Untersuchte Patienten	17
3.2. Labormethoden	18
3.2.1. Benötigtes Material und Geräte	18
3.2.2. Herstellung des Carbonatpuffers	19
3.2.3. Herstellung des Phosphatpuffers.....	19
3.2.4. Herstellung des Assaypuffers LKC	19
3.2.5. Herstellung des Assaypuffers LKC-DTPA	20
3.2.6. Herstellung des TRIFMA-Waschkonzentrats	20
3.2.7. Herstellung der Enhancementlösung.....	20
3.2.8. Markierung des Streptavidin mit Europium.....	20
3.2.9. Biotinylierung des zweiten Antikörpers	21
3.3. S-100B-Messung.....	21
3.3.1. Durchführung des S-100 Assays.....	21
3.3.2. Vergleich mit dem Sangtec 100 LIA®	23
3.4. NSE-Messung	24
3.4.1. Antikörper	24
3.4.2. Standard.....	24
3.4.3. Assaydurchführung	24
3.5. GFAP-Messung	25
3.5.1. Antikörper.....	25
3.5.2. Standard	25
3.5.3. Assaydurchführung	25
3.6. CK- und CK-MB- Bestimmung.....	26
3.7. Myoglobin-Bestimmung.....	26
3.8. Statistische Methoden	26

4. ERGEBNISSE	27
4.1 S-100B.....	27
4.1.1. <i>Spezifität des S-100-Assays</i>	27
4.1.2. <i>Standardkurve S-100B</i>	27
4.1.3. <i>Untere Nachweisgrenze S-100B</i>	28
4.1.4. <i>Wiederfindung</i>	28
4.1.5. <i>Hochdosiseffekt</i>	28
4.1.6. <i>Lagerungsstabilität der beschichteten Mikrotiterplatten</i>	28
4.1.7. <i>Präzision</i>	29
4.1.8. <i>Optimale Kalziumkonzentration zur Wiederfindung</i>	29
4.1.9. <i>Referenzwerte</i>	29
4.1.10. <i>Linearität</i>	29
4.1.11. <i>Vergleich mit dem 100 LIA[®] von Sangtec</i>	30
4.2. NSE-Meßmethode	31
4.3. GFAP-Meßmethode	32
4.4. Neurologische Defizite.....	34
4.5. Peri- und postoperative Konzentrationen des S-100B	34
4.6. Perioperativer Konzentrationsverlauf aller Marker	36
5. DISKUSSION	39
6. ZUSAMMENFASSUNG	46
7. LITERATURVERZEICHNIS	47
8. ANHANG.....	68
9. DANKSAGUNG.....	71
10. LEBENSLAUF.....	72

1. Einleitung

Im Rahmen von herzchirurgischen Eingriffen treten durch Mikroembolien gehäuft ischämische Hirnschäden auf (Jönsson et al., 1998).

Es wird davon ausgegangen, dass eins bis fünf Prozent der Patienten, die sich einer Herzoperation mit Herzlungenmaschine unterzogen, anhaltende neurologische Schäden davon tragen (Jönsson et al., 1998). In 70 % treten leichte oder temporäre Dysfunktionen auf (Mahanna et al., 1996).

Basis der Diagnostik stellt die klinisch-neurologische Untersuchung dar. Des Weiteren wurde die Anwendung des Elektroenzephalogramms (EEG) und der evozierten Potenziale beschrieben (Burrows et al, 1990, Luu et al, 2001). Diese Methoden sind auch bei bewusstlosen Patienten anwendbar und liefern Hinweise auf zerebrale Störungen; andererseits sind sie jedoch unspezifisch und für eine Prognoseabschätzung nur eingeschränkt nutzbar. Insbesondere das EEG ist auf Intensivstationen störanfällig (Oliver, 1973).

Die Entwicklung der Computertomographie eröffnete neue nicht-invasive Einblicke in die Gehirnstrukturen. Sie liefert heutzutage Bilder mit hoher Auflösung, eine besonders gute Darstellung knöcherner Strukturen und frischer Blutkoagel. Eine Computertomographie ist relativ einfach und schnell durchzuführen. Dies macht sie in Notfällen, besonders im Rahmen der Notfallchirurgie, in der Abklärung frischer intrakranieller Blutungen und Abgrenzung zu ischämischen Infarktgeschehen, zu einem sicheren und gut beherrschbaren Diagnostikum. Inzwischen verfügt fast jedes Akutkrankenhaus über diese Möglichkeit.

Eine weitere nicht invasive Untersuchungsmethode stellt die Ultraschalluntersuchung dar. Sie kann sehr schnell am Patienten eingesetzt werden und liefert sowohl Informationen über die Morphologie als auch über Funktionen wie Pulsatilitäten und Blutflüsse. Die Ergebnisse hängen hierbei allerdings stark von der Erfahrung des Untersuchers ab. Ein weiterer Nachteil der Sonographie ist die Behinderung der Bildgebung durch Knochen. Mit modernen Geräten ist mittlerweile auch eine Darstellung des Hirnparenchyms in diagnostisch verwertbarer Qualität möglich (Wolf et al., 2004, Sekoranja et al., 2006).

In den letzten Jahren hat sich die Magnetresonanztomographie (MRT) in der neuroradiologischen Diagnostik etabliert. Sie erlaubt eine multiplanare Darstellung mit besonders guten Weichteilkontrasten. Mit der MRT können nicht nur ischämische Areale in Form von Diffusionsstörungen, kleinere Strukturveränderungen in Mark- und

Rindensubstanz aufgezeigt und funktionelle Aussagen gemacht werden, sondern auch funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden (Schellinger et al, 1999, Hamon et al, 2006).

Sowohl mittels Computertomographie als auch Magnetresonanztomographie können Gefäße dargestellt werden (Verro et al., 2002). Als invasives Verfahren steht hierfür die Röntgenangiographie zur Verfügung (Fischer et al., 2005).

Der Nachweis ischämischer Läsionen nach Herzoperationen gelingt am empfindlichsten mit der Magnetresonanztomographie. Allerdings ist es kaum möglich, alle Patienten nach Herzoperation mittels MRT zu untersuchen, da die Untersuchung zeitaufwendig und die kardiale Überwachung im MRT schwierig ist. Ein engmaschiges Neuromonitoring wäre so nicht praktikabel (Jönsson et al., 1998).

Eine sinnvolle Ergänzung könnte die Labordiagnostik darstellen. Die in der Neurologie so wichtige Untersuchung des Liquors ist bei Patienten unmittelbar nach Herzoperationen wegen der häufig erforderlichen Antikoagulation nicht durchführbar.

Neben der Liquoruntersuchung ist die Serumdiagnostik ein einfaches und schnell erhältliches Werkzeug. Das Auffinden ZNS-spezifischer Proteine im peripheren Blut soll Aussagen über die Schädigungen im Hirngewebe zulassen. Zu den bisher oft untersuchten Proteinen zählen das S-100 Protein, das gliale saure Faserprotein (GFAP) und die Neuronenspezifische Enolase (NSE) (Persson et al, 1987, Sellmann et al, 1992, Johnsson et al., 1995, Herrmann et al, 2000b, Rasmussen et al, 2002).

1.1. S-100 Protein

Der Begriff S-100 Protein umfasst eine ganze Familie verschiedener Proteine und deren Isomere. Moore isolierte im Jahr 1965 ein Protein, welches nur in 100-prozentigem Ammoniumsulfat bei pH 7 löslich war und benannte es daher S (für solubel/ löslich) 100 (in 100%) Protein (Moore, 1965).

Die S-100 Proteine sind alle in der Lage Kalzium zu binden, allerdings mit einem gewebspezifischen Expressionsmuster (Baudier et al., 1986). Im Gegensatz zu früheren Annahmen, sind sie nicht spezifisch für das zentrale Nervensystem, sondern werden in unterschiedlichen Geweben gefunden (Isobe et al., 1984, Haimoto et al., 1987, Engelkamp et al., 1992, Zimmer, 1995).

Die S-100 Proteine bestehen aus zwei Untereinheiten, dem S-100 α und S-100 β , die sich zu Homo- oder Heteromeren zusammensetzen. Die beiden Ketten haben eine ungefähre Größe von je 10,5 kD, wobei die α -Kette aus 93 Aminosäuren und die β -Kette aus 91 Aminosäuren besteht, von denen 54 Aminosäuren homolog sind. Das Protein hat damit eine Gesamtgröße von circa 21 kD (Kilby et al., 1996).

Die Kalzium bindende Eigenschaft liegt in den zwei Helices (je eine E- und eine F-Helix), die zu einer Schleife verbunden sind (Heizman et Hunziker, 1991). In einer Region von sauren Aminosäuren findet man das C-terminale Ende, welches genau wie das N-terminale Ende hydrophobe Eigenschaften besitzt (siehe Abb. 1). Die Kalzium bindende Affinität ist am C-terminalen Ende deutlich höher. Am N-terminalen Ende findet sich die Besonderheit, die allen S-100 Proteinen eigen ist und sie auszeichnet. Die N-terminale Schleife wird von 14 zumeist basischen Aminosäuren gebildet. Das Kalzium wird lediglich durch eine Glutamatseitenkette und vier Carbonylsauerstoffatome gehalten. Dies unterscheidet die S-100 Proteine von anderen Kalzium bindenden Proteinen. Die Scharnierregion zwischen den beiden EF-Händen ist es, die bezüglich der Aminosäurezusammensetzung variiert und somit die Bindungsqualitäten der verschiedenen S-100 Proteine definiert.

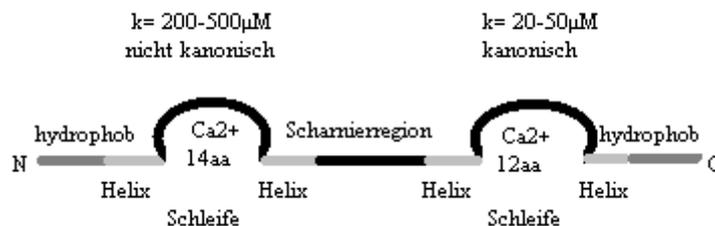


Abb. 1: Gemeinsames Strukturprinzip der S-100 Proteine (nach Hilt und Kligman, 1991)

Die α - und β -Ketten lassen drei Kombinationen zu: $\alpha\beta$, $\alpha\alpha$, $\beta\beta$.

In der Literatur werden unterschiedliche Nomenklaturen für S-100 Proteine benutzt. Die biologisch aktiven Dimere stellen sich folgendermaßen da: S-100a aus $\alpha\beta$, S-100b aus $\beta\beta$ und S-100a₀ aus $\alpha\alpha$ (siehe Abb. 2).

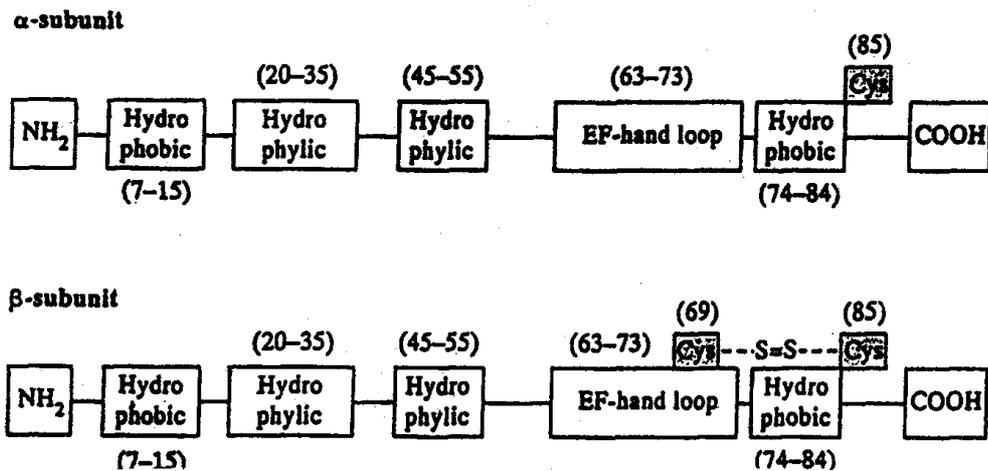


Abb.2 S-100 Untereinheiten (aus Fano, 1995)

Im Jahre 1995 führte Heizmann eine Klassifikation ein, welche nur die Monomere berücksichtigt: S-100A1 bezeichnet die α -Kette und S-100B die β -Kette (Heizmann et al., 1998). Die Einteilung nach Heizmann wird in der überwiegenden Zahl aktuellerer Arbeiten verwendet.

In Tabelle 1 sind die S-100 Proteine der Nomenklatur von Heizmann folgend aufgeführt (siehe Tab.1 im Anhang).

1.2. Genexpression

Die konservierte Struktur der S-100 Proteine bei verschiedenen Spezies deutet darauf hin, dass die Gene durch Duplikation aus einem Ursprungsgen entstanden sind oder sich durch Umverteilung der Introns und Extrons nach Duplikatur entwickelt haben (Engelkamp et al., 1993, Fano et al., 1995, Zimmer et al., 1995). Durch diese Umverteilung ließen sich verschiedene Expressionsmuster der Proteine bei metastasierenden Mammakarzinomen erklären (Engelkamp et al., 1993).

Im menschlichen S-100 finden sich drei Exons in verschiedenen Abschnitten des Proteins. Das erste Exon bleibt untranslatiert, zwei und drei kodieren je eine EF-Hand (Engelkamp et al. 1993).

Das S-100B liegt auf dem Chromosom 21q22, dies zeigt sich mit erhöhten S-100B-Spiegeln beim Down-Syndrom (Kato et al., 1990, Lindberg et al., 1998, Schmidt, 1998).

Auf Chromosom 1q21 wurden die Proteine S-100A1-9 lokalisiert (Engelkamp et al., 1993).

Intrazellulär liegen die Proteine in Dimer-Form vor, welche als Voraussetzung für die verschiedenen Funktionen diskutiert wird. Die Expression ist gewebsspezifisch, außerdem fanden sich sowohl Unterschiede in der Gewebeverteilung verschiedener Spezies und als auch eine veränderte Expression im Laufe der Entwicklung. S-100 Proteine wie auch S-100 mRNA häufen sich in der Gehirnreifungsphase bei Säugetieren an (Zimmer et al., 1995). Insgesamt wurden so 19 Proteine der S-100-Familie zugeordnet, welche einen Gencluster auf dem kurzen Arm von Chromosom 21 umfassen.

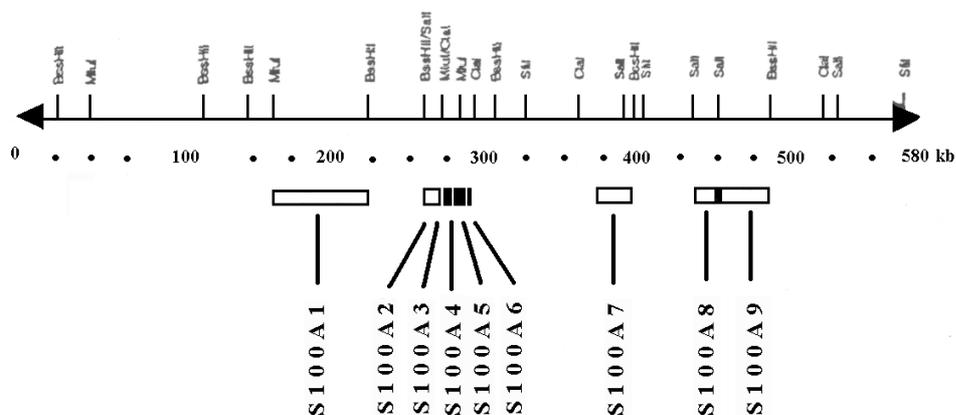


Abb. 3: Karte des Genclusters auf dem Genlocus 1q21 (aus Schäfer et al., 1995)

1.3. Funktion

Die Funktionen von S-100B und S-100A1 sind sehr vielfältig. Manchmal wirken sie je nach Enzymkonzentration, Ionenvorkommen und pH-Wert hemmend oder stimulierend. Viele Funktionen ähneln denen des Calmodulins, einem weiteren Kalziumbindenden Protein (Fano et al., 1995, Donato, 1999).

Obwohl hauptsächlich intrazellulär wirksam, konnten einige extrazelluläre Funktionen beschrieben werden (Baudier et al., 1983). S-100B stimuliert nach Freisetzung aus Gliazellen die Prolaktinsekretion, die Differenzierung der Neurone und als Mitogen die Proliferation der Gliazellen. Gliomzellen werden in geringen Konzentrationen stimuliert, in höheren Konzentrationen in ihrer Proliferation gehemmt. Noch höhere

Konzentrationen bewirken eine Apoptose (Donato, 1991 und 1999, Selinfreund et al., 1991, Fano et al., 1995).

S-100A1 und S-100B scheinen sowohl extra- als auch intrazellulär Einfluss auf das Langzeitgedächtnis und Lernen zu haben. Ratten, die mit spezifischen Antikörpern gegen S-100 behandelt worden waren, zeigten eine deutliche Verschlechterung ihrer Leistung in Irrgartenversuchen (Fazeli et al., 1990).

Intrazellulär wirken die Proteine in der Zellkommunikation, auf die Zellstruktur oderform, das Wachstum und den Zellzyklus, die Zellkontraktion, den Energiestoffwechsel und die Signaltransduktion, indem sie verschiedene Enzyme wie die ATPase, Aldolase und Adenylatzyklase beeinflussen (Kligman et Hilt, 1988, Fano et al., 1988, Donato, 1991).

S-100 reguliert die Phosphorylierung verschiedener Proteine, kann zugleich als Inhibitor auftreten. Hierbei ist die Ionenkonzentration in der Zelle bedeutsam. Bei steigender Zinkkonzentration steigt die Kalziumbindung durch das S-100, dagegen sinkt sie bei steigenden Konzentrationen von Natrium, Kalium und bereits gebundenem Kalzium (Baudier et al., 1986, Fano et al., 1995). Das Kalzium bewirkt zudem eine Faltung des gelösten S-100B Proteins (Kilby et al., 1996), dies lässt vermuten, dass die Form Einfluss auf die Bindungsfähigkeit und damit Funktion des Proteins hat (Baudier et al., 1983, Fano et al., 1995).

In der Zellkommunikation sind Gap Junction Polypeptide die Zielproteine von S-100 (Heizmann et al., 1998).

