

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Analyse zellulärer Immunreaktionen nach Gabe von  
Aprotinin bei Patienten mit Herzoperationen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
**Norbert Waluga**  
aus Ratiborhammer/ Polen

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Klein

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Scheule

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.0. Aprotinin	1
1.0.1. Historie	1
1.0.2. Struktur, physikochemische Eigenschaften und biologische Aktivität	1
1.0.3. Klinische Anwendung	3
1.0.4. Modulation systemischer Entzündungsreaktionen	4
1.1 Unerwünschte Arzneimittelwirkung-UAW	4
1.1.1. Definition	4
1.1.2. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Aprotinin	5
1.2. Immunologie	7
1.2.1. Die adaptive Immunantwort	7
1.2.2. primäre Immunantwort	7
1.2.3. Differenzierung zur Typ1-/Typ2-T-Helferzelle	8
1.2.4. Eigenschaften aktivierter, zytotoxischer CD8+-T-Lymphozyten	9
1.2.5. Makrophagenaktivierung durch CD4+-Typ1-T-Helferzellen	9
1.2.6. humorale Immunantwort	10
1.2.7. Das immunologische Gedächtnis	11
1.2.8. Zytokine	12
1.3. Hypersensitivität und Allergie	14
1.3.1. Definition	14
1.3.2. Klassifikation	14
1.4. Ziel und Fragestellung der Arbeit	16
<b>2. Patientengruppen, Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1. Patientengruppen	18
2.2. Material, Reagenzien, Medien und Geräte	22
2.2.1. Chemikalien und Reagenzien	22
2.2.2. Puffer	23
2.2.3. Monoklonale anti-human Zytokin Antikörper	23
2.2.4. Biotinylierte anti-human Zytokin Antikörper	24
(monoklonal/polyklonal)	
2.2.5. rekombinante Zytokin-Standards	24
2.2.6. Molekularbiologische Substanzen	25
2.2.7. Zytokinprimersequenzen	25
2.3. Methoden	26
2.3.1. Lymphozytenisolierung aus dem peripheren Blut	26
2.3.2. Zellkulturen für die Bestimmung der Proliferation	26
2.3.3. Zellkulturen für die Zytokinbestimmung mittels ELISA und PCR	27
2.3.4. Antigen- und Mitogenkonzentrationen in den Zellkulturen	27
2.3.5. Zytokin Bestimmung mittels ELISA-Verfahren	28
2.3.6. Definition der Zytokinprofile	30
2.3.7 Analyse der Zytokinexpression mittels PCR	30
2.3.7.1. RNA-Isolierung	30
2.3.7.2. cDNA-Synthese	30
2.3.7.3. Polymerase-Kettenreaktion ( PCR)	31
2.3.7.4. Gelelektrophorese	31
2.4. Statistische Auswertung	32

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1. Ergebnisse in Aprotinin-stimulierten Lymphozytenkulturen	33
3.1.1. Proliferation im Lymphozytentransformationstest (LTT)	33
3.1.2. Zytokinproduktion in den Zellkulturen vor Behandlung	35
3.1.3. Verhalten der Zytokine im Verlauf der Behandlung	36
3.1.3.1. Gruppe A: systemische Aprotinin- und lokale Fibrinkleberapplikation	36
3.1.3.2. Gruppe B: systemische Aprotininapplikation	38
3.1.3.3. Gruppe C: lokale Fibrinkleberapplikation	39
3.1.3.4. Zytokinproduktion im Gruppenvergleich	42
3.1.3.4.1 IL-6	42
3.1.3.4.2 $\gamma$ -IFN	42
3.1.3.4.3 IL-5	42
3.1.3.4.4 IL-10	43
3.1.3.5. Stimulation durch PWM	43
3.2. Zytokinbestimmung in den Seren	48
3.3. Beispiele für Zytokinausschüttung in Aprotininstimulierten Lymphozytenkulturen (ausgewählte Patienten)	51
3.3.1. IL10 im Behandlungsverlauf im ELISA und PCR	51
3.3.2. präoperativ nachweisbare Unterschiede in der Zytokinausschüttung	52
3.3.3. postoperativ nachweisbare Unterschiede zwischen ELISA und PCR	54
3.4. Klinische Manifestation bei den untersuchten Patienten	57
3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse	57
3.5.1. Lymphozytenproliferation nach Aprotininstimulation im LTT	57
3.5.2. Zytokinmessung in Aprotinin-stimulierten Zellkulturen im ELISA	58
3.5.3. Zytokinbestimmung in Patientenserum mittels ELISA	59
<b>4. Diskussion</b>	<b>60</b>
4.1. testspezifische Besonderheiten der eingesetzten Methoden	60
4.1.1. Lymphozytentransformationstest	60
4.1.2. Methoden zur Bestimmung von Zytokinen	61
4.2. Bedeutung unterschiedlicher Applikationsformen	62
4.3. Modulation der Effektormechanismen systemischer Entzündungsreaktionen	63
4.4. Aktivierung des Immunsystems	64
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>66</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>L1</b>

## **Abstract**

Aprotinin wird sowohl in systemischer Applikationsform als auch lokal als Bestandteil von Fibrinklebern zur perioperativen Blutungsverringering angewendet. Als Fremddantigen kann es das Immunsystem sensibilisieren und bei Reexposition anaphylaktische Nebenwirkungen verursachen. Die vorliegende Arbeit sollte die zelluläre Immunreaktion bei Patienten untersuchen, die Aprotinin erst- und einmalig in systemischer, lokaler oder kombinierter Applikationsform erhielten.

Es wurde die Proliferation der aus peripherem Patientenblut gewonnenen Lymphozyten mit dem Antigen Aprotinin im Lymphozytenproliferationstest (LTT) bestimmt, und zwar vor Exposition sowie eine, vier und zwölf Wochen nach Exposition. Desweiteren wurden die Zytokine IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL10, IL-12,  $\gamma$ -IFN und GM-CSF in den Überständen der Lymphozytenkulturen und in den Patientenseren mittels ELISA sowie die Expression der Zytokin mRNA in den Lymphozyten mittels PCR bestimmt.

Die Lymphozytenproliferation zeigte unabhängig vom Applikationsmodus in allen drei Gruppen beginnend 4 Wochen nach Exposition eine Sensibilisierung des Immunsystems. Die Zytokinspiegel in Überständen in Aprotininstimulierten Lymphozyten nach ein- und erstmaliger Gabe veränderten sich in den drei Gruppen im Verlauf nicht signifikant, IL-6 und IL-10 wurden allerdings auffällig häufig produziert. Eine eindeutige Zuordnung der Immunantwort zu Typ1- bzw. Typ2-Reaktion ließ sich nicht nachweisen. In Einzelfällen scheint Aprotinin aber Typ2-Reaktionen (IL-5) zu stimulieren. Die Zytokine in den Patientenseren zeigten keine wesentlichen Veränderungen.

Diese Daten zeigen, daß Aprotinin immunkompetente Zellen und insbesondere T<sub>H1</sub>/Typ1- bzw. T<sub>H2</sub>/Typ2-Reaktionen in der Gesamtheit nicht signifikant beeinflusst, aber in Einzelfällen eine T<sub>H2</sub>-Antwort induzieren kann. Dazu würde passen, daß zwar gelegentlich Nebenwirkungsreaktionen in Form von anaphylaktischen Reaktionen auftreten, diese jedoch im Hinblick auf die häufige Applikation von Aprotinin doch sehr selten sind.

Dennoch sollte, wie bereits von anderen Autoren gefordert, eine eventuelle frühere Aprotiningabe sorgfältig evaluiert werden. Eine mögliche Reexposition sollte nur unter strenger Indikationsstellung und unter Anaphylaxieprophylaxe erfolgen.



# 1. EINLEITUNG

## 1.0. Aprotinin

### 1.0.1. **Historie**

Aprotinin ist ein Proteaseinhibitor, der in den 30er Jahren als Kallikrein-Inaktivator [42] und Trypsin-Inaktivator [43] entdeckt wurde. Es wurde in vielen Rinderorganen, wie z.B. Lunge, Parotis, Milz, Leber gefunden [38]. Aprotinin kommt als intrazellulärer Bestandteil von Mastzellen in mastzellreichen Organen in besonders hohen Konzentrationen vor [26]. Für die Verwendung in der Medizin wird Aprotinin aus Rinderlungen isoliert [38], neuerdings steht auch rekombinantes Aprotinin zur Verfügung [6].

### 1.0.2. **Struktur, physikochemische Eigenschaften und biologische Aktivität**

Aprotinin besteht aus 58 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 6512 Dalton (Abbildung 1-1) [4,39]. Der aktive Enzymabschnitt stellt das immunogene Epitop dar [15,51].

Die Aktivität von Aprotinin wird in Kallikrein-Inhibitor-Einheiten (KIE) ausgedrückt. 14 mg Aprotinin entsprechen 100000 KIE [27].

Die Halbwertszeit liegt durchschnittlich bei 150 min. Die Elimination erfolgt überwiegend über die Niere [27].

Aprotinin gehört zur Gruppe der Serpine, die eine Reihe von Serinproteasen, wie z.B. Trypsin, Kallikrein, Plasmin, Chymotrypsin aber auch Elastase, Thrombin und Protein C, hemmen. Durch Bildung eines Proteasen-Aprotinin-Komplexes zwischen dem Serin im aktiven Zentrum des Enzyms und dem Lysin in Position 15 (Abbildung 1-2) des Aprotinin werden die Proteasen inaktiviert. Die unterschiedliche Fähigkeit, die Enzyme zu hemmen, spiegelt sich auch in der Dissoziationskonstanter  $K_i$ . Dabei ist die Affinität von Aprotinin zu Protease um so größer, je kleiner  $K_i$  ist [27].

Einleitung

ABBILDUNG 1-1: PRIMÄRSTRUKTUR DES POLYPEPTIDS APROTININ MIT EINER 58-AMINOSÄUREN-EINZELKETTE MIT DREI DISULFIDBRÜCKEN UND EINEM MG VON 6512 DALTON [4,39]

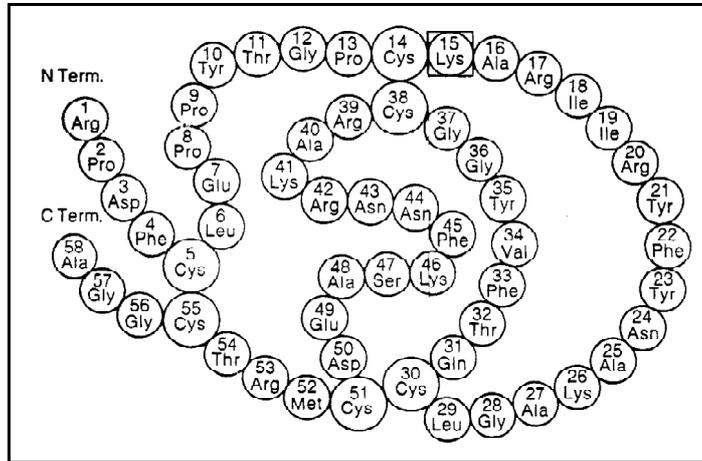
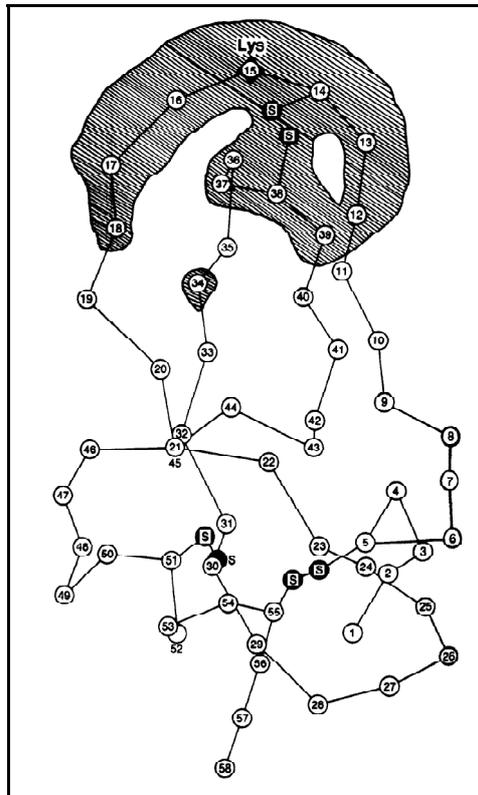


ABBILDUNG 1-2: TERTIÄRSTRUKTUR DES APROTININ, MIT EINER LÄNGE VON 29Å UND EINEM DURCHMESSER VON 19Å; SCHRAFFIERTER BEREICH STELT DAS ENZYMATISCH AKTIVE ZENTRUM DAR, S KENNZEICHNET DISULFIDBRÜCKEN [27]



### **1.0.3. Klinische Anwendung**

Aprotinin ist seit 1963 im klinischen Einsatz [12]. Heute ist Aprotinin als Antifibrinolytikum bei hyperfibrinolytischen Hämostasestörungen, insbesondere bei einer generalisierten Hyperfibrinolyse indiziert. Weitere Indikationen sind traumatisch-hämorrhagische Schockformen mit hyperfibrinolytischen Prozessen oder bei Blutungskomplikationen als Folge einer thrombolytischen Therapie [31]. Harte Indikationen sind Operationen mit zu erwartendem hohem Blutverlust (Herzchirurgie, Hüftchirurgie, Organtransplantationen) und seit neuestem auch Operationen mit zu erwartender systemischer Entzündungsreaktion (= mit Herz-Lungen-Maschine).

Ein bedeutender Einsatzbereich ist seit Ende der 70er Jahre die Herzchirurgie. Bei Eingriffen mit extrakorporaler Zirkulation lassen sich die intraoperativen Blutverluste, wahrscheinlich durch seine Antiplasminwirkung bedingt, um bis zu 50% reduzieren. Der Bedarf für Bluttransfusionen ist ebenfalls verringert [49,68].

Aprotinin wurde systemisch bei vielen anderen Erkrankungen verwendet, wobei nicht immer ein positiver Effekt nachgewiesen werden konnte:

Bei der Lebertransplantation wird durch das Aprotinin sowohl der Gewebeplasminogen-Aktivator als auch das Plasmin reduziert, wodurch Endothelschäden am Transplantat vermindert werden [50]. Die Mortalität bei septischem Schock konnte durch Aprotinin nicht gesenkt werden [62]. Der Einsatz beim akuten Lungenversagen (ARDS) hat keine Vorteile gebracht [89].

Auch bei der Behandlung der akuten Pankreatitis hat Aprotinin keinen direkten Nutzen gebracht [35,88].

Desweiteren ist Aprotinin ein Bestandteil von Zwei-Komponenten-Fibrinklebern. Es dient als Stabilisator des Fibrinklebergerinnsels. Fibrinkleber werden sowohl in operativen als auch in den nicht-operativen Disziplinen zur Blutstillung und Gewebeklebung eingesetzt [3,34,91].

#### **1.0.4. Modulation systemischer Entzündungsreaktionen**

Ein positiver Effekt von Aprotinin, der in der Herz-Thorax-Chirurgie zunehmend an Bedeutung gewinnt, scheint die Interaktion bzw. Modulation der pro- und antiinflammatorischen Reaktionen, die bei kardiopulmonalen Bypassoperationen entstehen [45].

In mehreren Studien konnte zum einen gezeigt werden, daß hochdosiertes Aprotinin bei Operation unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine viele Komponenten der systemischen Entzündungsreaktion hemmt [52].

Es inhibiert in vitro die IL-6 und IL-8 Ausschüttung und die Neutrophilenaktivierung [36,80]. Die Konzentration des IL-1 Rezeptor Antagonisten war unter Aprotininverwendung signifikant erhöht [84].

Andere Studien konnten diese signifikanten Unterschiede in der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-8) bzw. der Neutrophilenaktivierung nicht nachweisen [21,93].

### **1.1 Unerwünschte Arzneimittelwirkung-UAW**

#### **1.1.1. Definition**

Medikamentennebenwirkungen, auch als unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) bezeichnet, treten bei etwa 5% der mit Arzneimitteln behandelten Patienten auf. In der Klinik entwickeln 1,5% bis 36% aller behandelten Patienten UAWs, in 1,1% bis 8,4% sind sie ursächlich für die Einweisung in ein Krankenhaus [64,73].

Die WHO versteht unter UAW eine schädliche und unbeabsichtigte Reaktion, die bei Dosen auftritt, die üblicherweise beim Menschen für Prophylaxe, Diagnose und Therapie von Krankheiten angewendet wird. Überdosierungen (akzidentell oder in suizidaler Absicht) gehören im strengen Sinne nicht dazu [85,95].

UAWs lassen sich in zwei Gruppen klassifizieren. Typ-A-Reaktionen entstehen durch die pharmakodynamischen oder -kinetischen Effekte eines Arzneimittels, und sind somit in vielen Fällen vorhersehbar und auch vermeidbar. So wird z.B. die

Bradykardieneigung bei gleichzeitiger Gabe eines Betarezeptorenblockers und Verapamil durch ihre pharmakodynamische Interaktion verstärkt. Auch die gastrointestinale Blutung bei Einnahme nichtsteroidaler Antirheumatika gehört als UAW in diese Gruppe [46,85].

Typ-B-Reaktionen sind in der Regel unvorhersehbare, dosisunabhängige, unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen. Dazu gehören Idiosynkrasien, immunologisch vermittelte Überempfindlichkeitsreaktionen und pseudoallergische Reaktionen. Diese werden bei 10 bis 50% aller UAWs beobachtet [85].

Idiosynkrastische Reaktionen beruhen auf einem genetisch bedingtem Defekt im Stoffwechsel der Arzneimittel oder an den entsprechenden Rezeptoren. Ein Defekt der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase z.B. kann bei Gabe bestimmter Malariamittel, wie z.B. Primaquin oder Cloroquin eine hämolytische Anämie verursachen [57,59].

Von einer allergischen Reaktion darf dann gesprochen werden, wenn entweder Antikörper gegen medikamentöse Antigene oder spezifisch gegen das Medikament sensibilisierte Lymphozyten im Blut nachgewiesen werden können. Beispiele für diese Reaktionen sind die Penicillinallergie, die mit 1-10% relativ häufig auftritt, die heparininduzierte Thrombozytopenie oder die Kontaktdermatitis auf Metalle und andere topisch verabreichte Stoffe [11,77].

Bei pseudoallergischen Reaktionen werden immunologische Effektormechanismen unter Umgehung der Antigenerkennung aktiviert. Dabei können die verschiedenen Effektorzellen, -mechanismen oder Mediatoren des Immunsystems z.B. Makrophagen, Mastzellen oder Komplementsystem direkt aktiviert werden, so daß die Symptome weitgehend identisch mit denjenigen sind, die im Rahmen der allergischen Reaktion auftreten. Beispielsweise können jodhaltige Kontrastmittel, Opiate, Doxorubicin, Tubocurarin u.a. zu einer direkten Histaminfreisetzung aus Mastzellen führen und somit zum Bild einer anaphylaktischen Immunreaktion führen [11,66].