Durch Bindung an Tau-Proteine hemmt das S-100 die Phosphorylierung dieser Tau-Proteine durch Proteinkinase C und eine Kalzium-/Calmodulin-abhängige Kinase. Dadurch wird der Mikrotubulusaufbau gehemmt, Mitose findet statt und das Zytoskelett ändert sich. Neben dem Tau-Protein wirkt S-100 auf Tubulin und GFAP. Je nach pH-Wert stimulieren sie nach Bindung aneinander im Bereich von 7,5 oder hemmen bei 6,7 den Tubulusaufbau (Donato, 1991, Bianchi et al., 1993). In Versuchen wurde S-100B mittels antimikrotubulärer Substanzen wie Colchizin oder Vinblastin gehemmt, danach fand sich eine abgeflachtere Zellmorphologie mit definierterem mikrofilamentären Netzwerk und gesunkener Wachstumsrate (Dunn et al., 1987, Zimmer et al., 1995).

Beide Monomere wirken auf das Wachstum, so finden sich zum Beispiel in Melanozyten (Marks et al., 1990), leukämischen Myelozyten (Wada et al., 1989) und Schilddrüsenkarzinomen (Auge et al., 2005) höhere Konzentrationen von S-100B.

Der Energiestoffwechsel wird durch Aktivitätserhöhung der Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, bzw. durch Aktivitätsinhibition der Glykogen-Phosphorylase beeinflusst.

Durch Antagonisierung des Calmodulins und Aktivierung der Adenylatzyklase spielt S-100B eine wichtige Rolle in der Zellsignaltransduktion (Zimmer et van Elding., 1986, Zimmer et Dubuisson, 1993, Fano et al., 1995).

Durch S-100A1 und S-100B werden außerdem die Botenstoffe Neuromodulin, Neurogranin, p53 und p87 gehemmt (Deloulme et al., 1990).

Im Myokard moduliert das S-100A1 die kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Fano et al., 1988).

Tabelle Zwei zeigt Funktionen und mögliche Zielproteine.

Funktion	Mögliches Zielprotein	Isoformspezifität	
		S-100A1	S-100B
	Gap-junction Polypeptid	+	+
Zellwachstum	p53	Nicht definiert (nd)	+
Zellform	Tubulin	+	+
	τ - Protein	nd	+
	MAP 2	nd	+
	GFAP	nd	nd
	Annexin II	nd	+
Energiestoffwechsel	Aldolase	+	+
	Glycogenphosphorylase	+	-
Kontraktion	Caldesmon	nd	nd
	Myosin, schwere Kette	nd	nd
Signaltransduktion	Adenylatzyklase	nd	+
	Neuromodulin	nd	+
	Neurogranin	nd	+
	p53	nd	+
	p87	nd	+

Tab. 2: Funktion und mögliche Zielproteine (modifiziert nach Zimmer et al., 1995)

1.4. Heutige Verwendung der Messung des S-100 Proteins

Die Erhöhung der S-100 Konzentrationen in Liquor und Serum ist besonders bei neurologischen Erkrankungen gut untersucht.

Schon in den 80er Jahren konnte S-100 im Liquor isoliert werden und das Konzentrationsverhalten im Rahmen von zerebralen Gewebsschädigungen gemessen

werden (Michetti et al., 1980, Sindic et al., 1982). 1987 fand Persson einen Anstieg der S-100 Konzentration im Liquor bei Patienten nach Schlaganfall (Persson et al., 1987). Aurell kam 1991 auf gleiche Untersuchungsergebnisse und postulierte, dass man mittels des Konzentrationsanstiegs bald auf die zerebrale Schädigung rückschließen könne (Aurell et al., 1991). Im Vergleich mit der neuronenspezifischen Enolase (NSE) stellte Hardemark fest, dass sich die Proteine ähnlich nach einem Schlaganfall verhielten. Im Unterschied zum S-100 stieg das NSE bei der zerebralen Ischämie höher an als das S-100 Protein, welches wiederum nach Traumen eine stärkere Erhöhung zeigte (Hardemark et al., 1989 b). Später wurden Messmethoden angewandt, die den Nachweis im Serum ermöglichten. Somit wurde das S-100B Protein immer mehr als Marker untersucht für das Auftreten neurologischer Schäden durch Ischämie und als prognostischer Indikator für das zu erwartende Endergebnis (Missler et al., 1997b, Martens et al., 1998, Wunderlich et al., 1999, Hermann et al., 2001). Nur wenige Arbeiten fanden keine positive Korrelation zwischen der S-100-Konzentrationsdynamik und dem Verlauf einer apoplektischen Schädigung (Ruleva et al., 2004). Foerch dagegen nimmt die Messung von S-100B Protein im Serum sogar zum Monitoring für die Prädiktion des Verlaufes eines Arteria cerebri media-Verschlusses (Foerch et al., 2004).

Das Neuromonitoring mit Hilfe der S-100B-Bestimmung scheint jedoch noch nicht ausgereift, da bisher stets nur kleine Kollektive untersucht wurden und bei multiplen Verletzungen oder bestimmten Operationen zum Teil noch widersprüchliche Ergebnisse vorliegen (Fries et al., 2004).

Nicht nur bei ischämischen zerebralen Infarktgeschehen konnte ein S-100B-Anstieg gefunden werden, sondern auch bei Kopfverletzungen und subarachnoidalen Blutungen (Ingebrigsten et al., 1996 und 1997, Wiesmann et al., 1997, Woertgen et al., 1997, Elting et al., 2000, Naeimi et al., 2006, Oertel et al., 2006, Townend et al., 2006, Stranjalis et al., 2007). Anderson fand heraus, dass auch bei Unfällen ohne Schädelhirntrauma S-100B aus Weichteilen und besonders Knochen freikommt, dass der Anstieg jedoch nur bei Verbrennungen länger anhielt und insgesamt mit keinen klinisch-neurologischen Befunden korrelierte (Anderson et al., 2001).

Die S-100 Proteine finden in der Diagnostik anderer neurologischer Erkrankungen Verwendung. Infante konnte einen relevanten Anstieg bei akuter Meningitis, Enzephalitis, Multipler Sklerose, Demenz, polyneuropathischer Motoneuronenerkrankung und akuter lymphatischer Leukämie darstellen (Nagamatsu et al., 1995, Infante et al., 2003). Besonders die Verläufe im Rahmen einer Multiplen Sklerose zeigten Hinweise auf

den Aktivitätsgrad (Massaro et al., 1990, Lamers et al., 1995, Missler et al., 1997a, Schmidt et al., 1998). Während eines akuten Schubes stieg die Konzentration signifikant an, in der inaktiven Phase war die Konzentration konstant. Ebenso scheint eine S-100-Erhöhung im Liquor die Diagnose einer Creutzfeld-Jakob-Krankheit zu unterstützen und kann als Progressmarker verwandt werden (Otto et al., 1997 und 1999).

Verschiedene Publikationen berichten über das Vorkommen bei Multiinfarkt-Demenz und der Alzheimer Erkrankung (Noppe et al., 1986, Mecocci et al., 1995, Massaro et al., 1990, Schmidt et al., 1998). Beim Guillain-Barré-Syndrom spielt es eine Rolle als Marker für den Verlauf (Mokuno et al., 1994, Schmidt et al., 1998).

Wiesmann fand 1999 eine Erhöhung bei Schizophrenie und deutete dies als möglichen Hinweis auf eine andauernde Zellzerstörung (Wiesmann et al., 1999). Dies konnte in weiteren Studien bestätigt werden (Ling et al., 2007). Rothermund ging zudem davon aus, dass ein kontinuierlich erhöhter S-100B Wert mit einer negativen Symptomatik positiv korreliert (Rothermundt et al., 2001b).

Noch unklar ist die Erhöhung bei Depression in Begleitung von Melancholie. Ein Remodeling der Axone oder eine Neurodegeneration wird dabei diskutiert (Rothermundt et al., 2001a).

Daneben wird S-100 als Tumormarker nicht nur neurologischer Tumore wie dem Schwannom benutzt (Allison et al., 2005, Zhang et al., 2005). Etabliert hat es sich in der Diagnose und als prognostischer Parameter beim malignen Melanom. Es zeigt durch seinen Anstieg während einer Therapie mögliche Metastasierungen an (Strobel et al., 2007). Durch einen Konzentrationsabfall kann von einem günstigen Verlauf ausgegangen werden (Guo et al., 1995, Henz et al., 1997, Hausschild et al., 1999, Oehr et al., 1999, Auge et al., 2005, Domingo-Domenech et al., 2005, Yu et al., 2005, Hell et al., 2006).

1.4.1. *Die neuronenspezifische Enolase (NSE) und das S-100 Protein*

Ein weiterer, häufig angewandter Marker, die neuronenspezifische Enolase (NSE) kommt sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem als Isoenzym der Glykolyse und Glukoneogenese vor. Es handelt sich um ein dimeres Protein aus drei Peptidketten (α , β und γ), im Gehirn kommt die Kombination $\gamma\gamma$ vor (Marangos et al., 1987). Sie ist allerdings nicht zentralnerval spezifisch, sondern befindet sich ubiquitär im Körper im neuroendokrinen System (Schmechel et al., 1978).

So wird diese Enolase als Tumormarker für das kleinzellige Bronchialkarzinom genutzt (Royds et al., 1983, Ando et al., 2004, Karnak et al., 2005).

Bereits in den 80er Jahren fand man heraus, dass die NSE nach zerebralen Insulten im Serum deutlich ansteigt (Hardemark et al., 1989b, Cunningham et al., 1991, Skogseid et al., 1992, Barone et al., 1993, Schaarschmidt et al., 1993, Wunderlich et al., 1999, Anand et al., 2005, Bandyopadhyay et al., 2005). In weiteren Untersuchungen stieg NSE als Reaktion auf Gehirnaffektion unterschiedlicher Genese (entzündlich, traumatisch, ischämisch, epileptisch) an (Mokuno et al., 1983, Jacobi et al., 1988). Besonders das Verhalten nach Hirntraumata und Schlaganfällen ist beobachtet worden. Hierbei haben viele Autoren eine positive Korrelation zum Anstieg des S-100 Proteins gefunden (Herrmann et al., 2000b, Li et al., 2004, Kecskes et al., 2005, Sawauchi et al., 2005). Johnsson glaubte, dass nach kardialen Operationen ein beobachteter NSE-Anstieg auf Freisetzung aus Erythrozyten zurück zu führen sei (Johnsson et al., 1996), andere Kollegen sahen darin einen Indikator für eine neurologische Pathologie (Sellmann et al., 1992, Hermann et al., 1999, Rasmussen et al., 2002). Im Vergleich mit dem S-100 Protein fanden sie ein positives Korrelat, so dass beide Proteine als Indikatoren für neurologische Komplikationen nach Herzoperation verwandt wurden (Herrmann et al., 2000a).

1.4.2. *Das gliale saure Faserprotein (GFAP) und das S-100 Protein*

Das gliale saure Faserprotein (GFAP) ist im Gegensatz zum S-100 Protein und der NSE ein ausschließlich zerebral vorkommendes Protein, bestehend aus einer monomeren Polypeptidkette (Eng et al., 1977). Es wird nur in Astrozyten als filamentärer Baustein des Zytoskeletts gefunden. Bei neuropathologischen Untersuchungen ist der immunhistochemische Nachweis von GFAP inzwischen zum Routineverfahren geworden (Korzhevskii et al., 2005).

Zur Detektion von Rindern-ZNS-Gewebe in Fleisch wird es ebenfalls herangezogen (Herde et al., 2005). Der Nachweis im Serum gelang erst 1999 durch Missler (Missler et al., 1999).

GFAP reagiert sensibel auf sowohl entzündliche, als auch ischämische oder traumatische Geschehnisse am Gehirn (Noppe et al., 1986, Ehlers et al., 1994, Rosengren et al., 1995, Hoane et al., 2005, Nylen et al., 2005, Reyaz et al., 2005, Utermark et al., 2005).

Eine Erhöhung bei Trauma oder Insult konnte zusammen mit S-100 Protein und NSE beobachtet werden. In vielen Studien werden zwei oder alle drei Proteine als Indikatoren für ein schlechtes neurologisches Ergebnis genannt (Herrmann et al., 2000b, Vos et al., 2004).

1.5. S-100 in der Herzchirurgie

Im Zusammenhang mit herzchirurgischen Eingriffen geht man von einer postoperativen ischämischen Insulthäufigkeit von 1-5 % aus, damit zählen diese Komplikationen zu den häufigsten dieser Operationen (Jönsson et al., 1998). Hinzu kommen kognitive, meist reversible Funktionsdefizite, welche eine Häufigkeit von bis zu 70% erreichen (Mahanna et al., 1996).

Daher suchte man nach einem Marker, welcher leicht zu beschaffen ist und schnell Aussage darüber abgeben kann, ob eine Schädigung des Gehirns eingetreten ist, noch bevor neurologische Tests pathologisch werden, um entsprechende Maßnahmen einleiten zu können. Bereits in mehreren Studien war das S-100 Protein in Zusammenhang mit zerebraler Ischämie und Apoplex dargestellt worden (Persson et al., 1987, Fangart et al., 1988). Viele Autoren untersuchten den Anstieg des S-100 Proteins nach kardialen Operationen und setzten ihn mit einem negativen neurologischen Outcome in Zusammenhang (Johnsson et al., 1995, Westaby et al., 1996, Takayuki et al., 2003).

Sellmann befand den neuronalen Marker der neuronenspezifischen Enolase (NSE) im Liquor als aussagekräftiger für ein solches Ereignis als den glialen Marker S-100 Protein (Sellmann et al., 1992), da bei einer Ischämie die graue Substanz betroffen ist. Dem stellten andere Autoren gegenüber, dass bei einem kardialen Eingriff im Rahmen von neurologischen Komplikationen die Bluthirnschranke durchlässiger sei, womit ein S-100 Anstieg durchaus für die weitere Prognose herangezogen werden könne (Westaby et al., 1996, Wong et al., 1999, Mussack et al., 2006a).

Über die Aussage, ob die Ausschüttung ins periphere Blut mit der Dauer einer extrakorporalen Zirkulation zusammenhängt, gibt es gegensätzliche Studienergebnisse. In einigen Untersuchungen hat die Dauer Einfluss (Astudillo et al., 1996, Johnsson, 1996, Wong et al., 1999, Farsak et al., 2003, Bonacchi et al., 2006), in anderen wurde dieser Effekt nicht beobachtet (Taggart et al., 1997, Ashraf et al., 1998).

2. Ziel der Arbeit

Die S-100 Proteine werden häufig in der Literatur herangezogen, um neurologische Defizite bei Patienten nach Herzoperation abzuschätzen. Die Messung des Proteins ist einfach und ohne großen Aufwand, verglichen mit der Anfertigung eines MRT. Der Anstieg des S-100 Proteins im Blut wurde bereits nach zerebraler Ischämie und Schädelhirntrauma beschrieben.

Fast alle Studien fanden einen signifikanten Anstieg des S-100 Proteins im Blut sofort nach Ende der Operation, aber keine konnte eine Korrelation darstellen zwischen diesem schnellen Anstieg und radiologisch aufgezeigten pathologischen Befunden oder neurologischen Defiziten. Die Arbeiten, die nachweisen konnten, dass der S-100 Protein-Anstieg mit einer neurologischen Symptomatik korrelierte, zeigten, dass er erst zwei bis drei Tage nach dem klinischen Ereignis erfolgte.

Da Publikationen, die einen Zusammenhang zwischen herzchirurgischen Eingriffen und Eintreten eines neurologischen Defizits durch eine S-100 Elevation postulieren, keine zwei bis drei Tage Nachbeobachtungszeit hatten, kam der Verdacht auf, dass dieser Anstieg nicht durch Schäden an Gehirngewebe hervorgerufen wurde, sondern durch die Freisetzung von S-100 Protein aus dem durch die Operation beschädigten Geweben.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den kinetischen Verlauf des S-100 Proteinanstiegs nach einer Herzoperation und im Vergleich zu dem Verhalten der Neuroproteine (neuronen spezifische Enolase [NSE], gliales saures Faserprotein [GFAP]) und der Gewebemarker (Creatin-Kinase [CK], des MB-Isoenzym [CK-MB] und des Myoglobins [MB]) während und nach einer kardialen Operation zu untersuchen.

Ein zeitgleicher Verlauf mit den Gewebeproteinen kurz nach dem ersten Hautschnitt spräche für eine Freisetzung aus nicht-nervalem Gewebe, ein verspäteter Anstieg dagegen für die Herkunft aus dem Gehirn, wenn auch andere zerebrale Marker ansteigen.

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchte Patienten

Es wurden 20 Männer und eine Frau zwischen 46 und 76 Jahren ($62,6 \pm 8,7$ Jahre, $SD \pm$), die nach herzchirurgischer Versorgung mit einem aortokoronaren Bypass unter Einsatz der Herz-Lungenmaschine an der Universitätsklinik Lübeck behandelt worden waren, untersucht.

Gegen die Studie wurden von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck keine Bedenken erhoben (Aktenzeichen: 95-009 vom 13.2.1995 (9/95 143 Pu)).

Die Blutentnahmen erfolgten vor der Narkoseeinleitung (1.Entnahme), vor Beginn der ECC (Extracorporal Circulation/ 2.Entnahme), am Ende der Operation (3.Entnahme) und 24 Stunden nach der Operation (4.Entnahme). Die Proben wurden sogleich zentrifugiert und bei -80°C eingefroren.

Der neurologische Status der Patienten wurde klinisch vor und nach der Operation erhoben.

Es wurden neben S-100B noch NSE, GFAP, CK, CK-MB und Myoglobin bestimmt (CK, CK-MB und Myoglobin mit freundlicher Hilfe durch das Klinische Labor I).

Als zweites Kollektiv standen 17 Patienten zur Verfügung, die an der Ruprecht-Karl-Universität in Heidelberg einem herzchirurgischen Eingriff (aortokoronarer Bypass) unterzogen wurden. Zwölf waren männlich, fünf weiblich, das Alter lag zwischen 49 und 79 Jahren ($65,6 \pm 8,8$ Jahre).

Bei ihnen wurde alleinig das S-100-Protein bestimmt und zwar 30 Minuten vor Beginn der ECC (1.Entnahme), am Operationsende (2. Entnahme), 6 Stunden nach Ende der ECC (3.Entnahme), am ersten Tag postoperativ (4. Entnahme), zweiten Tag postoperativ (5.Entnahme), dritten Tag postoperativ (6. Entnahme) und vierten Tag postoperativ (7. Entnahme). Auch diese Proben wurden sogleich zentrifugiert und eingefroren, die Patienten ebenfalls mehrfach neurologisch untersucht.

Für die Bestimmung der Referenzwerte wurden Proben von 121 Blutspendern, welche keine neurologischen oder andere schwere Erkrankungen hatten, die unseres Wissens nach einen Einfluss auf S-100, NSE oder GFAP haben könnten, untersucht.

3.2. Labormethoden

3.2.1. Benötigtes Material und Geräte

Chemikalien:

• „Ampuwa“, Aqua bidest,	Fresenius
• 20% Polyethylenglycol,	Merck
• Biotinaminocaproylester,	Sigma
• Kalziumchlorid,	Merck
• Delfia [®] Eu-Labeling Reagent 1244-301,	Wallac
• Diethylentriaminpentaazetat (DTPA),	Sigma
• Essigsäure Analytical Grade,	Merck
• Ethanol 100% reinst,	Merck
• Dinatriumhydrogenphosphat-Monohydrat,	Merck
• Natriumchlorid,	Merck
• Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat,	Merck
• Natriumazid reinst,	Merck
• Natriumcarbonat,	Merck
• Natriumhydrogencarbonat,	Merck
• Phtalsäure, Kaliumsalz,	Sigma
• Salzsäure 37%,	Merck
• Thenoyltrifluoroaceton,	Sigma
• Tris-n-octylphosphinoxid,	Merck /Sigma
• Trishydroxymethylaminomethan,	Merck
• Triton X-100,	Sigma
• Tween 20,	Sigma

Antikörper:

• Anti S-100 polyklonal vom Kaninchen,	DAKO
• Anti S-100 β von der Maus,	Sigma (Clone SH-B4),
• Bovines γ -Globulin,	Sigma
• BSA (Bovines Serum Albumin),	Sigma
• Mausserum,	Sigma
• Pferdeserum ,	GIBCO
• S-100 aus Rinderhirn,	Sigma
• Serumalbumin,	Sigma
• Streptavidin,	Biomol

Mikrotiterplatten:

• Flachboden-Mikrotiterplatten	Nunc Maxisorp F96
--------------------------------	-------------------

Geräte:

- | | |
|---|-----------|
| • Delfia [®] Plate Dispenser, | Wallac |
| • Delfia [®] Platewasher, | Wallac |
| • DELFIA [®] 1232/ 1234 Fluorometer, | Wallac |
| • Mikrotiterplattenschüttler, | Heidolph |
| • Sephadex G100 [®] -Säule, | Pharmacia |

Zur Auswertung wurde das FIA-Calc[®] Auswertungsprogramm der Firma Wallac verwandt.

3.2.2. Herstellung des Carbonatpuffers

Der Carbonatpuffer wurde für die Biotinylierung des 2. Antikörpers (polyklonaler Antikörper der Firma DAKO) benötigt. Auf einen Liter Aqua bidest kamen 1,62 g Natriumcarbonat, 2,99 g Natriumhydrogencarbonat und 1,0 g Natriumazid. Der pH-Wert lag bei 9,6. Gelagert wurde der Puffer bei 4°C.

3.2.3. Herstellung des Phosphatpuffers

Der Phosphatpuffer wurde zur Plattenbeschichtung verwandt. Auf einen Liter Aqua bidest kamen 8,85 g Na₂HPO₄ und 0,068 g NaH₂PO₄. Der pH-Wert wurde auf 8,5-8,6 eingestellt.

3.2.4. Herstellung des Assaypuffers LKC

6 g TRIS, 9 g NaCl, 0,1ml Tween 20 und 1 g Natriumazid kamen auf einen Liter Aqua bidest. Mit 37 %iger Salzsäure wurde der Puffer auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Schließlich wurden 5 g BSA und 0,5 g γ -Globuline darin gelöst. Gelagert wurde der Puffer bei 4°C.

3.2.5. Herstellung des Assaypuffers LKC-DTPA

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Reagenzien kamen 80 mg DTPA hinzu. Dann erst wurde der Puffer auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und die weiteren Zutaten darin gelöst.

3.2.6. Herstellung des TRIFMA-Waschkonzentrat

Auf einen Liter Aqua bidest wurden 15 g TRIS, 225 g NaCl und 100 ml Tween20 gegeben. Das Ganze wurde auf einen pH-Wert von 7,5 gepuffert.

In einer 1:50-Verdünnung wurde die Lösung zum Waschen eingesetzt. Die Lösung kann bei Raumtemperatur ohne Stabilisator gelagert werden.

3.2.7. Herstellung der Enhancementlösung

Es wurden 6,25 ml 100 %ige Essigsäure in einem Liter Aqua bidest gelöst. Nachdem 222 mg Thenoytrifluoroaceton und 38,5 mg Tri-n-octylphosphinoxid in 2 ml Ethanol reinst gelöst worden waren, wurden sie zur Essigsäurelösung gegeben. Hinzu kamen noch 2 ml Triton X-100 und schließlich 1,6 g Phtalsäure.

Diese Lösung ist bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss über Jahre stabil.

(Die Pharmacia-Enhancementlösung hat eine um etwa 25 % höhere Lichtausbeute, da sie als Sekundärkomplexbildner statt Thenoyltrifluoroaceton Naphtoyltrifluoroaceton enthält. Da das hier verwandte Thenoyltrifluoroaceton für die Komplexbildung mehr Zeit benötigt, muss die Lösung mindestens 20 Minuten im Assay inkubieren.)

3.2.8. Markierung des Streptavidin mit Europium

Gemäß der Herstellervorschrift wurden 20 mg Streptavidin mit dem Europium Labelling-Reagent[®] markiert. Durch Gelfiltration mit der Sephadex G100[®]-Säule wurden die ungebundenen Europiumkomplexe mit TRIS/HCl 0,05 mol/l bei einem pH-Wert von 7,5 getrennt, so dass ausschließlich Europiummarkierte Streptavidinmoleküle gesammelt

wurden. Die Anteile, die Protein enthielten, wurden gepoolt und in Eppendorf-Hüttchen zu je 200 µl Portionen bei -80°C eingefroren.

Zur Kontrolle diente eine Messung von 10 µl einer 1:10.000-Verdünnung im Fluorometer.

3.2.9. Biotinylierung des zweiten Antikörpers

Nach Fällung mit 20 %igem Polyethylenglycol in Carbonatpuffer 0,05 mol/l bei einem pH-Wert von 9,6 wurden 10 mg Antikörper (DAKO) resolubilisiert und über Nacht bei 4°C mit 1,5 mg Biotinamidocaproylester, welcher in 50 µl wasserfreiem Dimethylformamid gelöst worden war, inkubiert.

Durch die Gelfiltration über die Sephadex G100®-Säule mit TRIS/HCl 0,05 mol/l bei einem pH-Wert von 7,5 wurde das ungebundene Biotin getrennt. Die antikörperhaltigen Fraktionen, welche durch photometrische Messung bei 280 nm bestimmt worden waren, wurden gepoolt und in Portionen von jeweils 200 µl bei -80°C gelagert.

3.3. S-100B-Messung

3.3.1. Durchführung des S-100 Assays

Bei der hier beschriebenen Meßmethode handelt es sich um einen immunofluorometrischen Sandwich-Festphasenassay mit Flachboden-Mikrotiterplatten als Festphase.

Die Flachboden-Mikrotiterplatten wurden mit je 10 µl der Antikörperlösung von Sigma gegen die S-100β-Kette in 20 ml Phosphatpuffer (pH 8,6; 0,05 mol/l) beschichtet, entsprechend 400 ng/well Antikörper.

Der Antikörper wurde bei 4°C über 24 Stunden inkubiert.

Die beschichteten und inkubierten Platten wurden mit TRIFMA-Waschlösung (je 5 ml/well) dreimal im DELFIA® Platewasher gewaschen und mit jeweils 300 µl/well Carbonatpuffer (0,05 mol/l; pH 9,6) mit bovinem Serumalbumin (10 g/l) zur Absättigung unspezifischer Bindungen für 10 Minuten inkubiert.

Es folgte ein weiterer Waschvorgang wie eben beschrieben, wonach jeweils 200 µl Standard zusammen mit je 50 µl Pferdeserum, das 25 mmol/l Kalziumchlorid enthielt, Kontrollen und Proben für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 150 min⁻¹ inkubiert wurden.

Der Messstandard setzte sich aus einer 1:2 Mischung von gereinigtem S-100a (S-100αβ) und S-100b (S-100ββ) Protein vom Rind (Sigma) zusammen. Er wurde mit Pferdeserum (GIBCO) auf die folgenden Konzentrationen verdünnt: 25 µg/l; 12,5 µg/l; 2,5 µg/l; 0,5 µg/l; 0,1 µg/l und 0,02 µg/l.

Die Kontrollen hatten eine Konzentration von 0,35 µg/l in Kontrolle 1 und 3,5 µg/l in Kontrolle 2.

Standards, Kontrollen und Proben wurden nach folgendem Schema auf die Platte pipettiert (siehe Abb. 4):

	1+2	3+4	5+6	7+8	9+10	11+12
A	0,02	0,1	0,5	2,5	12,5	25
B	LKC	Pferd	NaCl	K1	K2	Probe 1
C	Probe 2	...				
D						
E						
F						
G						
H			...	Probe 35	K1	K2

Abb.4: Pipettierschema: Die Reihe A enthält die Standardproben, in Reihe B wurden der LKC-Puffer, Pferdeserum, Natriumchlorid (NaCl), die Kontrollen 1 und 2 (K1 und K2) und die erste Probe in Doppelbestimmung aufgetragen. Um zu kontrollieren, inwieweit die Messwerte zum Ende hin abfallen, wurden an die letzten Vertiefungen nochmals die Kontrollen 1 und 2 pipettiert.

Nach 90 Minuten Inkubation auf dem Mikrotiterplattenschüttler wurde die Platte wiederum wie oben dargestellt gewaschen und mit einer Mischung aus 20 ml LKC-Puffer mit 5 mmol/l CaCl₂, 200 µl Mausserum, 1 ml Pferdeserum und 20 µl des biotinylierten polyklonalen Antikörpers von DAKO bestückt. Dies entspricht einer Antikörperkonzentration von 2 mg /l. Die Platte wurde weitere 90 Minuten auf dem Schüttler inkubiert.

Nach einem weiteren Waschgang wurde mit Europium markiertes Streptavidin in LKC-DTPA in einer Verdünnung von 1: 25.000 entsprechend 12 µg/l für weitere 30 Minuten inkubiert.

Danach folgte der letzte Waschvorgang, anschließend wurden 200 µl/well Enhancementlösung hinzugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von mindestens 20 Minuten wurde die Platte im DELFIA®-Fluorometer gemessen.

Mit Hilfe des Fia-Calc®-Auswertungsprogramms wurde die Standardkurve als Spline-Funktion errechnet und in doppelt logarithmischer Form dargestellt.

Die Konzentration der Proben wurde anhand der Standardkurve ermittelt.

Es wurden immer Doppelmessungen durchgeführt.

3.3.2. Vergleich mit dem Sangtec 100 LIA®

Um einen Vergleich zwischen unserem Assay und dem der Firma Sangtec ziehen zu können, wurden die Lübecker Proben mit beiden Verfahren gemessen. Für die DELFIA Messungen verwendeten wir Heparin-Plasma, die 100 LIA®- Bestimmungen erfolgten aus Serum.

Die Verwendung des 100 LIA® Assays wurde gemäß der Herstellervorschrift durchgeführt.

Um Referenzbereiche zu definieren, wurden Proben von 121 gesunden Blutspendern (64 männlich, 57 weiblich, 18-65 Jahre alt) mit beiden Verfahren untersucht.

Um die Spezifität der Methoden für die verschiedenen Subtypen des S-100 Proteins zu prüfen, verwendeten wir hoch gereinigte, rekombinant hergestellte S-100A1 und S-100 B Proteine, welche freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Remppis der Medizinischen Klinik II der Universität zu Lübeck bereitgestellt wurden. Die Ausgangslösungen der rekombinanten Proteine waren für das S-100A1 Protein 6,39 g/l und für das S-100 B Protein 1,3 g/l. Außerdem fanden aus Rinderhirn isolierte Dimere von Sigma (S-100 αα, αβ und ββ) Anwendung. Sie waren auf 1 mg/l vorverdünnt. Durch Verdünnung mit Assay-Diluent für den 100 LIA® und mit Pferdeserum für den DELFIA ergab sich eine Endkonzentration von 63.900 µg/l S-100 A1, 0,13 bzw. 1,3 µg/l S-100B, 1 bzw. 10 µg/l S-100a (αβ), 0,1 bzw. 1 µg/l S-100b (ββ) und 10.000 bzw. 1.000 µg/l S-100a₀ (αα).

Für die untere Nachweisgrenze wurden Messungen der Impulsraten mit 20-facher (DELFIA) und 15-facher (100 LIA[®]) Bestimmung der Verdünnungsmatrix als Mittelwert plus 3-fache Standardabweichung durchgeführt.

Die Präzision erhielten wir durch die Variationskoeffizienten aus 15 nacheinander abgelaufenen Messungen in den Konzentrationsbereichen <0,1; 0,1-0,49; 0,5-1,0 und >1,0 µg/l.

3.4. NSE-Messung

3.4.1. Antikörper

Für die Beschichtung der Festphase diente ein polyklonaler Antikörper vom Kaninchen (Firma DAKO). Mit jeweils 2 µg/well in 200 µl Carbonatpuffer 0,05 mol/l bei einem pH von 9,6 wurden die Mikrotiterplatten bei 4°C über 24 Stunden inkubiert. Der zweite Antikörper, ebenfalls polyklonal vom Kaninchen (Firma DAKO) wurde biotinyliert in einer 1:1000 Verdünnung im Assaypuffer eingesetzt.

3.4.2. Standard

Es wurde der Standard der Firma Hoffman La Roche (Cobas Core[®] NSE EIA) benutzt.

3.4.3. Assaydurchführung

In 200 µl/well Assaypuffer wurden in Anlehnung an das Probeschema von S-100 10 µl des Standards, der Kontrollen und der Patientenproben für zwei Stunden auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde danach dreimal mit Waschpuffer gewaschen und nach Zugabe von 200 µl des zweiten Antikörpers (1:1000 verdünnt) in 200 µl/well Assaypuffer für eine weitere Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschvorgang folgte die Inkubation mit Streptavidin-Europium für 30 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur und nach einem letzten Waschen die Inkubation mit der Enhancementlösung für ebenfalls 30

Minuten. Wie zuvor beim S-100 Assay wurden die Ergebnisse auf dem DELFIA® 1232 (1234) Fluorometer gemessen und mit Hilfe des FIA-Calc®-Programms durch eine doppelt logarithmische Spline-Funktion ausgewertet.

3.5. GFAP-Messung

3.5.1. Antikörper

Die Mikrotiterplatte wurde zunächst mit 400 ng/well eines polyklonalen Ziegenantikörpers (affinitätsgereinigt) gegen Maus-Immunglobulin in 200 µl Carbonatpuffer 0,05 mol/l bei einem pH von 9,6 über 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach zweifachem Waschen mit Waschpuffer wurden 600 ng/well des eigentlichen Antikörpers gegen GFAP, einem monoklonalen Antikörper von der Maus (Firma Sigma, Klon G-A-5), in 200 µl Assaypuffer über 24 Stunden bei 4°C inkubiert.

Als zweiter Antikörper wurde ein biotinylierter polyklonaler Antikörper vom Kaninchen gegen GFAP (Firma DAKO) verwendet.

3.5.2. Standard

Als Standard wurde hochreines GFAP (Firma Progen) in einem humanen Serumpool 1:1500 verdünnt. Letzterer zeigte nach längerer Lagerung keine GFAP-Restaktivität mehr.

3.5.3. Assaydurchführung

Die zuvor beschichtete Mikrotiterplatte (siehe Antikörper) wurde mit 200 µl/well des Standards, der Kontrollen und der Patientenproben nach dem Schema des S-100 Assays für eineinhalb Stunden auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte auf zweimaliges Waschen die Inkubation mit dem zweiten Antikörper in Assaypuffer mit 50% Kälberserum (NCS, GIBCO) für eineinhalb Stunden auf dem Schüttler bei Raumtemperatur. Wie beim S-100 Assay und beim NSE-Assay kamen nun die

Inkubationsschritte mit Streptavidin-Europium und Enhancementlösung, sowie die Messung und Auswertung der Standardkurve.

3.6. CK- und CK-MB- Bestimmung

Standardmethode enzymatisch mittels der Creatinin-Hexokinase-Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Methode, Hitachi 717 Analyzer (Roche)

3.7. Myoglobin-Bestimmung

Standardmethode nephelometrisch, Hitachi 717 Analyzer (Roche)

3.8. Statistische Methoden

Die fünf Parameter wurden zu den Zeitpunkten vor Einleitung der Narkose (1. Entnahme) und am Operationsende (3. Entnahme) mittels Spearman Rank-Korrelation verglichen.

Der Mittelwert und eine Standardabweichung vom Mittelwert wurden von jeder Entnahme erhoben. Die Zahlen wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. Unterschiede von $p \leq 0,05$ wurden als signifikant eingestuft.

Zur Korrelation der beiden Messverfahren für das S-100 Protein wurden die Ergebnisse mit der Pearson-Methode verglichen.

Während der Planung zu dieser Arbeit fand ein beratendes Gespräch bei Herrn PD Dr. H.-J. Friedrich, Hochschuldidaktische Arbeitsstelle, Dekanat des Med. Fakultät, Universität zu Lübeck statt. Zum Zeitpunkt des Gespräches war Herr PD Dr. H.-J. Friedrich am Institut für Medizinische Biometrie und Statistik, Universität zu Lübeck, tätig.

Zur Erstellung des Textes, der Tabellen und Graphiken sowie der Statistik sind folgende Computerprogramme herangezogen worden: Microsoft Word, Microsoft Excel sowie SPSS für Windows, Version 11.0.

4. Ergebnisse

4.1 S-100B

4.1.1. Spezifität des S-100-Assays

Die Nachweisgrenze der Methode lag für S-100A1 bei 0,015 µg/l.

S-100B wurde in einer Probe, die 0,13 µg/l enthielt, mit 2,19 µg/l bestimmt, 1,3 µg/l S-100B wurden in einer zweiten Probe mit 7,45 µg/l bestimmt.

Die gezeigten Kreuzreaktionen lassen sich folgendermaßen aufrechnen: Keine Kreuzreaktion bei Messung des monomeren S-100A1, 572-1682 % für S-100 B (hier geben die Verdünnungsstufen die Breite vor). Das S-100A1-A1 (oder $\alpha\alpha$ oder S-100 a₀) präsentierte eine prozentuale Kreuzreaktion von 0,06-0,07 %, das S-100A1-B lag zwischen 52-129 % und S-100B-B ($\beta\beta$ oder S-100b) bei 600-2380 %.

4.1.2. Standardkurve S-100B

Die Standardkurve des S-100B Proteins reichte von 0,02 µg/l bis 25 µg/l (siehe hierzu Abb. 5 und Tab. 3).