### **1.1.2. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Aprotinin**

Eine unmittelbare prothrombotische Wirkung von Aprotinin wurde zwar nicht beobachtet, dennoch wird zur Vorsicht geraten bei Patienten mit erhöhtem Risiko für

Thromboembolien. Die Koronar-Reokklusion, die Re-Infarkt- und die Bypass-Durchgängigkeits-Rate ist nach Aprotiningabe während Bypassoperationen nicht signifikant erhöht im Vergleich zu Eingriffen ohne Aprotinineinsatz. Eine nephrotoxische Wirkung war im Tierversuch nicht auszuschließen. Ein reversibler Anstieg des Serumkreatinin aber auch der Transaminasen wurde beobachtet [14,53].

Allergische Reaktionen auf Aprotinin mit den klinischen Bildern einer Hautrötung, Urtikaria, Bronchospasmus, Tachykardie bis hin zur anaphylaktischen Reaktion wurden beobachtet. Die Inzidenzrate für Hypersensitivitätsreaktionen bei Reexposition liegt bei etwa 2-3%. Das Risiko in den ersten 6 Monaten nach Erstgabe ist um ein Vielfaches höher, als bei späteren Reexpositionen [24,75,76,91].

Eine Aprotinin-spezifische Antikörperantwort, ohne Hypersensitivitätsreaktion, konnte mehrfach nachgewiesen werden. Insbesondere Aprotinin-spezifische IgG sind in einem Nachbeobachtungsintervall bis 12 Monate zwischen 3,6% und 67% zu beobachten. Aprotininspezifische IgE-Antikörper sind lediglich in einer Studie an Kindern in einem sehr kleinen Zeitfenster nachgewiesen worden [24,61,94].

In Vorarbeiten wurde gezeigt, daß die ein- und erstmalige Aprotininapplikation bei Erwachsenen zur Bildung von spezifischen Antikörpern führt. In einem anderen und längeren Nachuntersuchungsintervall war die Prävalenz von Aprotinin-spezifischen AK der Klasse IgG nach 4 Monaten in der kombinierten Gruppe höher, als in den Einzelgruppen. Nach dreizehn Monaten sank die Prävalenz in der kombinierten und lokalen Gruppe, wohingegen sie in der systemischen Gruppe gleichblieb. Die medianen Serum-Konzentrationen sanken im Verlauf in allen Gruppen. Antikörper der Klasse IgE liessen sich in den gewählten Intervallen nicht nachweisen. Die Differenzierung von IgG in die Subgruppen zeigte, daß vor allem IgG<sub>1</sub>, hauptsächlich nach vier Monaten, und IgG<sub>4</sub>, maximal nach dreizehn Monaten, gebildet wurde [70,71,71].

Aprotinin kann bei schneller intravenöser Applikation, aufgrund seiner starken Basizität zur Histaminliberation führen und somit eine pseudoallergische Reaktion hervorrufen [27].

## **1.2. Immunologie**

### **1.2.1. Die adaptive Immunantwort**

Das spezifische Immunsystem bedient sich zweier verschiedener Systeme, um intra- und extrazelluläre Antigene zu erkennen und zu bekämpfen.

Die zwei Haupttypen von T-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, erkennen mit ihren T-Zellrezeptoren Antigenfragmente, die an MHC-Moleküle zweier verschiedener Klassen gebunden sind. MHC-Klasse-I Moleküle werden auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert, MHC-Klasse-II Moleküle sind nur auf den sogenannten antigenpräsentierenden Zellen (APC) vorhanden. Zu den APC gehören dendritische Zellen, Langerhans-Zellen der Haut, B-Lymphozyten, Mikroglia des ZNS und aktivierte Makrophagen [2].

CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten erkennen exogene und endogene Peptide die ihnen von den APC an MHC-Klasse-II gebunden präsentiert werden. Mit der Aktivierung der naiven CD4<sup>+</sup>-Zellen differenzieren sich diese entweder zu Typ1-T-Helferzellen, die die zellvermittelte, oder zu Typ2-T-Helferzellen, die die humorale Immunität unterhalten [8]. Die zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten erkennen an MHC-Klasse I gebundene Peptid-fragmente von zelleigenen oder endogen hergestellten Proteinen und töten diese infizierten Zellen ab.

B-Lymphozyten besitzen an ihrer Oberfläche Immunglobuline als Antigenrezeptoren. Nach ihrer Aktivierung und Proliferation zur Plasmazelle werden die Immunglobuline als Antikörper sezerniert, um die Antigene in den extrazellulären Bereichen durch Neutralisation, Opsonierung oder Komplementaktivierung zu bekämpfen [2,8,9,63].

### **1.2.2. primäre Immunantwort**

Muß ein Individuum sich zum ersten Mal mit einem endogenen oder exogenen Antigen auseinandersetzen, wird dieses zunächst von den professionellen, antigenpräsentierende Zellen (APC) aufgenommen und über afferente Lymphbahnen in die Lymphknoten transportiert. Nach intrazellulärer Prozessierung wird das Peptid an MHC-Klasse I oder

MHC-Klasse II Moleküle gekoppelt und an ihrer Zelloberfläche präsentiert. Zirkulierende naive T-Zellen benötigen für ihre Aktivierung und Proliferation zur bewaffneten Effektorzelle neben der Bindung ihres spezifischen T-Zellrezeptors und des Corezeptors  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  an den entsprechenden Peptid:MHC-Komplex ein weiteres costimulierendes Signal, das auf den antigenstimulierenden Zellen hauptsächlich das B7.1- oder B7.2-Molekül ist. Der entsprechende Rezeptor der naiven T-Zellen ist das T-Zell-Protein CD28. Die auf diese Weise aktivierte T-Zelle synthetisiert sowohl den T-Zell-Wachstumsfaktor Interleukin 2 als auch seinen Rezeptor, und stimuliert über autokrine Mechanismen ihre eigene Differenzierung und Proliferation zur T-Effektorzelle. Eine Veränderung der nun aktivierten T-Effektorzelle gegenüber der naiven T-Zelle besteht darin, daß sie bei jedem weiteren Zusammentreffen mit ihrem spezifischen Antigen keine Costimulierung mehr benötigt. Die wichtigste Effektorfunktion des aktivierten  $CD8^+$ -Lymphozyten besteht im Töten infizierter Zielzellen. Die naive  $CD4^+$ -T-Zelle entwickelt sich nach ihrer Aktivierung zu einer Typ1- oder Typ2-T-Helferzelle, die unterschiedliche Zytokinmuster synthetisieren und sich in ihrer Effektorfunktion unterscheiden [55,74].

### **1.2.3. Differenzierung zur Typ1-/Typ2-T-Helferzelle**

Aktiviert  $CD4^+$ -T-Lymphozyten können aufgrund ihrer Fähigkeit zur Sekretion unterschiedlicher Zytokinmuster in Typ1- oder Typ2-T-Zellen unterteilt werden. Typ1-T-Zellen ( $T_H1$ ) produzieren IL-2, IFN- $\gamma$  und LT (Lymphotoxin, TNF- $\beta$ ), Typ2-T-Zellen ( $T_H2$ ) sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13. Weitere Zytokine, wie IL-3, TNF- $\alpha$  und GM-CSF können von beiden Zelltypen gebildet werden. Werden Zytokine beider Subtypen gleichzeitig beobachtet, spricht man von Typ0-T-Zellen [1,16,54].

T-Zellen von Typ1 induzieren eine Entzündungsreaktion gegen intrazelluläre Erreger, indem sie hauptsächlich Makrophagen aktivieren, aber auch B-Zellen zur Synthese komplementbindender und opsonierender Antikörper (IgG1, IgG3) anregen [1,33,78].

Typ2-T-Zellen steuern die humorale Immunantwort, B-Zellen proliferieren zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. IL-4 und IL-13 führen zum

Immunglobulinklassenwechsel hin zum IgE. IL-5 ist ein potenter Wachstums- und Differenzierungsfaktor für Eosinophile und Basophile [1,33,81].

Die Differenzierung zu einem Subtyp hemmt die Entwicklung des anderen Phänotyps, IL-4 und IL-10 blockieren die Typ1-T-Zellen, IFN- $\gamma$  und IL-12 wiederum die Typ2-T-Zellen [1,54].

Welche Faktoren entscheidend für die Ausbildung zur Typ1- oder Typ2-T-Zelle sind, ist nicht vollständig geklärt. Zytokine aus der frühen nichtadaptiven Phase der Immunantwort, die antigenpräsentierende Zelle, die Art und die Menge von antigenen Peptiden haben Einfluß auf die Differenzierung der CD4<sup>+</sup>-T-Zelle [13,17,23,29,44,54,58,63].

#### **1.2.4. Eigenschaften aktivierter, zytotoxischer CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten**

Erkennt eine aktivierte, zytotoxische T-Zelle auf der Oberfläche ihrer Zielzelle den Peptid:MHC-Klasse-I-Komplex wird diese getötet. Dabei bedient sie sich „vorgefertigter“ Zytotoxine; Granzyme scheinen den programmierten Zelltod auszulösen, Perforine bilden Poren in der Membran der Zielzelle. Über den membranständigen Fas-Liganden wird ebenfalls die Apoptose in der Zielzelle induziert. Außerdem produzieren sie IFN- $\gamma$ , das die virale Replikation hemmt und für die MHC-Klasse-I Expression und Makrophagenaktivierung von Bedeutung ist [79,86,87].