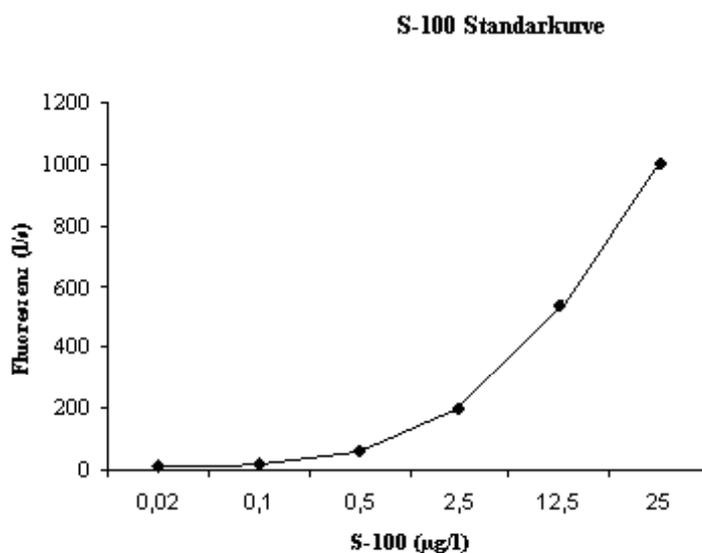


Abb.5: Standardkurve des S-100B Immunfluoreszenzassays

S-100 Protein Standardkonzentration in µg/l	Fluoreszenzsignal in Impulse/s
0,02	11.300
0,1	20.345
0,5	65.687
2,5	202.395
12,5	536.632
25	999.512

Tab.3 S-100 B Standardkonzentrationen mit Messimpulsen

4.1.3. Untere Nachweisgrenze S-100B

Die Konzentration, der der Mittelwert der Impulse von 20 Messungen des Verdünnungsmediums + 3 s entsprach, stellt die untere Nachweisgrenze dar.

4.1.4. Wiederfindung

Kalibrierte S-100 Mengen (A1-B:B-B im Verhältnis 1:2) wurde im Probandenplasma zu 95% wieder gefunden. Im Liquor lag die Wiederfindung bei 94-103%.

4.1.5. Hochdosiseffekt

Ein Hochdosiseffekt wurde bis zu einer S-100B Konzentration von 5000 µg/l nicht beobachtet.

4.1.6. Lagerungsstabilität der beschichteten Mikrotiterplatten

Es kam zu keinem signifikanten Abfall der Impulse nach sechs Wochen Lagerung.

4.1.7. *Präzision*

Die Intraassayvarianz betrug 3,2 % bei 5,2 µg/l, 2,1 % für 5,97 µg/l und 2,3 % für 11,4 µg/l bei 20 Messungen. Bei konsekutiven 21 Messungen ergab sich eine Interassayvarianz von 11,5 % für 0,45 µg/l, 7,9 % für 4,79 µg/l und 7,8 % für 15,45 µg/l. Daraus ermittelte sich ein Variationskoeffizient für die Doppelwertbestimmung von 7,9 %, 3,6 %, 3,2 % und 2,2 % bei Messbereichen von <0,1 µg/l, 0,1-0,49 µg/l, 0,5-1,0 µg/l und >1,0 µg/l.

4.1.8. *Optimale Kalziumkonzentration zur Wiederfindung*

Bei einer Kalziumkonzentration von 5 mmol/l wird in der Literatur (Sindic et al., 1982) die beste Wiederfindung von S-100 Protein in Serum und Heparin-Plasma beschrieben. Wir verwendeten daher ebenfalls eine Kalziumkonzentration von 5 mmol/l.

4.1.9. *Referenzwerte*

Als Plasma-Referenzwerte wurden Untersuchungen mit 121 gesunden Probanden herangezogen. Die Plasmakonzentration lag bei 0,059 +/- 0,038 µg/l, die obere Grenze bei 0,135 µg/l.

4.1.10. *Linearität*

Um unspezifische Effekte auszuschließen, wurden geometrische Verdünnungsreihen durchgeführt. Nach Zugabe von 10 µg/l S-100 (wie bei den Standards) zum Patientenplasma ergab sich der in der Abbildung 6 verzeichnete Verlauf.

Assay-Linearität

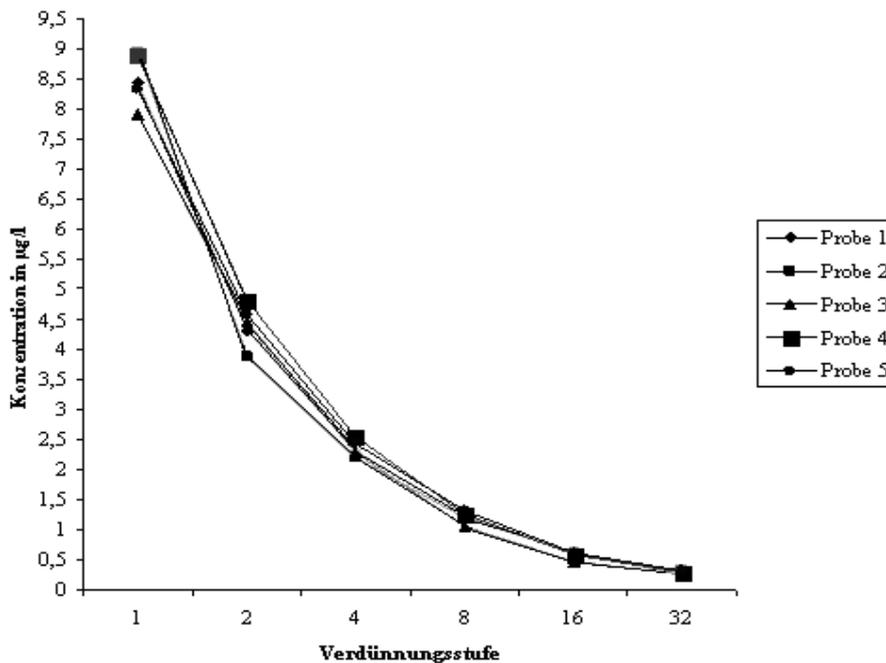


Abb.6 : Linearität des DELFIA-Assays

4.1.11. Vergleich mit dem 100 LIA[®] von Sangtec

Beide Assays wurden bezüglich Spezifität, Wiederfindung, unterer Nachweisgrenze und Präzision verglichen.

Bei der Untersuchung der Spezifität des Assays wurde S-100A1 bis zu Konzentrationen von 6,39 mg/l zugesetzt und vom Assay mit 0,013 µg/l erfasst und lag somit unterhalb der unteren Nachweisgrenze, der 100 LIA[®] zeigte 0,029 µg/l an. Eine S-100B-Probe mit 0,13 µg/l erzielte bei 100 LIA[®] 5,04 µg/l, beim DELFIA[®] 7,45 µg/l.

Deutliche Kreuzreaktionen traten bei den Messungen der Dimere auf. S-100A1-A1 ($\alpha\alpha$) wurde bei einer Konzentration von 10.000 µg/l und 1.000 µg/l im 100 LIA[®] mit 12,8 µg/l und 1,76 µg/l und im DELFIA[®] mit 6,63 µg/l und 0,58 µg/l gemessen. Damit ergibt sich eine Kreuzreaktion für den 100 LIA[®] von 0,13-0,18 % und für den DELFIA[®] von 0,06-0,07 % für S-100A1-A1.

Bei Messung des S-100A1-B Dimers ($\alpha\beta$ oder S-100a) mit 10 µg/l und 1 µg/l lag die erste Messung für den 100 LIA[®] oberhalb des Messbereichs, der zweite Wert bei

13,8 µg/l, für den DELFIA[®] wurden 5,18 µg/l und 1,29 µg/l erzielt. Die Kreuzreaktion lag daher beim 100 LIA[®] bei 1380 % und beim DELFIA[®] zwischen 51,8 und 129 %.

Die Konzentration von 0,1 bzw. 1 µg/l des Dimers S-100B-B (ββ oder S-100b) lag beim 100 LIA[®] bei 2,02 µg/l bzw. 4,82 µg/l, beim DELFIA[®] bei 2,38 µg/l bzw. 6,00 µg/l. Dementsprechend errechnete sich daraus eine Kreuzreaktion von 428-2020 % beim 100 LIA[®] und 600-2381 % beim DELFIA[®].

Die Wiederfindungsrate wurde mit sechs Mischkombinationen aus sechs Patientenproben ermittelt und ergab bei 100 LIA[®] 94,8-113,2 % und beim DELFIA[®] 89,7-100,6 %.

Die untere Nachweisgrenze wurde beim 100 LIA[®] als 0,02 µg/l und beim DELFIA[®] als 0,015 µg/l ermittelt.

Die Präzision für die Konzentrationen von <0,1 g/l, 0,1-0,49 µg/l, 0,5-1,0 g/l und >1,0 µg/l lagen bei den Doppelwertbestimmungen für den 100 LIA[®] bei 15,2 %, 5,7 %, 3,7 % und 2,5 %. Entsprechend fanden sich für den DELFIA[®] 7,9 %, 3,6 %, 3,2 % und 2,2 %.

4.2. NSE Meßmethode

Für die Messung der neuronenspezifischen Enolase (NSE) liegt mit dem Enzymimmunoassay von Hoffmann La Roche (Cobas Core[®] NSE EIA) ein gut erprobter Assay vor. Mit unserer Methode wurden in Vergleichsmessungen fast identische Werte erzielt (Korrelationskoeffizient bei 96 Messungen $r^2 = 0,98$). Daher wurde auf eine weitere Linearitätsmessung verzichtet.

Die Standardkurve reichte von 1 µg/l bis 200 µg/l (Abb.7).

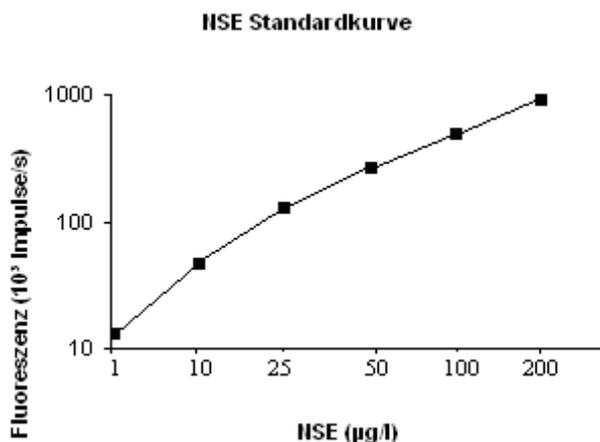


Abb. 7: NSE-Standardkurve

Als untere Nachweisgrenze wurde bei einem Probeneinsatz von 10 μl / well 1 $\mu\text{g/l}$ NSE ermittelt.

Die Wiederfindung in Plasma und Serum lag bei 95,9 \pm 5,3 %, dazu wurden zehn verschieden Proben zunächst einzeln, dann in einer 1:2 Mischung vermessen.

Der Mittelwert des Referenzkollektivs aus 32 gesunden Blutspendern lag bei 8,1 \pm 2,38 $\mu\text{g/l}$ NSE. Die obere Grenze wurde mit 12,8 $\mu\text{g/l}$ ermittelt.

Ein Hochdosiseffekt trat bis 1.000 $\mu\text{g/l}$ NSE nicht auf.

Die Intraassayvarianz betrug für 10 $\mu\text{g/l}$ 2,99 %, für 84 $\mu\text{g/l}$ 4,7 % und für 184 $\mu\text{g/l}$ 2,0 %. Für die Interassayvarianz bei 19 $\mu\text{g/l}$ waren es 6,27 %, für 77 $\mu\text{g/l}$ 7,54 %.

4.3. GFAP-Meßmethode

Die GFAP-Standardkurve reichte von 0,01 $\mu\text{g/l}$ bis 12,5 $\mu\text{g/l}$, dargestellt in Abbildung 8.

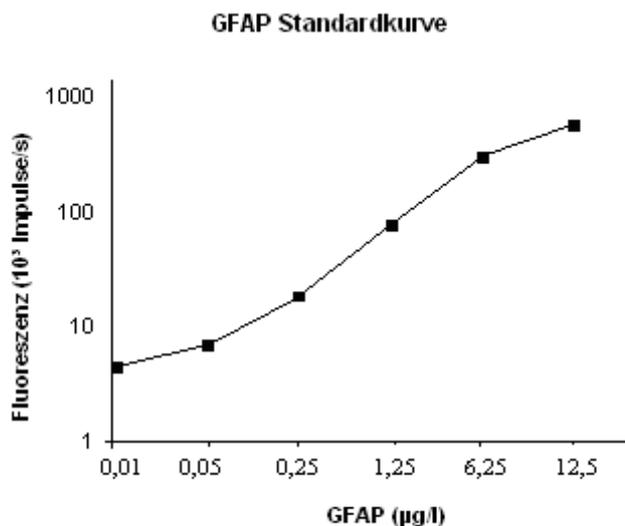


Abb. 8: GFAP-Standardkurve

Die untere Nachweisgrenze wurde mit $\leq 0,01$ $\mu\text{g/l}$ ermittelt.

Anders als beim S-100 Protein und NSE standen keine anderen Meßmethoden zum Vergleich zur Verfügung. Im Serum ergab sich eine Wiederfindung von 103,8 % im Mischungsverhältnis. Dies errechnete sich aus zwei Versuchen, in denen eine Zielkonzentration von 4,75 µg/l zu 77 % und eine Konzentration von 0,475 µg/l zu 89 % gemessen wurden (100,0-107,4 % bei einer Mischzielkonzentration von 0,152-0,23 µg/l).

Auch beim GFAP wurde eine Verdünnungsreihe zur Linearitätsprüfung angesetzt. Der Standard wurde mit vier Patientenproben geometrisch verdünnt (siehe Tab. 4).

Verdünnungsstufe	GFAP-Konzentration nach Verdünnung			
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
1	8,08	3,63	8,24	3,63
2	4,05	1,64	3,95	1,79
4	1,88	0,79	1,91	0,84
8	0,88	0,34	0,92	0,48
16	0,37	0,14	0,39	
32	0,16	0,06	0,17	

Tab.4: GFAP-Linearität

Aus dem Blut von 200 gesunden Blutspendern wurden die Referenzwerte ermittelt. 131 davon waren Plasmaproben, in denen in 44,3 % GFAP-Konzentrationen innerhalb des Messbereiches gefunden wurden, bei den 69 Serumproben 17,3 %. Damit ergab sich ein Mittelwert von 0,013 +/- 0,014 µg/l für die Plasmaproben und 0,0048 +/- 0,0038 µg/l für die Serumuntersuchungen. Aus diesen Daten ließ sich kein Referenzbereich erstellen.

Bei 0,2 µg/l lag eine Intraassayvarianz von 4,71 % vor, bei 1,95 µg/l waren es 4,24 %, bei 9,58 µg/l 3,52 %.

Zwischen den Assays trat eine Varianz von 10,9 % bei 0,066 µg/l, 7,3 % bei 0,70 µg/l und 7,5 % bei 7,46 µg/l auf.

4.4. Neurologische Defizite

Untersucht wurden 21 Patienten, welche in Lübeck einer Operation mit kardiopulmonalem Bypass unterzogen worden waren, und 17 Patienten, die in Heidelberg ebenfalls ähnliche Operationen benötigt hatten.

Keiner der 21 Lübecker Patienten erlitt postoperativ ein neurologisches Defizit. Einer erwachte verzögert, zeigte aber keine neurologischen Auffälligkeiten.

Drei der 17 Heidelberger Patienten erwachten ebenfalls verzögert, drei andere hatten postoperativ einen Schlaganfall. Die S-100B Höchstwerte der sechs auffälligen Patienten waren nicht höher als die der neurologisch unauffälligen Patienten.

$p > 0,05$; Mann-Whitney-U Test.

4.5. Peri- und postoperative Konzentrationen des S-100B

Die mittleren S-100B Protein Werte der Lübecker Patienten lagen vor Beginn der Operation bei $0,048 \pm 0,050 \mu\text{g/l}$ (1.Entnahme), waren vor Beginn des extrakorporalen Kreislaufs auf $0,178 \pm 0,113 \mu\text{g/l}$ angestiegen (2.Entnahme), erreichten am Ende der Operation $1,580 \pm 0,913 \mu\text{g/l}$ (3.Entnahme) und fielen am 1. Tag postoperativ auf $0,230 \pm 0,131 \mu\text{g/l}$ (4.Entnahme) ab.

Der Vergleich zwischen dem 100 LIA[®] Assay und der von uns gewählten Meßmethode zeigte eine Korrelation von $r^2 = 0,943$ ($y = 1,85x + 0,068$). Die Werte des 100 LIA[®] lagen allerdings 1,85-mal höher.

Bei den Heidelberger Patienten wurden zu acht Zeitpunkten Proben entnommen. Vor Operation (1.Entnahme) lag der S-100B-Wert bei $0,035 \pm 0,022 \mu\text{g/l}$, stieg 30 Minuten nach Start des extrakorporalen Kreislaufs (2.Entnahme) auf $0,388 \pm 0,234 \mu\text{g/l}$ an. Am Ende des Eingriffs (3.Entnahme) hatte er $1,0 \pm 0,567 \mu\text{g/l}$ erreicht. Nach sechs Stunden (4.Entnahme) fiel der Wert wieder auf $0,241 \pm 0,135 \mu\text{g/l}$ ab. Am ersten postoperativen Tag (5.Entnahme) konnten wir noch $0,154 \pm 0,075 \mu\text{g/l}$ messen. Die Probenentnahme am zweiten, dritten und vierten postoperativen Tag (Entnahme 6,7 und 8) ergaben $0,135 \pm 0,111 \mu\text{g/l}$, $0,089 \pm 0,080 \mu\text{g/l}$ und $0,051 \pm 0,040 \mu\text{g/l}$.

Verglichen werden konnten die Entnahmen präoperativ, am Ende der Operation und 24h nach Operation beider Kollektive. Es wird deutlich, dass das S-100B Protein in beiden Kollektiven bis zum Ende des Eingriffs ansteigt und zum ersten Tag nach OP wieder abfällt.

Besonders deutlich wird dieser Ablauf in der graphischen Darstellung (Abb. 9a und b).

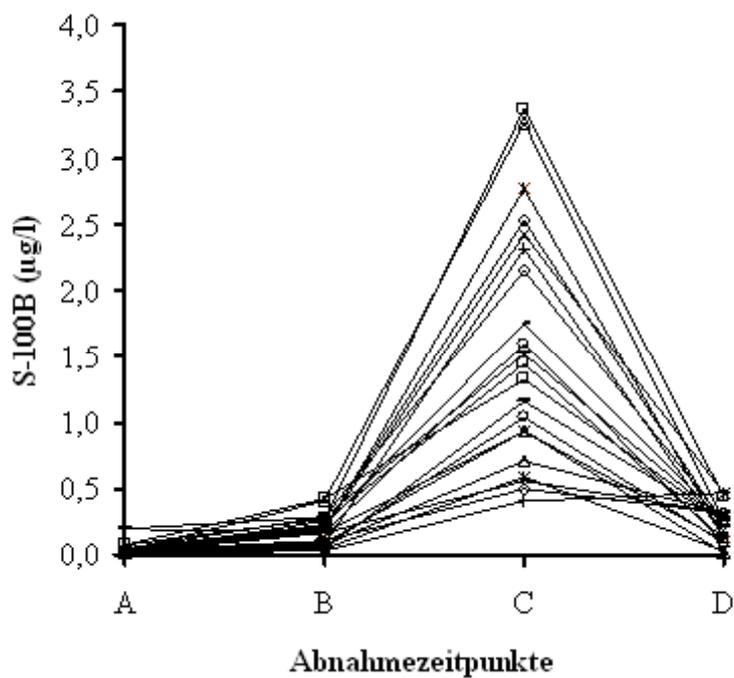


Abb. 9a: S-100B Verlauf des Lübecker Patientenkollektivs

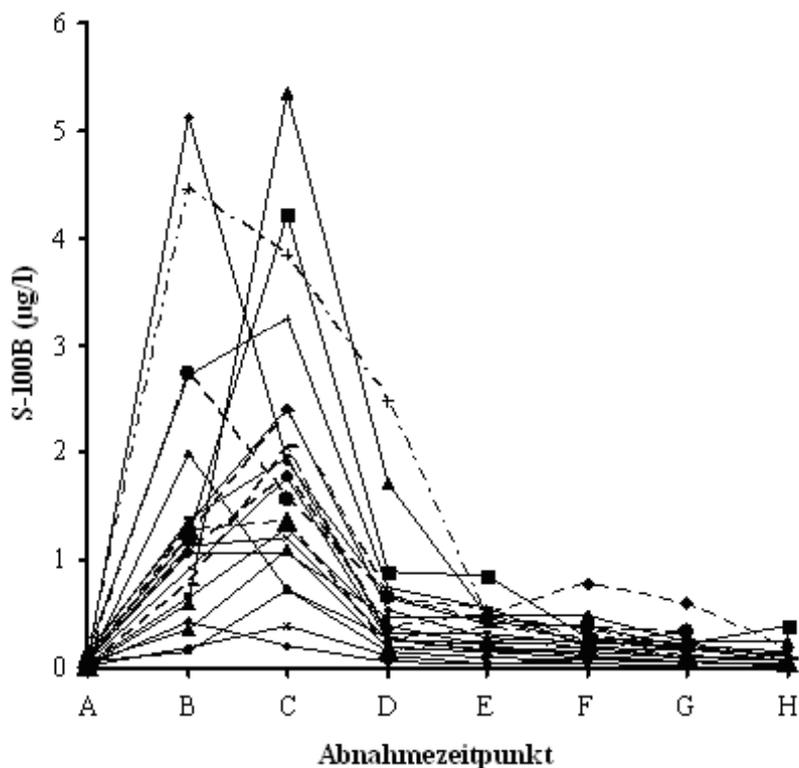


Abb. 9b: S-100B Verlauf des Heidelberger Patientenkollektivs

4.6. Perioperativer Konzentrationsverlauf aller Marker

Bei den 21 Lübecker Patienten wurden neben dem S-100B Protein auch die Konzentrationen von NSE, GFAP, CK, CK-MB und Myoglobin bestimmt.

Mit Ausnahme des GFAP, dessen Werte immer unter der Nachweisgrenze blieben, zeigten alle anderen Marker einen Anstieg im Laufe der OP.

Das Myoglobin reagierte als erstes, vor Operation lag der Mittelwert noch bei 38 ± 14 , bereits vor Beginn der extrakorporalen Zirkulation stieg es um das Doppelte an (79 ± 27), hatte zum Operationsende sein Maximum erreicht (430 ± 101) und sank dann am ersten Tag postoperativ wieder leicht ab.

Das CK erreichte sein Maximum erst 24 h nach Operation (Ausgangswert 21 ± 14 , 24 h später 351 ± 451), NSE und CK-MB hatten ihren Peak am Ende der Operation.

Die Mittelwerte sind hier graphisch zusammengefasst.

In der Darstellung wird deutlich, dass sich das S-100B Protein ähnlich wie die anderen Marker verhält (Abb.10).

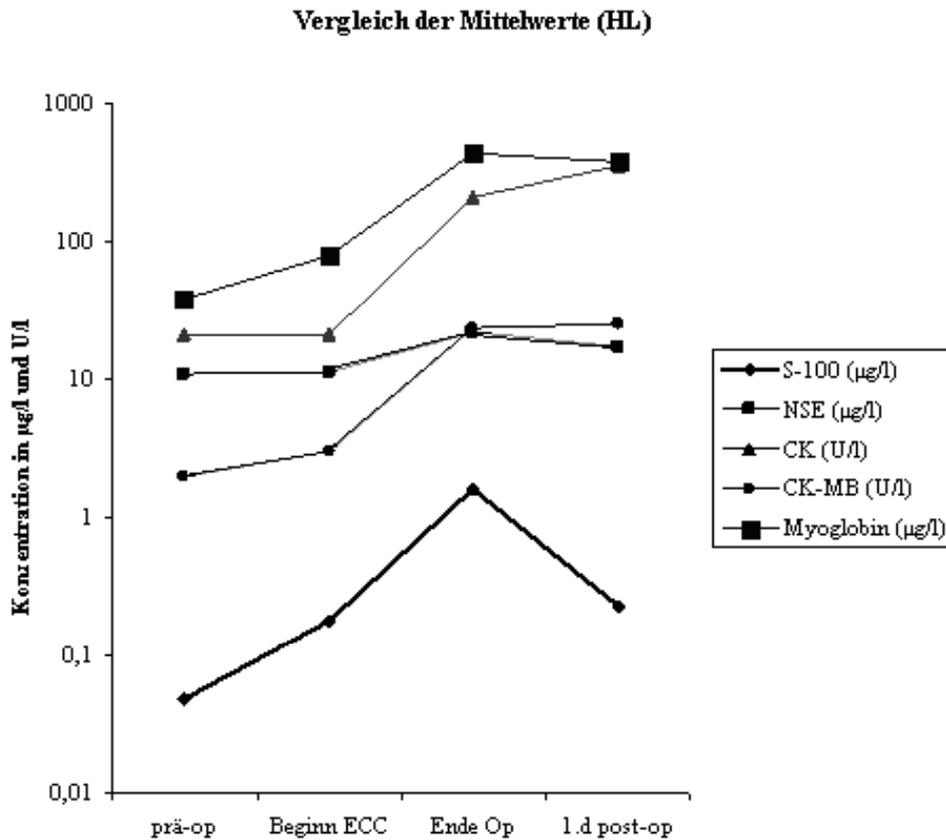


Abb. 10: Vergleich von S-100B mit NSE, GFAP, CK, CK-MB und Myoglobin

Wenn man die Ergebnisse vor und am Ende der Operation mittels des Spearman-Rankings vergleicht, erhält man eine signifikante Korrelation bezüglich des Anstieges sowohl der als zerebral als auch der als muskulär bezeichneten Marker in ihrer Konzentration.

Diese Korrelation zwischen den Konzentrationsverläufen ist auf der folgenden Seite in Tabellenform wiedergegeben (Tab. 5).

1.Marker	2. Marker	r²	p
S-100 B	CK	0,69	< 0,01
S-100 B	Myoglobin	0,77	< 0,01
S-100 B	NSE	0,69	< 0,01
S-100 B	CK-MB	0,80	< 0,01
CK	CK-MB	0,76	< 0,01
CK	NSE	0,77	< 0,01
CK-MB	NSE	0,77	< 0,01
NSE	Myoglobin	0,74	< 0,01
CK	Myoglobin	0,85	< 0,01
CK-MB	Myoglobin	0,81	< 0,01

Tab.5: Statistische Korrelationen zwischen den untersuchten Markern vor und am Ende der Operation mittels Spearman Rank

Die Dauer der Operationen oder der extrakorporalen Zirkulation ergaben keinen Zusammenhang mit dem Konzentrationsverlauf der Parameter.

5. Diskussion

Zur Beurteilung des neurologischen Outcomes nach Herzoperationen werden unter anderem zerebrale Strukturproteine herangezogen. Zu dieser Gruppe gehören das S-100 Protein, die NSE und das GFAP.

Der erste quantitative Nachweis von S-100 gelang Moore 1966 mit der Komplementfixationsmethode (Moore et Perez, 1966). Im Jahre 1982 brachte Kato den ersten Enzymimmunoassay heraus (Kato et al., 1982, Kato et al., 1987), während Sindic mit einem Particle Counting Immunoassay S-100 sogar im Blut bestimmte (Sindic et al., 1982), nachdem er mit Masson 1981 einen ersten Particel Counting Immunoassay zur Bestimmung im Liquor entwickelt hatte (Masson et al., 1981).

Fünf Jahre später publizierte Persson den Nachweis von S-100 in Liquor und Blut durch einen Radioimmunassay (Persson et al., 1987).

1989 wiederholte Hardemark S-100 und NSE Messungen im Liquor. Er bestimmte die Proteine im Sandwichverfahren, welches mittels zweier monoklonaler Antikörper gegen das S-100 B arbeitete (Hardemark et al., 1989a). Im gleichen Jahr veröffentlichte Aurell die Arbeit über einen kompetitiven Enzymimmunoassay (Aurell et al., 1989).

1995 entwickelte Missler einen immunometrischen Assay, der auf zeitverzögerter Immunfluoreszenz beruhte (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescent Immuno Assay, DELFIA[®]) (Missler et al., 1995).

Ein Jahr später brachte die Firma Sangtec den ersten kommerziellen radioimmunometrischen Assay (Immuno Radiometric Assay, IRMA[®]) auf den Markt. Auch hier bediente man sich zweier monoklonaler Antikörper gegen S-100 β . Ein dritter radioaktiv markierter Antikörper wurde später zugesetzt. Inzwischen wurde dieser Assay auf Chemilumineszenz umgestellt.

Die beiden Assays der Firma Sangtec sind seitdem in den meisten Arbeiten zur Messung von S-100 in Liquor und Blut eingesetzt worden.

1999 verglich das Team um Ettinger den kommerziellen LIA-MAT Sangtec 100[®] mit einem neuen optischen Immunoassay mit nahezu identischen Ergebnissen (Ettinger et al., 1999). Missler stellte den Sangtec 100 LIA[®] dem S-100 IFMA gegenüber, hierbei zeigten sich ähnliche Ergebnisse der unteren Nachweisgrenze, des Messbereiches, des Präzisionsprofils und des Referenzbereichs (Missler et al., 2000).

Die S-100 Proteine liegen meist diffus im Zytoplasma verteilt vor, ein kleiner Teil allerdings ist im Gehirn an Membranen gebunden (Fano et al., 1995). Im Gehirn befindet sich im Vergleich zu anderen Organen eine bis zu 10.000 fach erhöhte Menge (Moore, 1965).

Beide Monomere wurden nachgewiesen in: Gehirn, Aorta, Fettgewebe, Kolon, Harnblase, Pankreas, quergestreifter Muskulatur, Hoden und Haut. S-100A1 fand sich zudem in: Niere, Dünndarm, Herz, Milz und Uterus; S-100B in Nerven und Knorpel (Isobe et al., 1984, Kato et al., 1985, Haimoto et al., 1987, Engelkamp et al., 1992, Guo et al., 1995, Ingebrigsten et al., 1995, Zimmer et al., 1995, Oehr et al., 1999, Auge et al., 2005).

Das Vorkommen von S-100B wurde intensiv in nervalem und malignem Gewebe untersucht, es fand sich hier in Gliazellen, Schwannzellen, Gliomen, Melanomen, Schwannomen und hochdifferenzierten Neuroblastomen (Ingebrigsten et al., 1995, Missler und Wiesmann, 1995, Zimmer et al., 1995, Zhang et al., 2005), während S-100A1 seine höchste Konzentration in Kardiomyozyten und nachfolgend in Nierengewebe hat (Kato und Kimura, 1985, Kato et al., 1986, Usui et al., 1990, Engelkamp et al., 1992, Ingebrigsten et al., 1995, Zimmer et al., 1995).

Usui hatte in den späten 80er und frühen 90er Jahren festgestellt, dass S-100 a₀ aus dem Herzmuskel freigesetzt wird und daher eher auf die Schädigung des kardialen Gewebes zurückzuführen sei (Usui et al., 1989). Es war ihm möglich, mittels des Anstieges zwischen einem Herzinfarkt und einer Angina pectoris zu differenzieren, da bei letzterem Ereignis keine Erhöhung erfolgte (Usui et al., 1990). Aufgrund des Anstieges im Liquor vier Stunden nach der Operation und des Peakes nach weiteren acht Stunden ging man von einer positiven Korrelation mit einem neurologischen Ereignis aus (Usui et al., 1994).

Es konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass auf eine Herzoperation ein Anstieg des S-100B Proteins erfolgte (Johnsson et al., 1995, Johnsson, 1996, Westaby et al., 1996, Wimmer-Greinecke et al., 1998, Takayuki et al., 2003). Manche Autoren fanden einen Zusammenhang mit der Operationsmethode, -dauer oder Narkose (Johnsson, 1996, Grocott et al., 1998, Farsak et al., 2003, Wang et al., 2005), während andere dies nicht bestätigen konnten, den Anstieg des S-100 Proteins jedoch durchaus als prädikativ für das neurologische Outcome werteten (Taggart et al., 1997, Ashraf et al., 1998, Gazzolo et al., 1998, Lindberg et al., 1998, Ashraf et al., 1999, Gao et al., 1999, Hermann et al., 1999, Kilminster et al., 1999, Arrosmith et al., 2000, Hermann et al., 2000).

Eine weitere Vielzahl an Studien beschäftigte sich mit dem Anstieg des S-100 Proteins während und nach einer Herzoperation in Korrelation mit einem unerwünschten neurologischen Ereignis (Astudillo et al., 1996, Johnsson, 1996, Westaby et al., 1996, Blomquist et al., 1997, Kumar et al., 1997, Grocott et al., 1998, Rosen et al., 1998, Wimmer-Greinecker et al., 1998, Gao et al., 1999, Jönsson et al., 1999, Kilminster et al., 1999). In anderen Untersuchungen wurde vorausgesetzt, dass der S-100 Protein-Nachweis im Blut ein zuverlässiger Marker für ein neurologisches Ereignis sei. Ashraf verwandte es als Beurteilungskriterium beim Vergleich zweier Herzoperationsverfahren für das neurologische Outcome (Ashraf et al., 1998). Ein Anstieg wurde als Zeichen einer Entzündungsreaktion gewertet, wonach S-100B zusammen mit anderen Zytokinen eine potentielle astrogliale Schädigung anzeigen (Ashraf et al., 1999). Andere Autoren nutzen S-100B-Messungen, um verschiedene Operationsverfahren oder Anästhesiemethoden in Bezug auf die neurologische Verträglichkeit zu testen (Herrmann et al., 1999, Georgiadis et al., 2000, Wang et al., 2005).

Auf dieser Grundlage bauten weitere Arbeiten auf, welche mittels der S-100-Protein-Bestimmung verschiedene Operationsverfahren und Narkosen gegenüberstellten (Aleksic et al., 2007). Eine Erhöhung wies bei dieser Erwägung auf das neurologisch ungeeignete Verfahren hin (Ashraf et al., 1999, Ettinger et al., 1999, Hachimi-Idrissi et al., 2005, Kobayashi et al., 2005).

Allerdings zeigten alle Studien genau wie unsere Untersuchungen einen Peak innerhalb des ersten Tages auf, meist direkt postoperativ, und in vielen Publikationen wurden die Patienten nicht über zwei Tage hinaus beobachtet (Astudillo et al., 1996, Kumar et al., 1997, Ashraf et al., 1999, Takayuki et al., 2003, Stolz et al., 2004, Hachimi-Idrissi et al., 2005).

Rosen fand nach dreitägiger Beobachtung erhöhte Spiegel bei später Verstorbenen (Rosen et al., 1998), Kilminster verfolgte den S-100-Protein-Verlauf über fünf Tage und postulierte erst für den späten Anstieg eine positive Korrelation (Kilminster et al., 1999). In einer Studie, welche eine Nachbeobachtungszeit von 30 Tagen hatte, zeigte Hermann, dass die Wertung der Prädiktion erst nach drei Tagen erfolgen sollte (Hermann et al., 2000a).

Seit 2000 wurden vermehrt Untersuchungen publiziert, welche sich gegen einen Zusammenhang zwischen einer frühen S-100-Protein-Ausschüttung und einem damit anzunehmenden neurologischen Defizit aussprachen (Jensen et al., 2000, Westaby et al.,

2000, Godet et al., 2001, Svensson et al., 2001, Rasmussen et al., 2002, Tiainen et al., 2003, Snyder-Ramos et al., 2004).

Jönsson bewertete die eigenen Aussagen kritisch. Obwohl er in dem S-100B Protein einen potenten Marker sah, stellte er fest, dass erst nach mehreren Stunden eine sichere Zuordnung zur neurologischen Situation des Patienten gemacht werden kann. Außerdem ist der frühe Anstieg gegebenenfalls verfälscht, da im Laufe einer Herzoperation häufig eine Autotransfusion vorgenommen wird, durch die eine additive Erhöhung des S-100 B-Spiegels entsteht (Jönsson et al., 1999). Ebenso beobachtete er eine deutliche Erhöhung bei Patienten mit Nierenversagen, da S-100 Proteine über die Niere ausgeschieden werden. Hammon postulierte, dass die Messung nur Relevanz hat, wenn gleichzeitig die Clearance miteinbezogen wird (Hammon et al., 2000). Seiner Auffassung nach, reflektiert ein früher und leichter S-100B-Anstieg pathologische Mechanismen in der weißen Substanz, zum Beispiel ein Hirnödem postoperativ, welcher keine anhaltenden neurologischen Schäden anzeigt.