#### **1.2.5. Makrophagenaktivierung durch CD4<sup>+</sup>-Typ1-T-Helferzellen**

Die hauptsächliche Funktion aktivierter CD4<sup>+</sup>-Typ1-T-Helferzellen ist die Aktivierung infizierter Makrophagen. Trifft eine Typ1-T-Zelle, die spezifisch für ein Peptid ist, auf einen infizierten Makrophagen, so wird sie veranlaßt, den makrophagenaktivierenden Faktor IFN- $\gamma$  zu sezernieren und CD40-Liganden zu exprimieren. Diese beiden neu synthetisierten Proteine aktivieren den Makrophagen, intrazelluläre Erreger zu zerstören. Aufgrund der Möglichkeit einer lokalen Gewebeschädigung muß die Aktivität der Makrophagen durch Typ1-T-Helferzellen streng reguliert werden. Chronisch infizierte Makrophagen, die nicht mehr aktiviert werden können, können von

Typ1-T-Zellen über den Fas-Liganden oder TNF- $\beta$  (LT, Lymphotoxin) zerstört werden, die so freigesetzten Erreger werden von neuen Makrophagen aufgenommen und zerstört. Über IL-2 induziert die Typ1-T-Helferzelle die T-Zellproliferation und erhöht so die Zahl der Effektorzellen. IL-3 und GM-CSF stimulieren die Produktion neuer Makrophagen durch ihre Wirkung auf hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Durch TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und andere Chemokine werden neue phagozytierenden Zellen an den Infektionsort gelockt [40,56].

### **1.2.6. humorale Immunantwort**

Die humorale Immunantwort wird durch Antikörpermoleküle vermittelt, die von Plasmazellen sezerniert werden.

Die Proliferation und Differenzierung eines naiven B-Lymphozyten zur antikörpersezernierenden Plasmazelle benötigt die Bindung eines Antigens an die B-Zelle und eine Interaktion mit einer antigenspezifischen, aktivierten CD4<sup>+</sup>-Typ2-T-Helferzelle. Das Antigen wird an das Oberflächenimmunglobulin, das als Antigenrezeptor dient, gebunden, internalisiert, prozessiert und als Peptid:MHC-Klasse-II-Komplex an aktivierte CD4<sup>+</sup>-Typ2-T-Zellen präsentiert. Erkennen diese den spezifischen Antigenpeptid:MHC-Klasse-II-Komplex, exprimieren sie den B-Zell-stimulierenden CD40-Liganden an der Oberfläche und sezernieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-6, die die Proliferation und Differenzierung zur antikörpersezernierenden Plasmazelle steuern. Die T-Helferzelle steuert über die Zytokinsekretion den Wechsel der Antikörper zu unterschiedlichen Isotypen, die in unterschiedlichen Körperbereichen wirken und ihre spezielle Effektorfunktion haben (Tabelle 1-1) [18,30,81].

TABELLE 1-1: EINFLUSS DER ZYTOKINE AUF DIE IG-ISOTYPENREGULATION, FUNKTION UND VERTEILUNG EINZELNER IG-ISOTYPEN BEIM MENSCHEN NACH [37]; KA: KOMPLEMENTAKTIVIERUNG, \*: MITTLERER WERT BEIM ERWACHSENEN, ↑ (SCHRAFFIERT): INDUKTION UND ↓ (GEPUNKTET): HEMMUNG BESTIMMTER ISOTYPEN DURCH EINZELNE ZYTOKINE

	<i>IgG1</i>	<i>IgG2</i>	<i>IgG3</i>	<i>IgG4</i>	<i>IgM</i>	<i>IgA</i> <i>I/2</i>	<i>IgD</i>	<i>IgE</i>
<i>klassischer Weg KA</i>	++	+	+++	-	+++	-	-	-
<i>alternativer Weg KA</i>	-	-	-	-	-	A1:+ A2:-	-	-
<i>Makrophagen-/ Phagozytenbindung</i>	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>Mastzell-/ Basophilenbindung</i>	-	-	-	-	-	-	-	+++
<i>Serumspiegel (in mg/ml)*</i>	9	3	1	0.5	1.5	A1:3 A2:0,5	0.03	5x10 <sup>-5</sup>
<i>Regulation der Ig-Isotypen-Expression durch Zytokine:</i>								
<i>IL-4</i>	↓	↑	↓		↓			↑
<i>IL-5</i>						Synthese steigt		
<i>IFN-γ</i>	↑	↓	↑		↓			↓
<i>TGF-β</i>			↓		↓	↑		

### 1.2.7. Das immunologische Gedächtnis

Das Immunsystem verfügt über die Fähigkeit, schneller und effektiver auf einen Krankheitserreger zu reagieren, dem es bereits zuvor begegnet ist. Man spricht je nach Anzahl der Antigenkontakte von sekundärer Reaktion, tertiärer Reaktion und so weiter. Wie das immunologische Gedächtnis aufrecht erhalten wird, ist nicht vollständig aufgeklärt, es bestehen verschiedene Erklärungsversuche:

- langlebige Lymphozyten verbleiben nach dem ersten Kontakt in einem Ruhestadium bis sie dem Erreger ein zweites Mal begegnen
- aktivierte Lymphozyten werden auch ohne weiteren Antigenkontakt weiterhin stimuliert, entweder durch kleinste Mengen des Erregers, die im Körper weiterhin persistieren, oder durch andere kreuzreagierende Antigene .

B-Gedächtniszellen führen durch ausgeprägte somatische Mutation ihrer Rezeptoren und durch klonale Expansion zu einer stärkeren und effizienteren Reaktion. Im

Unterschied zur Primärreaktion werden hauptsächlich IgG und IgA mit hoher Affinität für das Antigen synthetisiert.

Der T-Zell-Rezeptor der T-Gedächtniszellen unterliegt nicht einer Affinitätsreifung, vielmehr erhöht sich die Anzahl an T-Zellen, die auf dieses Antigen reagieren können, im Vergleich zur anfänglichen Menge deutlich um das zehnfache bis hundertfache. Die T-Gedächtniszellen sind durch Oberflächenproteine charakterisiert [96].

### **1.2.8. Zytokine**

Die Kommunikation der Zellen des Immunsystems untereinander, aber auch mit Zellen anderer Organe z.B. des ZNS, erfolgt über Sekretion von löslichen Mediatoren, den Zytokinen. Zytokine sind Polypeptidhormone mit einem geringen Molekulargewicht, die schon in sehr niedrigen Konzentrationen mit einer sehr hohen Affinität an ihre Rezeptoren binden. Ihre Synthese und Sekretion unterliegt sehr komplexen und strikten Kontrollen. Zytokine wirken auto-, para- oder endokrin, vielfach haben sie pleiotrope Effekte und in Kombination mit anderen Zytokinen können sie synergistische oder antagonistische Effekte entwickeln. Im Unterschied zu Hormonen anderer Organe können Zytokine von vielen verschiedenen Zellen des Immunsystems gebildet werden. Ihre allgemeine Wirkung liegt in der Induktion von Proliferation und Differenzierung der Zielzelle. Sie können die Synthese und Sekretion weiterer Zytokine auslösen, wodurch ein komplexes Netzwerk mit unterschiedlichen Immunreaktionen entstehen kann. Zur Regulation der Immunantwort gehört auch die Beendigung derselben, die ebenfalls über Zytokine gesteuert wird.

Die physiologische Rolle von Zytokinen konnte unter anderem in sogenannten Knock-out-Mäusen geklärt werden. Die wichtigsten Auswirkungen von T-Zellzytokinen sind in Tabelle 1-2 aufgeführt [5,41].

Einleitung

TABELLE 1-2: FUNKTION UND WIRKUNG GUT DEFINIERTER T-ZELL-ZYTOKINE IM HINBLICK AUF VERSCHIEDENE ZELLTYPEN; ( CTL= CYTOTOXISCHE LYMPHOZYTEN, [↑]= ANSTIEG, [↓]= ABFALL, MHC= HAUPTHISTOKOMPATIBILITÄTSKOMPLEX, NK= NATÜRLICHE KILLERZELLE, IL= INTERLEUKIN, IFN= INTERFERON, TNF= TUMORNEKROSEFAKTOR, GM-CSF= GRANULOZYTEN-MAKROPHAGEN-KOLONIESTIMULIERENDER FAKTOR) NACH [37]

Zytokin	Quelle	Wirkung auf	Auswirkung eines Gen-Knockouts
<b>IL-2</b>	Typ0, Typ1, einige CTL	<u>B-Zellen</u> : stimuliert Wachstum und Synthese der J-Kette <u>T-Zellen</u> : Wachstum <u>hämatopoetische Zellen</u> : stimuliert das Wachstum von NK-Zellen	T-Zellantwort ↓
<b>IFN-γ</b>	Typ1, CTL	<u>B-Zellen</u> : Differenzierung, IgG2a-Synthese <u>T-Zellen</u> : tötet <u>Makrophagen</u> : Aktivierung, MHC-Klasse I und -Klasse II ↑ <u>hämatopoetische Zellen</u> : aktiviert NK-Zellen <u>andere somatische Zellen</u> : antiviral, MHC-Klasse I und -Klasse II ↑	anfällig für Mycobakterien
<b>TNF-β (LT)</b>	Typ1, einige CTL	<u>B-Zellen</u> : hemmt <u>T-Zellen</u> : tötet <u>Makrophagen</u> : aktiviert, induziert NO-Synthese <u>hämatopoetische Zellen</u> : aktiviert neutrophile Zellen <u>andere somatische Zellen</u> : tötet Fibroblasten und Tumorzellen	Lymphknoten fehlen, Milz ist desorganisiert
<b>IL-4</b>	Typ2	<u>B-Zellen</u> : Aktivierung, Wachstum, IgG1, IgE, Induktion der MHC- Klasse II ↑ <u>T-Zellen</u> : Wachstum, Überleben <u>Makrophagen</u> : hemmt die Makrophagenaktivierung <u>hämatopoetische Zellen</u> : Wachstum der Mastzellen ↑	keine Typ2
<b>IL-5</b>	Typ2	<u>B-Zellen</u> : Differenzierung, IgA-Synthese <u>hämatopoetische Zellen</u> : Wachstum und Differenzierung von Eosinophilen ↑	
<b>IL-10</b>	Typ2	<u>B-Zellen</u> : MHC-Klasse II ↑ <u>T-Zellen</u> : hemmt Typ2 <u>Makrophagen</u> : hemmt Zytokinfreisetzung <u>hämatopoetische Zellen</u> : costimuliert das Wachstum der Mastzellen	
<b>TNF-α</b>	Typ1, einige Typ2, einige CTL	<u>Makrophagen</u> : aktiviert, induziert NO-Synthese	resistent gegenüber einer gramnegativen Sepsis
<b>GM-CSF</b>	Typ1, einige Typ2, einige CTL	<u>B-Zellen</u> : Differenzierung <u>T-Zellen</u> : hemmt das Wachstum <u>Makrophagen</u> : Aktivierung <u>hämatopoetische Zellen</u> : ↑ Bildung von Granulozyten und Makrophagen (Myelopoese) sowie dendritischen Zellen	
<b>TGF-β</b>	CD4-T-Zellen	<u>B-Zellen</u> : Hemmung des Wachstums, Faktor für den IgA-Wechsel <u>Makrophagen</u> : hemmt die Aktivierung <u>hämatopoetische Zellen</u> : aktiviert neutrophile Zellen <u>andere somatische Zellen</u> : hemmt/ stimuliert Zellwachstum	Tod nach etwa 10 Wochen