Aus anderen Publikationen geht hervor, dass man anhand eines frühes Erscheinen von S-100 Protein im Blut keine Aussage über die neurologische Prognose treffen kann (Pfeifer et al., 2005). Westaby, der 1996 noch davon ausging, dass S-100B durch eine Permeabilitätsstörung der Bluthirnschranke auf zerebrale Ereignisse hindeuten könnte, konnte 2000 keine positive Korrelation zwischen einem frühen S-100 β Anstieg und einer entsprechenden pathologischen Neurologie feststellen (Westaby et al., 1996, Westaby et al., 2000). Weitere Studien unterstützen diesen Ansatz, es wurde eine transiente Erhöhung des S-100 gefunden, ohne daß eine permanente Schädigung des Hirngewebes daran fest zu machen war (Jensen et al., 2000, Missler et al., 2000 und 2002, Godet et al., 2001, Svensson et al., 2001, Mussack et al., 2006b, Ramlawi et al., 2006).

Auffällig ist, dass in den meisten der genannten Studien der S-100 Konzentrationsanstieg der Patienten nur über eine kurze Periode postoperativ beobachtet wurde. Patienten mit später auftretenden neurologischen Ausfällen fielen jedoch erst durch einen zweiten späteren Anstieg nach ca. 10 bis 48 h oder noch später postoperativ auf (Fassbender et al., 1997, Jönsson et al., 1998, Wunderlich et al., 1999, Elting et al., 2000, Foerch et al., 2004, Mussack et al., 2006b, Prohl et al., 2007).

Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, führten wir die Messungen der Proben von den Lübecker Patienten sowohl mit dem 100 LIA[®] von Sangtec, welcher in

den meisten zitierten Publikationen angewandt wurde, als auch mit dem DELFIA® - Assay durch.

Es stellte sich heraus, dass beide Verfahren hochspezifisch für die beta-Kette des S-100 Proteins sind. Dies ermittelten wir durch Messungen mit hoch gereinigtem S-100B und S-100A1, welches freundlicherweise von Herrn Dr. Ehlersmann aus der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Remppis aus der Medizinischen Klinik II der Universität zu Lübeck zur Verfügung gestellt wurde. Beide Assays zeigten keine Kreuzreaktion mit dem S-100A1-Monomer und keine signifikante Kreuzreaktion mit dem entsprechenden Dimer aus S-100A1-A1. Dagegen reagierten beide zu 100 Prozent mit dem S-100A1-B-Dimer, der 100 LIA® von Sangtec sogar um den Faktor zehn höher, bezogen auf den eigenen Standard, als unser DELFIA® (siehe 4.1.11). Das A1-B-Dimer wird also von beiden Verfahren in erheblichem Ausmaße miterfasst.

Die Messwerte beider Messmethoden stimmten sehr gut überein. Dieses zeigt sich in der deutlichen Korrelation dieser beiden Verfahren mit r^2 von 0,943. Daraus schließen wir, dass beide Assays gut geeignet sind, S-100B-Verläufe zu beurteilen.

Jedoch treten in vivo nicht die Monomere auf. Man nimmt an, dass diese in vivo gar nicht existieren können. Die biologisch aktiven Formen sind demnach die Dimere (Heizmann et al., 1998). Allerdings findet sich auch extrazerebral das S-100A1-B-Dimer, zum Beispiel bei malignen Melanomen (Tronnier et al., 1995), welches von beiden Assays miterfasst wird.

In unserer Studie fiel zunächst auf, wie ähnlich die Verläufe des S-100B sowohl bei der Heidelberger als auch bei der Lübecker Patientengruppe waren, obwohl in der Heidelberger Gruppe drei Patienten postoperativ einen Schlaganfall erlitten. Auch bei diesen stiegen die S-100-Werte initial schnell an und sanken wieder ab (siehe Abbildung 9a und 9b). Die Mittelwerte lagen weit über den bisher ermittelten Werten für eine ischämische Läsion (1,0µg/l und 1,59 µg/l gegen 0,59 µg/l nach Missler et al., 1997), fanden sich so aber in der bisherigen Literatur wieder (Jönsson et al., 1998). Zudem traten die Höchstwerte direkt nach Operation auf, wohingegen über eine Zeitspanne von 2,5 +/- 1,3 Tagen zwischen dem S-100-Protein-Peak und dem ischämischen Insult berichtet wird (Cunningham et al., 1996, Buttner et al., 1997, Fassbender et al., 1997, Missler et al., 1997b). Im Lübecker Patientenkollektiv traten direkt postoperativ erhöhte S-100 Werte auf, während in dieser Gruppe keine Ausfälle zu beobachten waren. Auch in der Vergleichsgruppe der Heidelberger Patienten erfolgte direkt nach der Operation ein Anstieg der S-100-Konzentration. Obwohl im Heidelberger Patientengut drei

Schlaganfälle klinisch-neurologisch zu beobachten waren, zeigten sich hier keine Abweichungen vom S-100B Konzentrationsverlauf.

Um einen Vergleich mit anderen Markern durchführen zu können, entwickelten wir einen ähnlichen Assay für die Messung des NSE, einem neuronenspezifischen Protein, welches jedoch auch extrazerebral auftaucht (Schmechel et al., 1978), im Serum. Das Verfahren erbrachte eine hohe Übereinstimmung mit den Messergebnissen (bei 96 Messungen ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r^2 = 0,98$), welche über das kommerzielle Verfahren mittels des Cobas Core[®] NSE Assays erzielt wurden, so dass ein direkter Vergleich möglich war (4.2).

Für die GFAP-Bestimmung im Blut gab es keine etablierte Methode. Unser Assay misst bis zu 0,01 µg/l und zeigte sich bezüglich Wiederfindung, Linearität und Varianz stabil (siehe 4.3). Das GFAP als rein zentralneuronaler Marker stellt einen guten Vergleichswert zu den rein peripheren, extraneuralen Proteinen wie der CK, CK-MB und dem Myoglobin, und den sowohl zentralnervös und periphernervös vorkommenden S-100-Protein und NSE da (Korzhevskii et al., 2005, Hermann et al., 200b, Voss et al., 2004).

Den gleichförmigen Verlauf von NSE und S-100B konnten wir anhand der Daten aus dem Lübecker Kollektiv gut nachvollziehen. Beide Proteine verzeichneten einen raschen Anstieg mit einem Maximum am Ende der Operation und fielen in den nächsten 24 Stunden wieder langsam ab. Eine positive Korrelation mit einem neurologischen Befund konnte jedoch nicht ausgemacht werden.

Dagegen zeigte das rein zentralnervöse GFAP in unserer Studie keinen Anstieg, es blieb während der Messzeit unter der unteren Nachweisgrenze ($\leq 0,01$ µg/l).

Um zu ermitteln, ob das gemessene S-100B zerebralen oder extrazerebralen Ursprungs ist, untersuchten wir das Verhalten von ausschließlich extrazerebralen Proteinen, der CK, der CK-MB und des Myoglobins (siehe Abbildung 10).

Besonders die gesamt CK-Konzentration verhielt sich wie die des S-100B. Alle drei Parameter zeigten genau wie die NSE eine statistisch signifikant positive Korrelation mit dem S-100B-Protein-Anstieg (siehe Tabelle 5).

Postoperativ verhielten sich die Proteine dagegen unterschiedlich, möglicherweise durch die unterschiedlichen Eliminationshalbwertszeiten begründet. Während das Myoglobin mit 20 Minuten die schnellste Eliminationskinetik aufweist, liegt die des S-100 Proteins bei 2,2 h (Blomquist et al., 1997), die der CK-MB bei 12,5 h und die der CK bei 15,5 h.

Auffallend sind die deutlichen Abweichungen der Standardabweichung 24 Stunden postoperativ. Hier liegen die höchsten Schwankungen, die durch den variablen postoperativen Verlauf erklärbar wären (z.B. Nierenfunktionsstörungen und damit veränderte Eliminationskinetik, Entzündungen, erneute Eingriffe, Komplikationen oder bestehende Vorerkrankungen).

Der gleichförmige Verlauf der Gewebemarkere mit den Proteinen S-100 und NSE, sowie das Nichtansprechen des rein zentralnervösen Markers GFAP, und die Tatsache, dass S-100 Protein und NSE außerhalb des zentralen Nervensystems gefunden werden, führen zu dem Schluss, dass das von uns gemessene S-100 Protein nicht zerebralen Ursprungs sein kann. Der zeitliche Anstieg ist auffallend identisch mit dem in vielen Untersuchungen, die daraus auf eine zerebrale Ischämie schlossen (Astudillo et al., 1996, Westaby et al., 1996, Gao et al., 1999, Kilminster et al., 1999). Das Miterfassen der A1-B-Dimere kann diesen Verlauf ebenso erklären wie das Ansteigen der Konzentrationen der in der Literatur berichteten Werte.

Anhand unserer Ergebnisse wird deutlich, dass die Messung der S-100B-Verläufe nach kardiochirurgischen Eingriffen- mit den derzeit zur Verfügung stehenden Meßmethoden- die bildgebende Diagnostik nicht ersetzen, sie jedoch gegebenenfalls ergänzen kann.

6. Zusammenfassung

Zur neurologischen Überwachung und Beurteilung nach einer Herzoperation werden momentan neben der klinisch-neurologischen Untersuchung überwiegend bildgebende Verfahren genutzt.

Da frisch operierte Patienten nur bedingt einem CT, MRT oder einer der anderen Möglichkeiten unterzogen werden können, wurde überlegt, ob die Messung so genannter zerebraler Marker wie das S-100-Protein, die NSE oder das GFAP die Bildgebung in einem gewissen Maße nicht ersetzen oder ergänzen könnten.

Wir entwickelten daher ein Testverfahren zur Messung von S-100-Protein und NSE im Blut, welche wir mit dem üblichen kommerziellen Assay vergleichen konnten. Außerdem testeten wir den Verlauf von GFAP mittels eines ähnlichen Verfahrens. Wir konnten beweisen, dass S-100B zwar initial ansteigt, aber auch schnell wieder abfällt. Eine Korrelation mit einem ischämischen Ereignis ließ sich nicht festmachen. Das ebenfalls zentral und peripher vorkommende NSE zeigte einen fast identischen Verlauf. Das rein zentralnervös-spezifische GFAP dagegen blieb stets unter der unteren Nachweisgrenze. Aus der parallelen Messung von muskulären, bzw. streng extrazerebralen Parametern, der CK, dem CK-MB und Myoglobin, welche einen signifikant ähnlichen Konzentrationsverlauf erfuhren, schließen wir, dass das initial gemessene S-100B nicht aus dem Gehirn sondern aus peripherem Gewebe stammte.

Beide von uns untersuchte Assays, DELFIA[®] und der Sangtec 100 LIA[®], sind hochspezifisch für S-100 β Monomere; die biologisch aktive Form scheinen aber die Dimere zu sein. Daher wurden neben dem S-100B Protein (β - β Dimer) die S-100 A1-B (α - β) Dimere, deren Ursprung nicht hirnspezifisch ist, jeweils miterfasst.

Die immunologische Erfassung von Dimeren gestaltet sich schwer und ist für die S-100 Proteine nicht bekannt. Es müsste ein Antikörper gefunden werden, der spezifisch für die β - β -Bindungsstelle des S-100B-Dimers ist, um hirnspezifisches S-100B messen zu können.

S-100 kann daher nicht als prädiktiver Parameter für neurologische Komplikationen nach kardiologischen Operationen herangezogen werden.

7. Literaturverzeichnis

Anderson RE, Hansson L-O, Nilsson O: High serum S-100B levels for trauma patients without head injuries. *Neurosurgery* 2001; 48(6):1255-60

Anand N, Stead LG: Neuron-specific Enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20(5):231-9

Ando S, Suzuki M, Yamamoto N, Iida T, Kimura H: The prognostic value of both neuron-specific enolase (NSE) and Cyfra 21-1 in small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2004; 24(3b):1941-6

Aleksi M, Heckenkamp J, Reichert V, Gawenda M, Brunkwall J: S-100B release during carotid endarterectomy under local anesthesia. *Ann Surg* 2007; S0890-5096

Allison KH, Patel RM, Goldblum JR, Rubin BP: Superficial malignant peripheral nerve sheath tumor: a rare and challenging diagnosis. *Am J Clin Pathol.* 2005; 124(5):685-92

Arrowsmith JE, Grocott HP, Reves JG, Newman MF: Central nervous system complications of cardiac surgery. *Brit J Anaesth.* 2000; 84: 378-93

Ashraf S, Bhattacharya K, Tian Y, Watterson KG: Cytokine and S100B levels in paediatric patients undergoing corrective cardiac surgery with or without total circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999; 16:32-37

Ashraf S, Bhattacharya K, Zacharias S, Kaul P, Kay PH, Watterson KG: Serum S100 β release after coronary artery bypass grafting: roller versus centrifugal pump. *Ann Thorac Surg* 1998; 66:1958-1962

Astudillo R, van der Linden J, Radegran K, Hansson L-O, Aberg B: Elevated serum levels of S-100 after deep hypothermic arrest correlate with duration of circulatory arrest. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1996; 10:1107-1113

Auge JM, Molina R, Filella X, Bosch E, Gonzalez Coa M, Puig S, Malveyh J, Castel T, Ballesta AM: S-100beta and MIA in advanced melanoma in relation to prognostic factors. *Anticancer Res.* 2005; 25(3A):1179-82

Aurell A, Rosengren LE, Karlsson B, Ollson J-E, Zbornikova V, Haglid KG: Determination of S-100 and GFAP concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction. *Stroke* 1991; 22:1254-1258

Aurell A, Rosengren LE, Nordberg G, Haglid KG: The S-100 protein in cerebrospinal fluid: a simple ELISA method. *J Neurol Scie* 1989; 89:157-164

Bandyopadhyay S, Hennes H, Gorelick MH, Wells RG, Walsh-Kelly CM: Serum neuron-specific Enolase as a predictor of short-term outcome in children with closed traumatic brain injury. *Acad Emerg Med* 2005; 12(8):732-8

Barone FC, Clark RK, Price WJ, et al.: Neuron-specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia. *Brain Res* 1993; 623:77-82

Baudier J, Glasser N, Gerard D: Ions binding to S100 protein. *J Biol Chem* 1986; 261, 18:8192-8203

Baudier J, Mandel P, Gerard D: Bovine brain S100 proteins: separation and characterization of a new S100 protein species. *J Neurochem* 1983;40:145-152

Bianchi R, Giambanco I, Donato R: S-100 protein, but not Calmodulin, binds to the GFAP and inhibits its polymerization in a Ca²⁺-dependent manner. *J Biol Chem* 1993; 268, 17:12669-12674

Blomquist S, Johnsson P, Lühns C, Malmkvist G, Solem J-O, Alling C, Stahl E: The appearance of S-100 protein in serum during and immediately after cardiopulmonary bypass surgery: a possible maker for cerebral injury. *J Cardiothorac Vasc Anaesth* 1997; 11(4):699-703

Bonacchi M, Prifti E, Maiani M, Bartolozzi F, Di Eusanio M, Leacche M: Does off-pump coronary revascularization reduce the release of cerebral markers, S-100 β and NSE? *Heart Lung Circ* 2006; 15(5):314-9

Burrows FA, Hillier SC, McLeod ME, Iron KS, Taylor MJ: Anterior frontal pressure and visual evoked potentials in neonates and infants undergoing profound hypothermic circulatory arrest. *Anesthesiology* 1990; 73 (4):632-6

Buttner T, Weyers S, Postert T, Sprengelmeyer R, Kuhn W: S-100 protein: serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. *Stroke* 1997; 28: 1961-5

Cunningham RT, Watt M, Winder J, McKinstry S, Lawson JT, Johnston CF, Hawkins SA, Buchanan CD: Serum neuron-specific Enolase as an indicator of stroke volume. *Eu J Clin Invest* 1996; 26:298-303

Cunningham RT, Young IS, Winder J, et al.: Serum neuron specific enolase (NSE) levels as an indicator of neuronal damage in patients with cerebral infarction. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:497-500

Deloulme JC, Sensenbrenner M, Baudier J: Interactions of S100 proteins with kinase substrates. Biological implication. *Adv Exp med Biol* 1990; 269:153-7

Domingo-Domenech J, Molina R, Castel T, Montagut C, Puig S, Conill C, Marti R, Vera M, Auge JM, Malvehy J, Grau JJ, Gascon P, Mellado B: Serum protein s-100 predicts clinical outcome in patients with melanoma treated with adjuvant interferon—comparison with tyrosinase rt-PCR. *Oncology* 2005; 68(4-6):341-9

Donato R: Perspectives in S-100 protein biology. *Cell Calcium* 1991; 12:713-726

Donato R: Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1450:191-231

Dunn R, Landry C, O'Hanlon D, Dunn J, Allore R, Brown I, Marks A: Reduction in S-100 protein beta subunit mRNA in C6 rat glioma cells following treatment with anti-microtubular drugs. *J Biol Chem* 1987; 15:262(8):35623-6

Ehlers S, Kyllerman M, Rosengren L: Glial fibrillary acidic protein in the cerebrospinal fluid of children investigated for encephalopathy. *Neuropediatrics* 1994; 25:134-139

Elting JW, de Jager AE, Teelken AW, Schaaf MJ, Maurits NM, van der Naalt J, Sibinga CT, Sulter GA, De Keyser J: Comparison of serum S-100 protein levels following stroke and traumatic brain injury. *J Neurol Sci* 2000; 181(1-2):104-10

Eng LF, DeVries GH, Lee YL, Bigbee JW, Fukayama G: Recent studies of the glial fibrillary acidic (GFA) protein. Sixth international meeting of the international society for neurochemistry, Copenhagen, 1977

Engelkamp D, Schaefer BW, Erne P, Heizmann CW: S100 alpha, CAPL and CACY: molecular cloning and expression analysis of three calcium-binding proteins from human heart. *Biochem* 1992; 31(42):10258-64

Engelkamp D, Schaefer BW, Mattai MG, Erne P, Heizmann CW: Six S100 genes are clustered on human chromosome 1q21. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:6547-6551

Ettinger A, Laumark AB, Ostroff RM, Brundell JB, Baumgartner WA, Razumovsky AY: A new optical immunoassay for detection of S-100B protein in whole blood. *Ann Thorac Surg* 1999; 68:2196-2201

Guo HB, Stoffel-Wagner B, Bierwirth T, Mezger J, Klingmüller D: Clinical significance of serum S100 in metastatic malignant melanoma. *Eur J Ca* 1995; 31a, 11:1898-1902

Jacobi C, Reiber H: Clinical relevance of increased neuron-specific Enolase concentration on cerebrospinal fluid. *Clin Chem Acta* 1988; 177:49-54

Fangart OC, Sindic JM, Laterre C: Particle counting immunoassay of S100 protein in serum. Possible relevance in tumors and ischemic disorders of the central nervous system. *Clin Chem* 1988; 34(7):1387-1391