## **1.3. Hypersensitivität und Allergie**

### **1.3.1. Definition**

Unter Hypersensitivität oder Überempfindlichkeit versteht man eine pathogene, übersteigerte Reaktionsweise des Immunsystems auf fremde aber sonst harmlose Stoffe, die zu Gewebeschäden und zu ernsthaften Erkrankungen führen kann [47].

Als Antigene bezeichnet man Substanzen, die vom adaptiven Immunsystem erkannt werden, indem sie an die hypervariable Bindungsstelle eines Immunglobulins oder an einen T-Zellrezeptor binden. Ein Antigen, das eine spezifische Immunantwort induzieren kann, wird als Immunogen bezeichnet. Entscheidende Parameter für ein Antigen sind Molekülgröße und -struktur. Moleküle mit einer relativen Molekülgröße von unter 1000 Dalton, zu denen die meisten Medikamente gehören, werden vom Immunsystem erkannt, vermögen aber dieses ohne ein Trägerprotein nicht zu aktivieren, man spricht vom Hapten. Ein Antigen, das bei einem sensibilisierten Individuum eine pathogene, überschießende Immunantwort auslöst, wird Allergen genannt [11].

### **1.3.2. Klassifikation**

Anhand der charakteristischen, klinischen Bilder der Hypersensibilitäts- oder Überempfindlichkeitsreaktionen haben Coombs und Gell diese in vier Typen eingeteilt (siehe auch Tabelle 1-3), wobei man heute weiß, daß es auch Überlappungen innerhalb dieser Typen gibt.

#### **♦ Typ I: anaphylaktische Reaktion**

Die Reaktion vom Soforttyp wird in Gang gesetzt, wenn Antigene IgE-Antikörper vernetzen, die mit ihren Fc-Bereich an den hochaffinen FcεRI-Rezeptor der Mastzellen gebunden sind. Durch diese Quervernetzung wird ein intrazelluläres Signal zur Freisetzung schon präformierter Mediatoren, z.B. Histamin, Heparin oder Trypsin gegeben. Dieser Sofortreaktion, die innerhalb von Sekunden bis Minuten beginnt, folgt nach mehreren Stunden eine Spätreaktion, bei der durch neugebildete Mediatoren

inflammatorische Leukozyten, vor allem eosinophile und neutrophile Granulozyten, angelockt werden.

♦ **Typ II: zytotoxische Reaktion**

Bei diesem Reaktionstyp kommt es nach Bindung eines Allergens an eine Zelle zur Reaktion mit IgG- oder IgM-Antikörpern. Dieser Komplex aktiviert wiederum das Komplementsystem, das die Zielzelle lysiert. Man beobachtet diese seltenen Reaktionstypen bei hämolytischen Anämien, Agranulozytosen oder Thrombozytopenien.

♦ **Typ III: Immunkomplex-Reaktion, Arthus-Reaktion**

Ursache für die Entwicklung dieser Allergieform, ist die Ablagerung von Antigen-Antikörper-Aggregaten oder Immunkomplexen im Gewebe. Im Antigenüberschuß gebildete Komplexe neigen dazu, lange im Körper zu zirkulieren ohne phagozytiert zu werden und sich an den Wänden kleiner Gefäße abzulagern. Durch nachfolgende Aktivierung des Komplementsystems oder gewebsständiger Leukozyten kommt es zu einer lokalen oder systemischen Entzündungsreaktion.

♦ **Typ IV: zellvermittelte Reaktion verzögertem Typ**

Diesem verzögerten Reaktionstyp liegt die Generierung spezifischer, zytotoxischer T-Lymphozyten, ähnlich der Antikörperproduktion bei der Allergie vom Soforttyp, zugrunde. Nach der lokalen Aufnahme und Verarbeitung durch antigenpräsentierende Zellen (APZ), kommt es erst nach Kontakt dieser APZ mit spezifischen Typ1-T-Lymphozyten zur Stimulierung und Proliferation zytotoxischer Lymphozyten. Durch Ausschüttung weiterer proinflammatorischen Mediatoren werden weitere Entzündungszellen rekrutiert und aktiviert [7,11,20,22,60].

TABELLE 1-3: VIER TYPEN VON HYPERSENSIBILITÄTSREAKTIONEN DES IMMUNSYSTEMS [37] NACH COOMBS UND GELL

	<b>Typ I</b> <i>Anapylaktischer Typ</i>	<b>Typ II</b> <i>Zytotoxischer Typ</i>	<b>Typ III</b> <i>Arthus-Reaktion</i>	<b>Typ IV</b> <i>Verzögerter Typ</i>
<b>Immunkomponente</b>	IgE-Antikörper T <sub>H</sub> 2-Zellen	IgG-/IgM- Antikörper	IgG-Antikörper	T-Zellen
<b>Antigen</b>	löslich	zell- / matrix-assoziert	löslich	löslich und zellassoziert
<b>Effektormechanismen</b>	Mastzellaktivierung	Komplementsystem, FcR <sup>+</sup> -Zellen (Phagozyten, NK-Zellen)	Komplementsystem, Phagozyten	Makrophagenaktivierung und Zytotoxizität
<b>Reaktionszeit</b>	Sekunden-Minuten	Stunden-Tage	max. Reaktion nach 6-8 Std.	12-72 Stunden
<b>Beispiele</b>	allergische Rhinitis, Asthma, Anaphylaxie, Urtikaria	allergisch bedingte hämolytische Anämie, Agranulozytose, Thrombozytopenie, Transfusionszwischenfälle	Serumkrankheit, allergische Vaskulitis, exogen-allergische Alveolitis	Kontaktdermatitis, Tuberkulinreaktion,

#### 1.4. Ziel und Fragestellung der Arbeit

Bei Patienten, die während offener Herzoperationen mit Aprotinin behandelt wurden, wurden immer wieder immunologisch induzierte Nebenwirkungen beobachtet [24,75,76]. Um diese besser zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit die zelluläre Immunreaktionen gegenüber Aprotinin in vitro vor Exposition, eine, vier und zwölf Wochen nach Exposition bestimmt und zwar bei Patienten, die Aprotinin lokal, systemisch oder sowohl lokal wie systemisch erhalten haben.

Gemessen wurde die Aprotinin-spezifische Proliferation der Lymphozyten, sowie die Sekretion verschiedener Zytokine durch Lymphozyten nach Aprotinin-Inkubation.

Untersucht werden sollte auch, ob sich zwischen den drei Gruppen Unterschiede hinsichtlich Lymphozytenproliferation und Zytokinsekretion ergeben und sich immunologische Reaktionen im Verlauf der Untersuchung ändern.

Im Rahmen von kardiopulmonalen Operationen werden Aprotinin positive Effekte auf die systemische Entzündungsreaktion diskutiert, einerseits über Hemmung proinflammatorischer Prozesse (IL-6, IL-8 Produktion) andererseits über gesteigerte

## Einleitung

Sekretion von antiinflammatorischer Produkte (IL-10, IL-1 Rezeptorantagonist). Es sollte deshalb in der vorliegenden Arbeit zusätzlich der Einfluß von Aprotinin auf die Ausschüttung inflammatorischer Zytokinein durch Lymphozyten in-vitro beurteilt werden.

## **2. PATIENTENGRUPPEN, MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. Patientengruppen**

Für die Untersuchungen wurde Blut von Patienten verwendet, die während oder nach Operation mit Aprotinin behandelt wurden. Es wurden drei Patientengruppen gebildet, die sich in der Applikationsweise unterschieden. Patienten der Gruppe A wurde Aprotinin sowohl systemisch als auch lokal gegeben. In der Gruppe B wurde Aprotinin systemisch verabreicht und in der Gruppe C lokal in Form des „Fibrinklebers“.

In den Tabellen 2-1, 2-2 und 2-3 sind die wesentlichen Patientendaten der drei verschiedenen Patientengruppen enthalten.

35 Patienten litten an einer koronaren Herzkrankheit, 10 Patienten an einer Erkrankung der Herzklappen, ein Patient wies beide Erkrankungen auf. Bei 2 Patienten ist die Diagnose nicht bekannt.

Der Altersdurchschnitt lag bei 63,8 Jahren mit einem Bereich zwischen 37 und 82 Jahren. An der Studie nahmen überwiegend Männer teil (35m; 13w).

Insgesamt konnte bei 10 Patienten eine Allergianamnese erhoben werden, bei 5 in Gruppe B, bei 3 in Gruppe A und bei 2 in Gruppe C.

Alle Patienten wurden bezüglich der durchzuführenden Experimente ausführlich aufgeklärt und haben ihr Einverständnis zur Blutabnahme und Durchführung der Untersuchungen, die entsprechend der ethischen Richtlinien der Helsinki-Deklaration durchgeführt wurden, abgegeben.

TABELLE 2-1 *KLINISCHE DATEN DER GRUPPE A, IN DER 16 PATIENTEN APROTININ SOWOHL SYSTEMISCH ALS AUCH LOKAL VERABREICHT BEKAMEN.*

Patient	Alter <sup>a</sup>	Geschlecht	Diagnose/ Begleiterkrankung	Allergien	Aprotininmenge (Mio KIE <sup>b</sup> ) systemisch / lokal
K1	70	m	KHK	nein	2 / 3
K2	48	m	?	nein	4 / 10
K3	76	m	KHK	Med.	2 / 3
K4	47	w	KHK/ D.m.	Kon.	2 / 4
K5	68	w	KHK	nein	2 / 4
K6	56	w	KHK/ D.m.	nein	2 / 2
K7	64	m	KHK	Inh.	2 / 2
K8	55	m	KHK	nein	2 / 4
K9	63	m	KHK	nein	2 / 4
K10	57	m	KHK	nein	2 / 2
K11	60	m	Klappe/ Rheuma	nein	2 / 4
K12	66	m	Klappe	nein	2 / 4
K13	67	m	KHK	nein	2 / 2
K14	44	m	KHK	nein	2 / 2
K15	37	m	Klappe	nein	2 / 4
K16	61	m	KHK	nein	2 / 6
Σ K1-K16	58.7	m:w 13:3	KHK: 12/ Klappe: 3 / nicht bekannt: 1	Allergien : 3	systemisch:2,125 lokal: 3,75

a : Alter in Jahren zum Zeitpunkt der Operation

b : Kallikrein-Inhibition-Einheiten in Mio

KHK: Koronare Herzerkrankung, D.m.: Diabetes mellitus, Klappe: Klappenvitium, Rheuma:  
Rheumatische Systemerkrankung, kombiniert: KHK und Klappenvitium, Med.: Medikamente, Inh.:  
Inhalationsstoffe, Leb.: Lebensmittel, Kon.: Konservierungsstoffe

TABELLE 2-2 *KLINISCHE DATEN DER GRUPPE B, IN DER 16 PATIENTEN APROTININ SYSTEMISCH VERABREICHT BEKAMEN.*

Patient	Alter <sup>a</sup>	Geschlecht	Diagnose	Allergien	Aprotininmenge (Mio KIE <sup>b</sup> ) systemisch
AS1	68	m	?/ D.m.	Kon.	2
AS2	78	m	KHK/ D.m.	nein	2
AS3	68	m	KHK	Med.	2
AS4	66	m	KHK	nein	2
AS5	76	m	KHK	nein	2
AS6	65	m	KHK	Kon.	2
AS7	70	m	Klappe	nein	2
AS8	58	w	KHK/ D.m.	nein	2
AS9	61	w	Klappe	nein	2
AS10	63	w	KHK/ Rheuma/ D.m.	Ins.G./ Med/ Kon	2
AS11	66	m	Klappe	nein	2
AS12	65	m	KHK	nein	2
AS13	62	m	KHK	nein	2
AS14	46	m	Klappe/Rheuma	nein	2
AS15	72	w	KHK	Kon/ Med/ Leb	2
AS16	61	m	KHK	nein	2
Σ AS1- AS16	65.3	m:w 12:4	KHK: 11 Klappe: 4 nicht bekannt: 1	Allergien: 5	systemisch: 2

a : Alter in Jahren zum Zeitpunkt der Operation

b : Kallikrein-Inhibition-Einheiten in Mio

KHK: Koronare Herzerkrankung, D.m.: Diabetes mellitus, Klappe: Klappenvitium, Rheuma: Rheumatische Systemerkrankung, kombiniert: KHK und Klappenvitium, Med.: Medikamente, Inh.: Inhalationsstoffe, Leb.: Lebensmittel, Kon.: Konservierungsstoffe, Ins. G.: Insektengifte

TABELLE 2-3 *KLINISCHE DATEN DER GRUPPE C, IN DER 16 PATIENTEN APROTININ ALS FIBRINKLEBER LOKAL VERABREICHT BEKAMEN*

Patient	Alter <sup>a</sup>	Geschlecht	Diagnose	Allergien	Aprotininmenge (Mio KIE <sup>b</sup> ) lokal
FL1	56	m	KHK	nein	4
FL2	62	w	KHK	Med.	2
FL3	73	m	KHK	nein	6
FL4	60	m	KHK/ D.m.	nein	2
FL5	62	m	KHK	nein	2
FL6	82	w	kombiniert/ D.m.	nein	2
FL7	59	m	Klappe/ D.m.	nein	2
FL8	76	m	KHK	nein	2
FL9	64	m	KHK	nein	4
FL10	71	m	Klappe/ Rheuma	nein	4
FL11	74	w	KHK	nein	2
FL12	73	w	Klappe	nein	2
FL13	69	w	KHK	nein	2
FL14	63	m	KHK	nein	2
FL15	65	w	KHK	Inh./ Med./ Leb./ Kon.	2
FL16	68	m	KHK/ Rheuma	nein	4
Σ FL1- FL16	67.3	m:w 10:6	KHK: 12/ Klappe: 3/ kombiniert: 1	Allergien: 2	lokal: 2,75

a : Alter in Jahren zum Zeitpunkt der Operation

b : Kallikrein-Inhibition-Einheiten in Mio

KHK: Koronare Herzerkrankung, D.m.: Diabetes mellitus, Klappe: Klappenvitium, Rheuma: Rheumatische Erkrankung, kombiniert: KHK und Klappenvitium, Med.: Medikamente, Inh.: Inhalationsstoffe, Leb.: Lebensmittel, Kon.: Konservierungsstoffe

## 2.2. Material, Reagenzien, Medien und Geräte

### 2.2.1. Chemikalien und Reagenzien

Firma Merk, Darmstadt:

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid, 30%), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Schwefelsäure, 25%), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (Di-Natriumphosphat-Dihydrat), NaCl (Natriumchlorid), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat), C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> x H<sub>2</sub>O (Citronensäure Monohydrat), C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Tri-Natriumcitrat-Dihydrat), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Di-Natriumcarbonat), NaHCO<sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat), HCl (Salzsäure), NaOH (Natronlauge), C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (Ethanol), EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), Refobacin 40 und 10 (Breitbandantibiotikum, Wirkstoff: Gentamicinsulfat)

Firma Sigma, St.Louis, USA:

C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub> x 2 HCl (1,2-Phenylendiamin), C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH (Isopropanol), Trizma Base (Trishydroxymethylaminomethan), Borsäure, Glycerol, Bromphenolblau, Agarose, Ethidiumbromid, Acridinorange, Mineralöl

weitere Substanzen:

Trasylol (Aprotinin)	Bayer, Leverkusen
Liquemin N 2500 (Heparin-Natrium)	Hoffmann-La Roche, Grenzach
Ficoll-Hypaque-Lösung (Dichte 1,077g/ml)	Seromed, Berlin
Hanks` Salt Solution (HBSS)	Seromed, Berlin
RPMI 1640	Seromed, Berlin
Pokeweed Mitogen (PWM)	Seromed, Berlin
<sup>3</sup> H-Thymidin (spez. Aktivität 74Gbpq/mmol)	Amersham-Buchler, Braunschweig
Ultima Gold LSC-Cocktail	Packard, Groningen, Niederlande
Albumin, Fraktion V	Böhringer, Mannheim
RNA-Clean™-System	AGS, Heidelberg
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
NuSieve GTG Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf

Dem Zellkulturmedium RPMI 1640 wurde vor Gebrauch 50 mg Gentamicin zugegeben.

### 2.2.2. Puffer

Bicarbonatpuffer 0,2 M, pH 9,6	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	33,90 g
	NaHCO <sub>3</sub>	57,12 g
	H <sub>2</sub> O	5000 ml
Citratpuffer 0,1 M, pH 5,0	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	41,18 g
	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> x H <sub>2</sub> O	12,60 g
	H <sub>2</sub> O	2000 ml
PBS 0,3 M, pH 7,4 + 0,5% Albumin	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,81 g
	NaCl	43,83 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	44,49 g
	Albumin	25,00 g
	H <sub>2</sub> O	5000 ml
10x TBE-Puffer, pH 8,0	Trizma Base	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA	9,3 g
	H <sub>2</sub> O	1000 ml
Probenauftragspuffer	10x TBE-Puffer	2 ml
	Glycerol	13 ml
	Ampuwa	5 ml
	Bromphenolblau	

### 2.2.3. Monoklonale anti-human Zytokin Antikörper

Maus anti-human IL-1 $\beta$ moAB	R&D Systems, Minneapolis, USA
Maus anti-human IL-4 moAB	Pharmingen, San Diego, USA
Ratte anti-human IL-5 moAB	Pharmingen, San Diego, USA
Maus anti-human IL-6 moAB	R&D Systems, Minneapolis, USA

Ratte anti-human IL-10 moAB	Pharmlingen, San Diego, USA
Maus anti-human IL-12 moAB	Pharmlingen, San Diego, USA
Ratte anti-human IL-13 moAB	Pharmlingen, San Diego, USA
Maus anti-human IFN- $\gamma$ moAB	Pharmlingen, San Diego, USA
Ratte anti-human GM-CSF moAB	Pharmlingen, San Diego, USA
Maus anti-human TNF- $\alpha$ moAB	Pharmlingen, San Diego, USA
Maus anti-human TNF- $\beta$ moAB	Pharmlingen, San Diego, USA