Fano G, Biocca S, Fulle S, Mariggio M A, Belia S, Calissano P: The S-100: a protein family in search of a function. *Progress in Neurobiol* 1995; 46:71-82

Fano G, Fulle S, Della Torre G, Giambanco I, Aisa MC, Donato R, Calissano P: S-100b protein regulates the activity of skeletal muscle adenylate cyclase in vitro. *FEBS Letter* 1988; 240 (1, 2):177-180

Farsak B, Gunayid S, Yorgancioglu C, et al.: Elevated levels of S-100 beta correlate with neurocognitive outcome after cardiac surgery. *J Cardiovasc Surg* 2003; 44:31-5

Fassbender K, Schmidt R, Schreiner A, et al.: Leakage of brain-originated proteins in peripheral blood: temporal profile and diagnostic value in early ischemic stroke. *J Neurol Sci* 1997; 148:101-5

Fazeli MS, Errington ML, Dolphin AC, Bliss TV: Extracellular proteases and S-100 protein in long-term potentiation in the dentate gyrus of the anaesthetized rat. *Adv Exp Med Biol* 1990; 268:369-75

Fischer U, Arnold M, Nedeltchev K, Brekenfeld C, Ballinari PB, Remonda L, Schroth G, Mattle HP: NIHSS score and arteriographic findings in acute ischemic stroke. *Stroke* 2005; 36: 2121

Foerch C, Otto B, Singer AC, Neumann-Haefelin T, Yan B, Berkefeld J, Steinmetz H, Sitzer M: Serum S-100B predicts a malignant course of infarction in patients with acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 2004; 35:2160-4

Fries M, Bickenbach J, Beckers S, Hnezler D, Rossaint R, Kuhlen R: Neuromonitoring in der Intensivmedizin mit S-100 Protein. *Anaesthesist* 2004; 53:959-64

Gao F, Harris DNF, Sapsed-Byrne S: Time course of Neurone-Specific Enolase and S-100 protein release during and after coronary artery bypass grafting. *Br J Anaesth* 1999; 82:266-7

Gazzolo D, Vinesi P, Geloso MC, Marcelletti C, Iorio FS, Cipriani A, Marianeschi SM, Michetti F: S100 blood concentrations in children subjected to cardiopulmonary bypass. *Clin Chem* 1998; 44:1058-1060

Georgiadis D, Berger A, Kowatshev E, Lautenschläger C, Börner A, Lindner A, Schulte-Mattler W, Zerkowski HR; Zierz S, Deufel T: Predictive value of S-100 β and Neuron-Specific Enolase serum levels for adverse neurological outcome after cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119:138-147

Godet G, Watremez C, Beaudeau JL, Meersschaert K, Koskas F, Coriat P: S-100beta protein levels do not correlate with stroke in patients undergoing carotid endarterectomy under general anesthesia. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2001; 15(1):25-8

Grocot HP, Croughwell ND, Amory DW, White WD, Kirchner JL, Newman MF: Cerebral emboli and serum S-100beta during cardiac operations. *Ann. Thorac Surg* 1998; 65:1645-9

Hachimi-Idrissi S, Zizi M, Nguyen DN, Schiettecate J, Ebinger G, Michotte Y, Huyghens L: The evolution of serum astroglial S-100 beta protein in patients with cardiac arrest treated with mild hypothermia. *Resuscitation* 2005; 64(2):187-92

Haimoto H, Hosoda S, Kato K: Differential distribution of immunoreactive S-100 α and S-100 β proteins in normal nonnervous human tissues. *Laboratoy Investigations* 1987; 57:489-498

Hammon JW, Stump D: Commentary: Biochemical markers of brain injury after cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119:130-1

Hamon M, Gomes S, Oppenheim S, Morello R, Sabatier R, Lognone T, Grollier G, Courtheoux P, Hamon M: Cerebral microembolism during cardiac catheterization and risk

of acute brain injury. A prospective diffusion-weighted MRI study. *Stroke* 2006; online published June 22nd (before print)

Hardemark HG, Almquist O, Johansson T, Pahlman S, Persson L: S-100 protein in cerebrospinal fluid after aneurysmal subarachnoid haemorrhage: Relation to functional outcome, late CT and SPECT changes, and signs of higher cortical dysfunction. *Acta Neurochir Wien* 1989a; 99:135-144

Hardemark HG, Ericsson N, Kotwica Z, Rundström G, Mendel-Hartvig I, Olsson Y, Pahlmann S, Persson L: S-100 protein and neuron-specific enolase in CSF after experimental traumatic or focal ischemic brain damage. *J Neurosurg* 1989b; 71:727-731

Hauschild A, Engel G, Brenner W, Gläser R, Mönig H, Henze E, Christophers E: Predictive value of serum S100B for monitoring patients with metastatic melanoma during chemotherapy and/ or immunotherapy. *Brit J Derm* 1999; 140:1065-1071

Heizmann CW, Cox JA: New perspectives on S100 proteins: a multifunctional Ca^{2+} -, Zn^{2+} - and Cu^{2+} -binding protein family. *BioMetals* 1998; 11:383-394

Heizmann CW, Hunziker H: Intracellular calcium binding proteins: more sights than insights. *TIBS* 1991; 16:98-103

Henz G, Dummer R, Joller-Jemelka HI, Böni R, Burg G: Serum S100: A marker for disease monitoring in metastatic melanoma. *Dermatology* 1997; 194:208-212

Herde K, Bergmann M, Lang C, Leiser R, Wenisch S: Glial fibrillary acidic protein and myelin basic protein as markers for the immunochemical detection of bovine central nervous tissue in heat-treated meat products. *J Food Prot* 2005; 68(4):823-7

Herrmann M, Curio N, Jost S, Grubich C, Ebert AD, Fork ML, Synowitz H: Release of biochemical markers of the damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 70(1):95-100

Herrmann M, Ebert AD, Galaszky I, Wunderlich MT, Kunz WS, Huth C:
Neurobehavioural outcome prediction after cardiac surgery. *Stroke* 2000a; 31:645-650

Herrmann M, Ebert AD, Tober D, Hann J, Huth C: A contrastive analysis of release patterns of biochemical markers of brain damage after coronary artery bypass grafting and valve replacement and their association with neurobehavioural outcome after cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999; 16:513-518

Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, de Brijn CH, Lamers KJ: Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and GFAP. *Stroke* 2000b; 31(11):2670-7

Hilt DG, Kligmann D: The S-100 protein family: a biochemical and functional overview. In Heizmann CW: *Novel calcium-binding proteins*. 1. Aufl., 65-103, Springer-Verlag, Berlin, 1991

Hoane MR, Wolyniak JG, Akstulewicz SL: Administration of riboflavin improves behavioral outcome and reduces edema formation and glial fibrillary acidic protein expression after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2005; 22(10):1112-22

Infante JR, Martinez A, Ochoa J, Canadillas F, Torres-Avisbal M, Vallejo JA, Gonzalez FM, Pacheco C, Latre JM: Cerebrospinal fluid S-100 protein levels in neurological pathologies. *J Physiol Biochem* 2003; 59(4):255-61

Ingebrigtsen T, Romner B: Serial S-100 protein serum measurements related to early magnetic resonance imaging after minor head injury. *J Neurosurg* 1996; 85:945-948

Ingebrigtsen T, Romner B, Kongstad P, Langbakk B: Increased serum concentrations of protein S-100 after minor head injury: a biochemical serum marker with prognostic value? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 59:103-104

Ingebrigtsen T, Romner B, Trumpy JH: Management of minor head injury: the value of early computer tomography and serum protein S-100 measurements. *J Clin Neurosci* 1997;4(1):29-33

Isobe T, Takahashi K, Okuyama T: S100 α_0 ($\alpha\alpha$) Protein is present in neurons of the central and peripheral nervous system. *J Neurochem* 1984; 43:1494-1496

Jensen E, Sandström K, Andreasson S, Nilsson K, Berggren H, Larsson LE: Increased levels of S-100 protein after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass and general surgery in children. *Paed Anaesth* 2000; 10:297-302

Jönsson H, Johnsson P, Alling C, Bäckström M, Bergh C, Blomquist S: S100 β after coronary artery bypass surgery: Release pattern, source of contamination, and relation to neuropsychological outcome. *Ann Thorac Surg* 1999; 68:2202-8

Jönsson H, Johnsson P, Alling C, Westaby S, Blomquist S: Significance of serum S100 release after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1998; 65:1639-1644

Johnsson P: Markers of cerebral ischemia after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1996; 10(1):120-126

Johnsson P, Lundquist C, Lindgren A, Ferencz I, Alling C, Stahl E: Cerebral complications after cardiac surgery assessed by S-100 and NSE levels in blood. *J Cardiothor Vasc Anesth* 1995; 9(6):694-699

Karnak D, Beder S, Kayacan O, Ibis E, Oflaz G: Neuron-specific enolase and lung cancer. *AM J Clin Oncol* 2005; 28(6): 586-90

Kato K, Haimoto H, Shimizu A, Tanaka J: Enzyme immunoassay for measurement of the α subunit of S100 protein in human biological fluids. *Biomed Res* 1987; 8(2):119-125

Kato K, Kimura S: S100 α_0 ($\alpha\alpha$) protein is mainly located in the heart and striated muscles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1985; 842:146-150

Kato K, Kimura S, Haimoto H, Suzuki F: S100 α_0 ($\alpha\alpha$) protein: Distribution in muscle tissue of various animals and purification from human pectoral muscle. *J Neurochem* 1986; 46:1555-1560

Kato K, Nakajima T, Ishiguro Y, Matsutani T: Sensitive enzyme immunoassay for S-100 protein: Determination in human cerebrospinal fluid. *Biomedical Research* 1982; 3(1):24-28

Kato K, Suzuki F, Kurobe N, Okajima K, Ogasawara N, Nagaya M, Yamanaka T: Enhancement of S-100 β protein in blood of patients with Down-Syndrome. *J Mol Neurosci* 1990; 2:109-113

Keskes Z, Dunster KR, Colditz PB: NSE and S100 after hypoxia in the newborn pig. *Pediatr Res* 2005; 58(5):953-7

Kilby PM, van Eldik LJ, Roberts GCK: Nuclear magnetic resonance assignments and secondary structure of bovine S100 β protein. *FEBS Letters* 1995; 363:90-96

Kilby PM, van Eldik LJ, Roberts GCK: The solution structure of bovine S100 β protein dimer in the calcium-free state. *Structure* 1996; 4:1041-1052

Kilmister S, Treasure T, McMillan T, Holt DW: Neuropsychological change and S-100 protein release in 130 unselected patients undergoing cardiac surgery. *Stroke* 1999; 30:1869-1874

Kligmann D, Hilt DC: The S-100 protein family. *Trends Biochem Sci* 1988; 13(11):437-43

Kobayashi J, Tashiro T, Ochi M, Yaku H, Watanabe G, Satoh T, Tagusari O, Nakajima H, Kitamura S: Early outcome of a randomized comparison of off-pump and on-pump multiple arterial coronary revascularization. *Circulation* 2005; 112(9):1338-43

Korzhevskii DE, Otellin VA, Grigor'ev IP: Glial fibrillary acidic protein in astrocytes in the human neocortex. *Neurosci Behav Physiol* 2005; 35(8):789-92

Kumar P, Dhital K, Hossein-Nia M, Patel S, Treasure T: S100 protein release in a range of cardiothoracic surgical procedures. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 113:953-4

Lamers KJB, van Engelen BGM, Gabreels FJM, Borm GF, Wevers RA: Cerebrospinal neuron-specific enolase, S-100 and myelin basic protein in neurological disorders. *Acta Neurol Scand* 1995; 92:247-251

Li N, Shen JK, Zhao WG, Cai Y, Li YF, Zhan SK: S-100B and neuron specific Enolase in outcome prediction of severe head injury. *Chin J Traumatol* 2004; 7(3):156-8

Lindberg L, Olsson A-K, Anderson K, Jögi P: Serum S-100 protein levels after pediatric cardiac operations: a possible new marker for postperfusion cerebral injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 116:281-5

Ling SH, Tang YL, Jiang F, Wiste A, Guo SS, Weng YZ, Yang TS: Plasma S-100B protein in Chinese patients with schizophrenia: comparison with healthy controls and effects of antipsychotics treatment. *J Psychiatr Res* 2007; 41(1-2):36-42

Linstedt U, Meyer O, Kropp P, Berkau A, Tapp E, Zenz M: Serum concentration of S-100 protein in assessment of cognitive dysfunction after general anesthesia in different types of surgery. *Acta Anaest Scand* 2002; 46:384-9

Luu P, Tucker DM, Englander R, Lockfeld A, Lutsep H, Oken B: Localizing acute stroke-related EEG changes: assessing the effects of spatial undersampling. *J Clin Neurophysiol* 2001; 18(4): 302-17

Mahanna EP, Blumenthal JA, White WD, Croughwell ND, Clancy CP, Smith LR, Newman MF: Defining neuropsychological dysfunction after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1996; 61:1342-1347

Marangos PJ, Schmechel DE: Neuron specific enolase, a clinical useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Ann Rev Neurosci* 1987; 10:269-95

Marks A, Petsche D, O'Hanlon D, Kwong PC, Stead R, Dunn R, Baumal R, Liao SK: S-100 protein expression in human melanoma cells. *Exp Cell Res* 1990; 187(1):59-64

Martens P, Raabe A, Johnsson P: Serum S-100 and Neuron-Specific Enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ischemia. *Stroke* 1998; 29:2363-2366

Massaro AR, Scivoletto G, Tonali P: Cerebrospinal fluid markers in neurological disorders. *Ital J Neurol Sci* 1990; 11:537-547

Masson PPL, Cambiaso CL, Collet-Cassart D, Magnusson CG, Richards CB, Sindic CJ: Particle counting immunoassay (PACIA). *Methods Enzymol* 1981; 74:106-39

Mecocci P, Parnetti L, Romano G, Scarelli A, Chionne F, Cecchetti R, Polidori MC, Palombo B, Cherubini A, Senin U: Serum anti-GFAP and anti-S100 autoantibodies in brain aging, Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neuroimmun* 1995; 57:165-170

Michetti F, Massaro A, Russo G, Rigon G: The S-100 antigen in cerebrospinal fluid as a possible index of cell injury in the nervous system. *J Neurol Sci* 1980; 44:259-263

Missler U, Orlowski N, Nötzold A, Dibbelt L, Steinmeier E, Wiesmann M: Early elevation of S-100B protein in blood after cardiac surgery is not a predictor of ischemic cerebral injury. *Clin Chim Acta* 2002; 321:29-33

Missler U, Wandinger KP, Wiesmann M, Kaps M, Wessel K: Acute exacerbation of multiple sclerosis increases levels of S-100 protein. *Acta Neurol Scand* 1997a; 95:00-00

Missler U, Wiesmann M: Measurement of S-100 protein in human blood and cerebrospinal fluid: analytical method and preliminary clinical results. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33:743-748

Missler U, Wiesmann M, Ehlermann P, Tronnier M, Nötzold A, Steinmeyer E, Wood WG: Validation and comparison of two solid-phase immunoassays for the quantification of S-100B in human blood. *Clin Chem* 2000, 46:993-6

Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M: S-100 protein and Neuron-Specific Enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke* 1997b; 28:1956-1960

Missler U, Wiesmann M, Wittman G, Magerkurth O, Hagenström H: Measurement of glial fibrillary acidic protein in human blood: analytical method and preliminary clinical results. *Clin Chem* 1999; 45:138-41

Mokuno K, Kato K, Kawai K, Matsuoka Y, Yanagi T, Sobue I: Neuron-Specific Enolase and S-100 protein levels in cerebrospinal fluid of patients with various neurological diseases. *J Neurol Sci* 1983; 60:443-451

Mokuno K, Kiyosawa K, Sugimura K, Yasuda T, Riku S, Murayama T, Yanagi T, Takahashi A, Kato K, : Prognostic value of cerebrospinal fluid neuron-specific enolase and S-100b protein in Guillain-Barre´ syndrome. *Acta Neurol Scand* 1994; 89:27-30

Moore BW: A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1965; 19(4):739-744

Moore BW, Perez VJ: Complement fixation for antigens at a picogram level. *J Immunol* 1966; 96:1000-5

Mussack T, Hauser C, Klauss V, Tato F, Rieger J, Ruppert V, Jochum M, Hoffmann U: Serum S-100B protein levels during and after successful carotid artery stenting or carotid endarterectomy. *J Endovasc Ther* 2006a; 13(1):39-46

Mussack T, Klauss V, Ruppert V, Gippner-Steppert C, Biberthaler P, Schiemann U, Hoffmann U, Jochum M: Rapid measurement of S-100B serum protein levels by Elecsys S100 immunoassay in patients undergoing carotid artery stenting or endarterectomy. *Clin Biochem* 2006b; 39(4):349-56

Naeimi ZS, Weinhofer A, Sarahrudi K, Heinz T, Vecsei V: Predictive value of S-100B protein and neuron specific-enolase as markers of traumatic brain damage in clinical use. *Brain Inj* 2006; 20(5):463-8

Nagamatsu M, Mokuno K, Sugimura K, Kiyosawa K, Aoki S, Takahashi A, Kato K: Cerebrospinal fluid levels of S-100b protein and neuron-specific enolase in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Acta Neurol Scand* 1995; 91:483-487

Noppe M, Crols R, Andries D, Lowenthal A: Determination in human cerebrospinal fluid of glial fibrillary acidic protein, S-100 and myelin base protein as indices of non-specific or specific central nervous tissue pathology. *Clin Chem Acta* 1986; 155:142-150

Nylen K, Ost M, Csajbok LZ, Nilsson I, Blennow K, Nellgard B, Rosengren L: Increased serum-GFAP in patients with severe traumatic brain injury is related to outcome. *J Neurol Sci* 2005; 30:0022-510

Oehr P, Stegemann G, Stehen K, Ruhlmann J: The value of FDG-PET whole body imaging, conventional imaging and serum S-100 determinations in metastatic malignant melanoma. *Clin Lab* 1999; 45:523-528

Oertel M, Schumacher U, McArthur DL, Kastner S, Boker DK: S-100B and NSE: markers of initial impact of subarachnoid haemorrhage and their relation to vasospasm and outcome. *J Clin Neurosci* 2006; 13(8):834-40

Oliver S: Artefacts in EEG recordings in intensive and coronary care units. Spike and Wave, Special Issue, 1973; 9: 23-45

Otto M, Stein H, Szudra A, Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Poser S, Kretschmar HA, Mäder M, Weber T: S-100 protein concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jacob disease. *J Neurol* 1997; 244:566-570