#### **2.2.4. Biotinylierte anti-human Zytokin Antikörper (monoklonal/ polyklonal)**

Ziege anti-human IL-1 $\beta$ (po)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Ratte anti-human IL-4 (mo)	Pharmlingen, San Diego, USA
Ratte anti-human IL-5 (mo)	Pharmlingen, San Diego, USA
Ziege anti-human IL-6 (po)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Ratte anti-human IL-10 (mo)	Pharmlingen, San Diego, USA
Maus anti-human IL-12 (mo)	Pharmlingen, San Diego, USA
Maus anti-human IL-13 (mo)	Pharmlingen, San Diego, USA
Maus anti-human IFN- $\gamma$ (mo)	Pharmlingen, San Diego, USA
Ratte anti-human GM-CSF (mo)	Pharmlingen, San Diego, USA
Maus anti-human TNF- $\alpha$ (mo)	Pharmlingen, San Diego, USA
Maus anti-human TNF- $\beta$ (mo)	Pharmlingen, San Diego, USA

#### **2.2.5. rekombinante Zytokin-Standards**

IL-1 $\beta$	Genzyme, Cambridge, USA
IL-4	Genzyme, Cambridge, USA
IL-5	Pharmlingen, San Diego, USA
IL-6	Boehringer, Mannheim
IL-10	Pharmlingen, San Diego, USA
IL-12	Pharmlingen, San Diego, USA

IL-13	R&D Systems, Minneapolis, USA
IFN- $\gamma$	Genzyme, Cambridge, USA
GM-CSF	Boehringer, Mannheim
TNF- $\alpha$	Genzyme, Cambridge, USA
TNF- $\beta$	Pharmingen, San Diego, USA

### 2.2.6. Molekularbiologische Substanzen

M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l)	GibcoBRL, Eggenstein
5x First Strand Puffer	GibcoBRL, Eggenstein
0,1 M DTT (Dithiotreitol)	GibcoBRL, Eggenstein
Taq DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	GibcoBRL, Eggenstein
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	GibcoBRL, Eggenstein
10x PCR-Puffer	GibcoBRL, Eggenstein
Rnasin Ribonuclease Inhibitor (28000 U/ml)	Promega, Madison, USA
Desoxynukleotid-Triphosphat (dNTPs, 100 mM)	Promega, Madison, USA
Zytokinprimer	TibMolBiol, Berlin
100 bp DNA Ladder	GibcoBRL, Eggenstein

### 2.2.7. Zytokinprimersequenzen

Zytokinprimer		Primersequenz 5' -> 3'	Fragmentgröße
IL-1 $\beta$	sense	GACACATGGGATAACGAGGC	248
	antisense	ACGCAGGACAGGTACAGATT	
IL-5	sense	GCTTCTGCATTTGAGTTTGCTAGCA	293
	antisense	TGGCCGTCAATGTATTTCTTTATTAAG	
IL-6	sense	ATGTAGCCGCCCCACACACA	186
	antisense	CATCCATCTTTTTTCAGCCAT	
IL-10	sense	AGAACAGCTGCACCCACTTC	237
	antisense	CGCCTTGATGTCTGGGTCTT	
IFN- $\gamma$	sense	AGTTATATCTTGGCTTTTCA	356

	antisense	ACCGAATAATTAGTCAGCTT	
GM-CSF	sense	ACACTGCTGAGATGAATGAAACAGTAG	286
	antisense	TGGACTGGCTCCCAGCAGTCAAAGGGGATG	
TNF- $\alpha$	sense	TCTCGAACCCCGAGTGACAA	124
	antisense	TATCTCTCAGCTCCACACCA	

## 2.3. Methoden

### 2.3.1. **Lymphozytenisolierung aus dem peripheren Blut**

Die Isolierung der Lymphozyten (PBMC) aus dem Vollblut erfolgte mittels eines Ficoll-Dichtegradienten. Es wurden 30-50 ml heparinisiertes Blut (500 IE/ 10 ml) mit Hanks Salzlösung im Verhältnis 4:1 vermischt. Anschließend wurde das verdünnte Blut vorsichtig über 15 ml Ficoll-Hypaque-Lösung (Dichte 1,077 g/ml) geschichtet und bei 280 g für 30 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und für die spätere Zugabe zu den Zellkulturen aufbewahrt.

Die Lymphozyten in der Interphase wurden sorgfältig abgenommen und anschließend zweimal in Hanks Salzlösung gewaschen (zentrifugieren für 10 min bei 220 g, RT) und in RPMI 1640-Medium aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20  $\mu$ l Zellsuspension und 180  $\mu$ l Acridin-Orange vermischt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die Zellsuspension wurde dann durch Zugabe von RPMI auf 3 Mio. Lymphozyten /ml eingestellt.

### 2.3.2. **Zellkulturen für die Bestimmung der Proliferation**

Für die Bestimmung der Proliferation wurden die Zellen in einer 96-well Mikrotiterplatte kultiviert. Dazu wurde 100  $\mu$ l Zellsuspension, 50  $\mu$ l autologes Plasma und 50  $\mu$ l der entsprechenden Antigenverdünnung, RPMI als Spontanwert bzw. PWM als Proliferationskontrolle pipettiert. Es wurden pro Antigenkonzentration 3-5 wells angesetzt. Die Inkubation erfolgte für 7 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in

wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Zur Bestimmung der Proliferation wurde 16-18 Stunden vor Ende der Kultivierung 20 µl <sup>3</sup>H-Thymidin mit einer Aktivität von 18,5 kBq in jede Vertiefung pipettiert. Am 7. Tag wurden die Ansätze in den Platten mit Hilfe eines Zellharvesters auf Glasfaserfilter geerntet und für mindestens 2 Stunden getrocknet. Danach wurde der Filter in Plastikfolie eingeschweißt und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Radioaktivität des in die DNA eingebauten <sup>3</sup>H-Thymidins wurde in einem β-Szintillationszähler gemessen und als counts per minute (cpm) angegeben. Aus den gemessenen Werten berechnet sich der Stimulationsindex (SI) nach folgender Formel:

$$SI = \frac{{}^3\text{H-Thymidineinbau mit Antigenzugabe}}{{}^3\text{H-Thymidineinbau ohne Antigenzugabe}}$$

### **2.3.3. Zellkulturen für die Zytokinbestimmung mittels ELISA und PCR**

Für die Analyse der Zytokinexpression und -sekretion wurde die Zellsuspension auf 1 Mio. Lymphozyten/ ml mit RPMI verdünnt und mit 50% autologem Plasma aufgefüllt. In eine 24-well-Platte wurde 1 ml der Zell-Plasma-Suspension und 300 µl der entsprechenden Aprotininkonzentration, RPMI als Leerwert bzw. PWM hinzugefügt und unter den gleichen Bedingungen, wie unter 3.2.1.2. beschrieben, kultiviert. Abhängig von der Zellausbeute wurden 1 oder 2 Ansätze pro Antigenkonzentration angefertigt. Am 7. Tag wurden die Zellkulturen mit Hilfe einer Pipette abgezogen und die Zellen mittels Zentrifuge (1 min bei 8000 rpm) abgetrennt. Der Kulturüberstand wurde vorsichtig, ohne das Pellet aufzuwirbeln in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und beides für die spätere Bearbeitung bei -20°C eingefroren.

### **2.3.4. Antigen- und Mitogenkonzentrationen in den Zellkulturen**

Aprotinin, in der Herstellerkonzentration von 2800 µg/ml, wurde lyophilisiert und mit sterilem und destilliertem H<sub>2</sub>O auf die Stammkonzentration von 6000 µg/ml eingestellt. Die Endkonzentrationen in den Zellkulturen betragen 0,01 - 0,1 - 1 - 10 - 100 - 1000

und 1500 µg/ml. Die Ansätze mit den Konzentrationen von 0,01 und 0,1 wurden nur bei ausreichender Zellausbeute angesetzt. Als Verdünnungsmedium wurde RPMI verwendet.

Das Pokeweed Mitogen (PWM ) kam in einer Konzentration von 40 µg/ml zum Einsatz.

### **2.3.5. Zytokin Bestimmung mittels ELISA-Verfahren**

Die Bestimmung der Zytokine in den Kulturüberständen ( IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10,  $\gamma$ -IFN, GM-CSF, TNF- $\alpha$ ) und aus den Seren ( IL-4, IL-5, IL-12, IL-13,  $\gamma$ -IFN, TNF- $\beta$ ) erfolgte mittels eines Doppelsandwich-ELISA.

Im ersten Schritt wurden 96-well-Mikrotiterplatten ( Maxisorp, Nunc), die eine hohe Proteinbindungskapazität besitzen, mit 100 µl der jeweiligen monoklonalen Antikörperverdünnung ( Bicarbonat- puffer, pH 9,6 ) beschichtet ( Tabelle 2-4) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit PBS-Puffer + 0,5% BSA gewaschen (3x 150 µl/well). Nach dem letzten Waschen wurde der Puffer in den Platten belassen und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. In einem weiteren Arbeitsschritt wurden 75 µl der Zellkulturüberstände und der Seren sowie 100 µl der jeweiligen Zytokin-Standardverdünnungsreihe ( PBS-Puffer + 1% BSA) in die Mikrotiterplatten pipetiert. Die maximalen Standardkonzentrationen sind in Tabelle 2-4 aufgelistet. Die Verdünnung der Standards erfolgte im Verhältnis 1:2 bis zu einer Titerstufe von 1:64. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurden die Platten gewaschen ( 3x 150 µl PBS-Puffer + 0,5% BSA /well ), anschließend mit 100 µl des in PBS + 0,5% BSA verdünnten biotinylierten Antikörpers versetzt ( Tabelle 2-4) und wiederum für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS-Puffer + 0,5% BSA ( 3x 150 µl/well) erfolgte die Detektion mit Avidinperoxidase. Dabei wurde jeweils 100 µl der in PBS-Puffer + 0,5% BSA verdünnten Avidin-Peroxidase ( 2,5 µl) pro well pipetiert und für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platten in PBS-Puffer + 0,5% BSA wurde 150 µl Substrat zugegeben. Als Substrat für die Enzymreaktion diente eine Lösung von 0,5 mg/ml 1,2-Phenylendiamin in Citratpuffer, pH 5,0, unter Zusatz von 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl

25%iger Schwefelsäure abgestoppt. Anschließend wurde im ELISA-Reader die Extinktion bei 450 nm gemessen und in pg/ml angegeben. Für jedes einzelne Zytokin wurde ein Konzentrationsgrenzwert definiert, oberhalb dessen das Ergebnis als positiv bewertet wurde (Tabelle 2-5).