Otto M, Zerr I, Wiltfang J, Weber T, Kretschmar HA, Poser S, Felgenhauer K: Laborchemische Verfahren in der Differentialdiagnose der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. *Dt Ärztebl* 1999; 96(48):A-3097-3102

Persson L, Hardemark H-G, Gustafsson J, Rundström G, Mendel-Hartvig I, Esscher T, Pahlman S: S-100 Protein and Neuron-Specific Enolase in cerebrospinal fluid and serum: Markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke* 1987; 18:911-918

Pfeifer R, Borner A, Krack A, Sigusch H, Surber R, Figulla HR: Outcome after cardiac arrest: predictive values and limitations of the neuroproteins neuron-specific enolase and protein S-100 and the Glasgow Coma Scale. *Resuscitation* 2005; 65(1):49-55

Prohl J, Rother J, Kluge S, de Heer G, Liepert J, Bodenbarg S, Pawlik K, Kreymann G: Prediction of short-term and long-term outcomes after cardiac arrest: a prospective multivariate approach combining biochemical, clinical, electrophysiological and neuropsychological investigations. *Crit Care Med* 2007; 35(5):1230-7

Ramlawi B, Rudolph JL, Mieno S, Khabbaz K, Sodha NR, Boodhwani M, Leckoff SE, Marcantonio ER, Sellke FW: Serological markers of brain injury and cognitive function after cardiopulmonary bypass. *Ann Surg* 2006; 244(4):593-601

Rasmussen LS, Christiansen M, Eliassen K, Sander-Jensen K, Moller JT: Biochemical markers for brain damage after cardiac surgery- time profile and correlation with cognitive dysfunction. *Acta Anesth Scan* 2002; 46:547-51

Reyaz N, Tayyab M, Khan SA, Siddique T: Correlation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) with grading of the neuroglial tumours. *J Coll Physicians Surg Pak* 2005; 15(8):472-5

Rosen H, Rosengren L, Herlitz J, Blomstrand C: Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 1998; 29:473-477

Rosengren L, Lycke J, Anderson O: Glial fibrillary acidic protein in CSF of multiple sclerosis patients: a relation to neurological deficit. *J Neurol Sci* 1995; 133:61-5

Rothermundt M, Arolt V, Wiesmann M, Missler U, Peters M, Rudolf S, Kirchner H: S-100B is increased in melancholic but not in non-melancholic major depression. *J Affect Disord* 2001a; 66(1):89-93

Rothermundt M, Missler U, Arolt V, Peters M, Wiesmann M, Rudolf S, Wandinger KP, Kirchner H: Increased S-100B blood levels in unmedicated und treated schizophrenic patients are correlated with negativ symptomatology. *Mol Psychiatry* 2001b; 6(4):445-9

Royds JA, Davis-Jones GB, Lewtas NA, Timberley WR, Taylor CB: Enolase isoenzymes in the cerebrospinal fluid of patients with diseases of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1983; 46:1031-6

Ruleva NIu, Kuzin VM, Martynov MIu, Kamchatnov PR, Liukova TK, Chuhunov AV, Dugin SF, Gusev EI: Markers of inflammation, autoantibodies to neurospecific antigens and outcome in patients with acute ischemic stroke. *Zh Nevrol Psikhiatr IM S S Korsakova* 2004; (Supp. 12):60-5

Sawauchi S, taya K, Murakami S, Ishi T, Ohtsuka T, kato N, Kaku S, Tanaka T, Morooka S, Yuhki K, Urashima M, Abe T: Serum S-100B protein and neuron-specific Enolase after traumatic brain injury. *No Shinkei Geka* 2005; 33(11):1073-80

Schaarschmidt H, Prange HW, Reiber HO: Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases. *Stroke* 1993; 25:558-65

Schäfer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattai MG, Heizmann CW: Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S-100 genes on human chromosom 1q21. *Genomics* 1995; 25:504-14

Schellinger PD, Jansen O, Fiebach JB, Hacke W, Sartor K: A standarized MRI stroke protocol. *Stroke* 1999; 30: 765-8

Schmechel D, Marangos PJ, Brightman M: Neuron-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* 1978;276:834-6

Schmidt S: S100B: Pathogenetische und pathophysiologische Bedeutung in der Neurologie. *Nervenarzt* 1998;69:639-646

Sekoranja L, Loulidi J, Yilmaz H, Lovblad K, Temperli P, Comelli M, Sztajzel RF: Intravenous versus combined (intravenous and intra-arterial) thrombolysis in acute ischemic stroke. *Stroke* 2006; 37: 1805

Selinfreund RH, Barger SW, Pledger WJ, van Eldik LJ: Neurotrophic protein S100 β stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:3554-3558

Sellman M, Ivert T, Ronquist G, Caesarini K, Persson L, Semb BKH: Central nervous system damage during cardiac surgery assessed by 3 different biochemical markers in cerebrospinal fluid. *Scand J Thor Cardiovasc Surg* 1992; 26: 39-45

Sindic C, Chalon MP, Cambiaso CL, Laterre EC, Masson PL: Assessment of damage to the central nervous system by determination of S-100 protein in the cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1982; 45:1130-1135

Skogseid IM, Nordby HK, Urdal P, Paus E, Lilleas F: Increased creatine kinase BB and neuron specific enolase following head injury indicates brain damage. *Acta Neurochir(Wien)* 1992;115:106-11

Snyder-Ramos SA, Gruhlke T, Bauer H, Luntz AP, Motsch J, Martin E, Vahl CF, Missler U, Wiesmann M, Bottiger BW: Cerebral and extracerebral release of S-100B in cardiac surgical patients. *Anaesthesia* 2004; 59(4):344-9

Stolz E, Gerriets T, Kluge A, Klövekorn WP, Kaps M, Bachmann G: Diffusion-weighted magnetic resonance imaging and neurobiochemical markers after aortic valve replacement. *Stroke* 2004; 35:888-92

Stranjalis G, Korfiatis S, Psachoulia C, Kouyialis A, Sakas DE, Mendelow AD: The prognostic value of serum S-100B protein in spontaneous subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir* 2007; 149 (3):231-8

Strobel K, Skalsky J, Baumann K, Seifert B, Joller-Jemelka H, Dummer R, Steinert HC: Tumor assessment in advanced melanoma: value of FDG-PET/CT in patients with elevated serum S-100B. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; S1619-7070

Svensson LG, Nadolny EM, Penney DL, Jacobson J, Kimmel WA, Entrup MH, D'Agostino RS: Prospective randomized neurocognitive and S-100 study of hypothermic circulatory arrest, retrograde brain perfusion, and antegrade brain perfusion for aortic arch operations. *Ann Thorac Surg.* 2001; 71(6):1905-12

Taggart DP, Mazel JW, Bhattacharya K, Meston N, Standing SJ, Kay JDS, Pillai R, Johnsson P, Westaby S: Comparison of S-100 β levels during CABG and intracardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1997; 63:492-496

Takayuki U, Yoshihima I, Hiroyuki Y, Ryuzo S, Yasuyuki K, Kazuo N: Serial measurement of serum S-100B protein as a marker of cerebral damage after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2003; 75:1892-8

Tiainen M, Roine RO, Pettilä V, Takkunen O: Serum neuron-specific enolase and S-100B protein in cardiac arrest patients treated with hypothermia. *Stroke* 2003; 34: 2881-6

Townsend W, Ingebrigsten T: Head injury outcome prediction: A role for protein S-100B? *Injury* 2006; 37(12):1098-108

Tronnier M, Wolff HH: UV-irradiated melanocytic nevi stimulating melanoma in situ. *Am J dermatopathol* 1995; 17:1-6

Usui A, Kato K, Abe T, Murase M, Tanaka M, Takeuchi E: S-100a₀ protein in blood and urine during openheart surgery. *Clin Chem* 1989; 35(9):1942-1944

Usui A, Kato K, Murase M, Hotto T, Tanaka M, Takeuchi E, Abe T: Neural tissue-related proteins (NSE, Go α , 28-kDa calbindin-D, S100b and CK-BB) in serum and cerebrospinal fluid after cardiac arrest. *J Neurol Sci* 1994; 123:134-139

Usui A, Kato K, Sasa H, Minaguchi K, Abe T, Murase M, Tanaka M, Takeuchi E: S-100a₀ protein in serum during acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1990; 36(4):639-341

Utermark T, Schubert SJ, Hanemann CO: Rearrangement of the intermediate filament GFAP in primary human schwannoma cells. *Neurobiol Dis* 2005; 19(1-2):1-9

Verro P, Tanenbaum LN, Borden NM, Sen S, Eshkar N: CT angiography in acute ischemic stroke. *Stroke* 2002; 33: 276

Vos PE, Lamers KJ, Hendriks JC, van Haaren M, Beems T, Zimmerman C, van Geel W, de Reus H, Biert J, Verbeek MM: Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. *Neurology* 2004; 62:1303-10

Wada H, Shirakawa S, Yamakado T, Ohkubo S, Tanaka T, Yamamoto T, Hidaka H: S-100 antigen and Calmodulin in human leukemic cells. *Leuk res* 1989; 13(1):65-9

Wang KJ, Wu HH, Fang SY, Yang YR, Tseng AC: Serum S-100 beta protein during coronary artery bypass graft surgery with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2005; 80:1371-4

Westaby S, Johnsson P, Parry AJ, Blomquist S, Solem J-O, Alling C, Pillai R, Taggar DP, Grebenik C, Stahl E: Serum S-100 protein: A potential marker for cerebral events during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1996; 61:88-92

Westaby S, Saatvedt K, White S, Katsumata T, van Oeveren W, Bhatnagar NK, Brown S, Halligan PW: Is there a relationship between serum S-100 β protein and neuropsychologic dysfunction after cardiopulmonary bypass? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119:132-7

Wiesmann M, Missler U, Hagenström H, Gottmann D: S-100 protein plasma levels after aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* 1997; 139:1155-1160

Wiesmann M, Wandinger KP, Missler U, Eckhoff D, Rothermundt M, Arolt V, Kirchner H: Elevated plasma levels of S-100b protein in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 1999; 45:1508-1511

Wimmer-Greinecker G, Matheis G, Brieden M, Dietrich M, Oremek G, Westphal K, Winkelmann BR, Moritz A: Neuropsychological changes after cardiopulmonary bypass or coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 46:207-212

Woertgen C, Rothoerl RD, Holzschuh M, Metz C, Brawanski A: Comparison of serial S-100 and NSE serum measurements after severe head injury. *Acta Neurochir (Wien)* 1997; 139:1161-1165

Wolf O, Heider P, Heinz M, Poppert H, Sander D, Greil O, Weiss W, Hanke M, Eckstein HH: Microembolism signals detected by transcarnial doppler sonography during carotid endarterectomy and correlation with serial diffusion weighted imaging. *Stroke* 2004; 35: 373-5

Wong CH, Rooney SJ, Bonser RS: S-100 β release in hypothermic circulatory arrest and coronary artery surgery. *Ann Thorac Surg* 1999; 67:1911-1914

Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T, Goertler M, Jost S, Herrmann M: Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 1999; 30:1190-1195

Yu CH, Chen HH, Liu CM, Jeng YM, Wang JT, Wang YP, Liu BY, Sun A, Chiang CP: HMB-45 may be a more sensitive marker than S-100 or Melan-A for immunohistochemical diagnosis of primary oral and nasal melanomas. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(9):540-5

Zang HY, Yang GH, Chen HJ, Wei B, Ke Q, Guo H, Ye L, Bu H, Yang K, Zhang YH: Clinicopathological, immunohistological, and ultrastructural study of 13 cases of melanotic schwannoma. *Chin Med J* 2005; 118(17):1451-61

Zimmer DB; Cornwall EH, Landar A, Song W. The S-100 protein family: history, function and expression. *Brain Res Bull* 1995; 37(49):417-429

Zimmer DB, van Elding LJ: Identification of a molecular target for the calcium modulated protein S-100 fructose-1,6-bisphosphate Aldolase. *J Biol Chem* 1986; 261:11424-8

Zimmer DB, Dubuisson JG: Identification of an S-100 target protein: Glycogen phosphorylase. *Cell Calcium* 1993; 14:323-32

Zissimiopoulos A, Karpouzis A, Karaitianos I, Baziotis N, Tselios I, Koutis C: Serum levels of S-100b protein after four years follow-up of patients with melanoma. *Hell J Nucl Med* 2006; 9(3):204-7

8. Anhang

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mitglieder der S-100 Familie.....	68
Tabelle 2: Funktionen des S-100 Proteins.....	11
Tabelle 3: Impulsantworten S-100 Standardkurve	28
Tabelle 4: GFAP Linearität	33
Tabelle 5: Korrelationen zwischen den einzelnen Markern vor und am Ende der Operation.....	38

Tabelle 1: Mitglieder der S-100 Familie (nach Schäfer et al., 1995 und Zimmer et al, 1995); Funktionen und Zielorte der S-100 Proteine

Name	Synonym	cDNA	Gen	Protein	Kalzium-Bindung	Mögliche Funktion
S-100A1	S-100 α	+	+	+	+	Regeneration des Zellwachstums, Energiestoffwechsel
S-100A2	S-100L, CaN19	+	+	+	+	Unbekannt
S-100A3	S-100 E		+			Unbekannt
S-100A4	CAPL, p9Ka, 42A, pEL98, mts1, Metastasin, 18A2, Calvasculin	+	+	+	+	Regeneration des Zellwachstums, Zelldifferenzierung, Regeneration der Zellstruktur
S-100A5	S-100 D		+			Unbekannt
S-100A6	CACY, 2A9, PRA, CaBP 5B10, Calcyclin	+	+	+	+	Regeneration des Zellwachstums, intrazelluläre Signaltransduktion
S-100A7	PSOR1, Psoriasis	+	+	+	+	Unbekannt
S-100A8	CAGA, MRP-8, p8, MAC387, 60B 8Ag, MIF, NIF, Calgranulin A, CFAG, CP-10, L1Ag	+	+			Antwort auf Chemotaktine, Regeneration des Zellwachstums und Kinaseaktivitäten, Zelldifferenzierung

S-100A9	CAGB, CFAg, MRP- 14, p14, MAC387, 60B8Ag, MIF, NIF, L1Ag		+	+		Antwort auf Chemotaktine, Regeneration des Zellwachstums und Kinaseaktivitäten
S-100A10	Ca(1), p11,p10, 42C, Calpactin light-chain, CLP11		+	+	-	Regeneration des Zellwachstums, Neurotransmitter- freisetzung, anti- inflammatorisch
S-100B	NEF, S-100β	+	+	+	+	Regeneration des Zellwachstums und Kinaseaktivitäten, Energiestoffwechsel, Kontraktion, Gedächtnis und Lernen, intrazelluläre Signal- transduktion, Zelldifferenzierung
S-100C	S100C, Calgizzarin	+		+	+	Unbekannt
S-100P	S-100P	+		+	+	Unbekannt
CALB 3	ICaBP, Calbindin- D9k	+	+	+	+	Ca ²⁺ -Puffer, Regeneration der Ca ²⁺ - Homöostase
S-100F-P	Profilaggrin	+	+	+	+	Regeneration der Zellstruktur
S-100F-T	Trichohyalin	+	+	+	+	Regeneration der Zellstruktur

Tabelle 1: Mitglieder der S-100 Familie (nach Schäfer et al., 1995 und Zimmer et al, 1995); Funktionen und Zielorte der S-100 Proteine

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: S-100 Struktur.....	7
Abbildung 2: S-100 Untereinheiten.....	8
Abbildung 3: Genlokalisierung des S-100 Proteins.....	9
Abbildung 4: Pipettierschema S-100 TRIFMA.....	22
Abbildung 5: S-100B Standardkurve.....	27
Abbildung 6: Verdünnungskurve S-100.....	30
Abbildung 7: NSE Standardkurve.....	31
Abbildung 8: GFAP Standardkurve.....	32
Abbildung 9a: S-100B Verlauf Lübecker Patienten.....	35
Abbildung 9b: S-100 Verlauf Heidelberger Patienten.....	36
Abbildung 10: Verlaufsvergleiche Proteine.....	37

9. Danksagung

Ich möchte mich besonders bei meinem Doktorvater Herr PD Dr. U. Missler für die Bereitstellung des Themas, der Geräte und seine große Unterstützung und Geduld bedanken. Ebenso dankbar bin ich meinem Betreuer Herrn PD Dr. M. Wiesmann für seine Ratschläge.

Für die Daten der CK-, CK-MB- und Myoglobin-Messungen bedanke ich mich bei Herrn Dr. L. Dippel aus dem Institut für Klinische Chemie des UKL.

Mein Dank gilt auch den medizinisch-technischen Assistentinnen des Klinischen Labor 1 für die aufmunternde Unterstützung, besonders wenn ein Arbeitsschritt nicht meinen Vorstellungen entsprach.

Herrn Dr. A. Nötzold, Herzchirurgische Klinik MUL, danke ich für die Proben der Lübecker Patienten. Herrn Prof. Dr. B. Böttiger, Anästhesie der Universitätsklinik Mannheim, für die Proben der Heidelberger Patienten.

Ich danke Herrn PD Dr. T. Hirsch für seine Korrekturen.

Danke auch an meine Familie, die mich immer wieder ermuntert hat, trotz allem weiter zu machen.

10. Lebenslauf

Name: Nicola Orłowski

Geburtsdatum: 28.07.1975

Geburtsort: Lübeck

Schulbildung: 1995 Abitur an der Dahlmannschule Bad Segeberg
1996 Phoenix Language Academy, Perth; FCE

Studium: 1996-2003 Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
Juni 2003 3. Staatsexamen

Famulaturen: 1998 Segeberger Kliniken: Innere Medizin
1999/2000 Allgemeinärztliche Praxis; Wahlstedt
Chirurgische Praxis, Bad Segeberg
Missionshospital, Asikuma, Ghana, WA

Experimenteller Teil der Doktorarbeit: Ende 1999- Ende 2001

Praktisches Jahr: 2002/2003 Chirurgie: Universität Lübeck;
General Hospital, Eastbourne, GB
Pädiatrie: Leighton Hospital, Crewe, GB
Kinderrheumatologie, Bad Bramstedt
Innere Medizin: Klinikum Borstel

Berufliche Tätigkeit: 1.7.2003-30.4.2006 ÄiP und Assistenzärztin in
der Kinderklinik der Sanaklinik Bergen auf Rügen
(akadem. Lehrkrankenhaus der Universität
Greifswald), Chefarzt: PD Dr. med. Hirsch
seit 1.5.2006 Assistenzärztin in der Pädiatrie im Klinikum
Böblingen (Klinikverbund Südwest) (akadem.
Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen)
Chefarzt: Prof. Dr. med. Teufel