*TABELLE 2-4: KONZENTRATIONEN DER MONOKLONALEN (MOAB) UND BIOTINYLIERTEN (BIOTAB) ANTIKÖRPER, SOWIE DIE MAXIMALEN KONZENTRATIONEN DER EINZELNEN STANDARDS*

Zytokin	moAB Konzentration [µg/ml]	biotAB Konzentration [µg/ml]	Standard max. Konzentration [pg/ml]
IL-1β	2.5	0.1	250
IL-4	1.5	1	1.250
IL-5	1.5	1	7.500
IL-6	2.5	25 ng/ml	2.000
IL-10	1.5	1	10.000
IL-12	7	1	20.000
IL-13	1.5	1	8.000
IFN-γ	3	1	10.000
GM-CSF	1.5	1	2.000
TNF-α	3	1	5.000
TNF-β	1.5	1	6.250

*TABELLE 2- 5: DEFINIERTE ZYTOKINGRENZWERTE IN PG/ML*

Zytokin	Grenzwert [pg/ml]
IL-1β	4
IL-4	40
IL-5	100
IL-6	60
IL-10	250
IL-12	300
IL-13	100
γ-IFN	100
GM-CSF	50
TNF-α	50
TNF-β	100

### **2.3.6. Definition der Zytokinprofile**

Entsprechend der Zytokinsekretion aus den Lymphozyten wird zwischen Typ 1, Typ 2 oder Typ 0 unterschieden [54]. Ein Typ 1-Profil wird durch die Expression von IFN- $\gamma$  definiert, daneben kann IL-12 oder TNF- $\beta$  sezerniert werden. Wird IL-4, IL-5 oder IL-13 exprimiert, so spricht man von einem Typ 2-Profil. Typ 0 ist durch die Expression beider Zytokinprofile definiert.

### **2.3.7 Analyse der Zytokinexpression mittels PCR ( Polymerase Chain Reaction)**

#### **2.3.7.1. RNA-Isolierung**

Die Gesamt-RNA wurde mittels RNA-Clean<sup>TM</sup>-System, das Guanidinium Thiocyanat und Phenol enthält, isoliert. Zu den aufgetauten Zellen wurde 300  $\mu$ l RNA-Clean<sup>TM</sup> pipettiert und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren homogenisiert. Anschließend wurde 50  $\mu$ l Chloroform zugegeben, ca. 15 sec. kräftig geschüttelt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Das Homogenisat wurde dann zur Phasentrennung zentrifugiert (12000 g, 15 min, 4 °C). Während DNA und Proteine in der unteren organischen Phase verworfen wurden, überführte man die obere wässrige und RNA-haltige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß. Anschließend wurde das gleiche Volumen Isopropanol zugegeben, gut gemischt, für 15 min auf Eis gestellt und bei 12000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das RNA-Präzipitat mit 500  $\mu$ l 70 %igem Ethanol gewaschen und für 8 min bei 7500 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 50  $\mu$ l RNase freiem Wasser aufgenommen.

#### **2.3.7.2. cDNA-Synthese**

Bei der cDNA-Synthese wird mittels einer Reversen Transkriptase die RNA in cDNA transkribiert. In der Vorinkubation wird in einem Reaktionsgefäß 4,0  $\mu$ l RNA, 1,2  $\mu$ l antisense Zytokinprimer (50 pmol/ $\mu$ l) und 4,0  $\mu$ l Wasser angesetzt und bei 70 °C für 10

min im Thermocycler inkubiert. Dem Vorinkubationsansatz wurde 9 µl eines Reaktionsansatzes bestehend aus 4,0 µl 5-fach Reaktionspuffer, 2,0 µl 0,1 M DTT, 0,5 µl Rnase-Inhibitor, 1,0 µl 20 mM dNTP-Mix, 0,25 µl MMLV RT ( 200 U/µl) und 1,5 µl H<sub>2</sub>O zugegeben und nach folgendem Temperaturprogramm inkubiert.

Temperaturprogramm:           60 min -- 37 °C  
   5 min -- 94 °C  
    10 min -- 4 °C

### 2.3.7.3.           **Polymerase-Kettenreaktion ( PCR)**

Die Amplifikation der cDNA erfolgte in der Polymerase-Kettenreaktion mit Hilfe der Taq-Polymerase. Dazu wurde ein Standardgemisch mit 5 µl 10-fach PCR-Puffer, 2,5 µl Magnesiumchlorid ( 50mM), 0,5 µl Desoxyribonukleotid-Triphosphat ( 20mM), 0,4 µl sense Primer ( 50 pmol/µl), 0,4 µl antisense Primer ( 50 pmol/µl), 2 µl Zytokin-cDNA und 0,25 µl Taq Polymerase ( 5 U/µl) verwendet und mit bidestilliertem Wasser auf 50µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde mit zwei Tropfen Mineralöl überschichtet und die PCR im Thermocycler nach dem folgenden Programm inkubiert.

Temperaturschema:	3 min	Denaturieren	94 °C	
	-----			
	1 min	Denaturieren	94 °C	
	2 min	„annealing“	55 °C	45 Zyklen
	3 min	Synthese	72 °C	
	-----			
	7 min	Synthese	72 °C	

### 2.3.7.4.           **Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurde ein Agarosegel mit 80 ml Volumen angefertigt. Die 2% Agarose ( Nusieve Agarose/Sigma Agarose 3:1) wurde in 1x TBE-Puffer aufgekocht. Danach wurden je 8 µl des PCR-Ansatzes mit 3 µl Proben-

auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandard wurde 1,5 µl der 100 bp DNA Ladder aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 mV. Daran anschließend wurde das Gel für 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration: 1 µg/ml, 1x TBE) inkubiert und für weitere 15 min in H<sub>2</sub>O gewaschen. Schließlich wurden die Gele unter UV Licht (366 nm) fotografiert. Die Überprüfung der amplifizierten Fragmente erfolgte mittels ihrer Basenpaargröße.

## **2.4. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte unter der Betreuung von Frau Dr. sc. hum. F. Koch und Prof. Dr. rer. nat. Dietz aus dem Institut für Medizinische Biometrie in Tübingen.

Im Lymphozytentransformationstest sind für jede Konzentrationsstufe mehrfach Ansätze erhoben worden. Aus dem ermittelten Median wurde der Stimulationsindex (SI) errechnet. Aufgrund der schwierigen Vergleichbarkeit der positiven Stimulationsindizes bei verschiedenen Konzentrationsstufen konnte keine statistische Aussage erhoben werden. Die statistische Auswertung der Zytokinmessungen bezüglich des Gruppenvergleiches erfolgte im log-rank Test, die Veränderungen der Zytokine im Verlauf der Untersuchung wurde mit Hilfe des T-Testes errechnet.

### 3. ERGEBNISSE

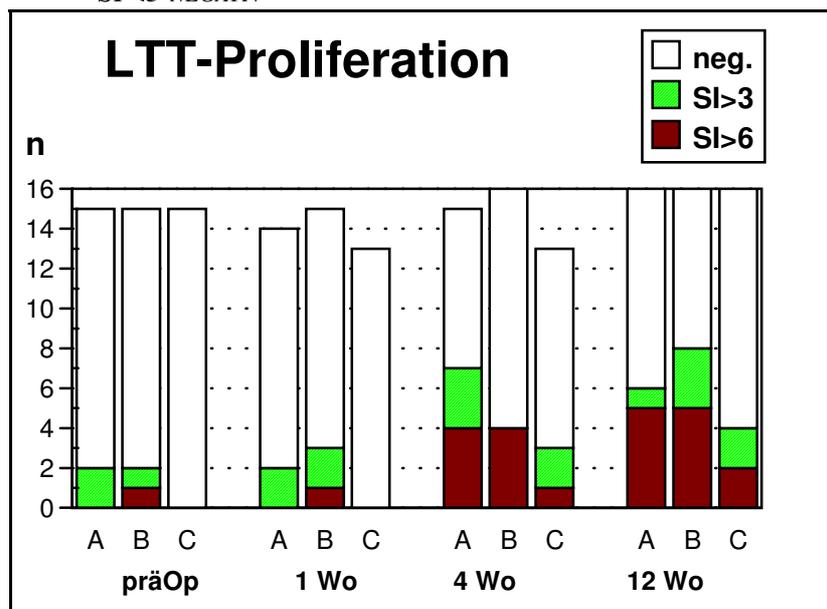
#### 3.1. Ergebnisse in Aprotinin-stimulierten Lymphozytenkulturen

##### 3.1.1. Proliferation im Lymphozytentransformationstest (LTT)

Im Lymphozytentransformationstest (LTT) wurde die Stimulierbarkeit der aus peripheren Patientenblut gewonnenen Lymphozyten mit dem Antigen Aprotinin bestimmt. Die Proliferation wurde mittels des Stimulationsindex (SI) (siehe 2.3.2.) ausgedrückt. Ein  $SI > 3$  wurde als ein schwach positives, ein  $SI > 6$  als stark positives Ergebnis bewertet.

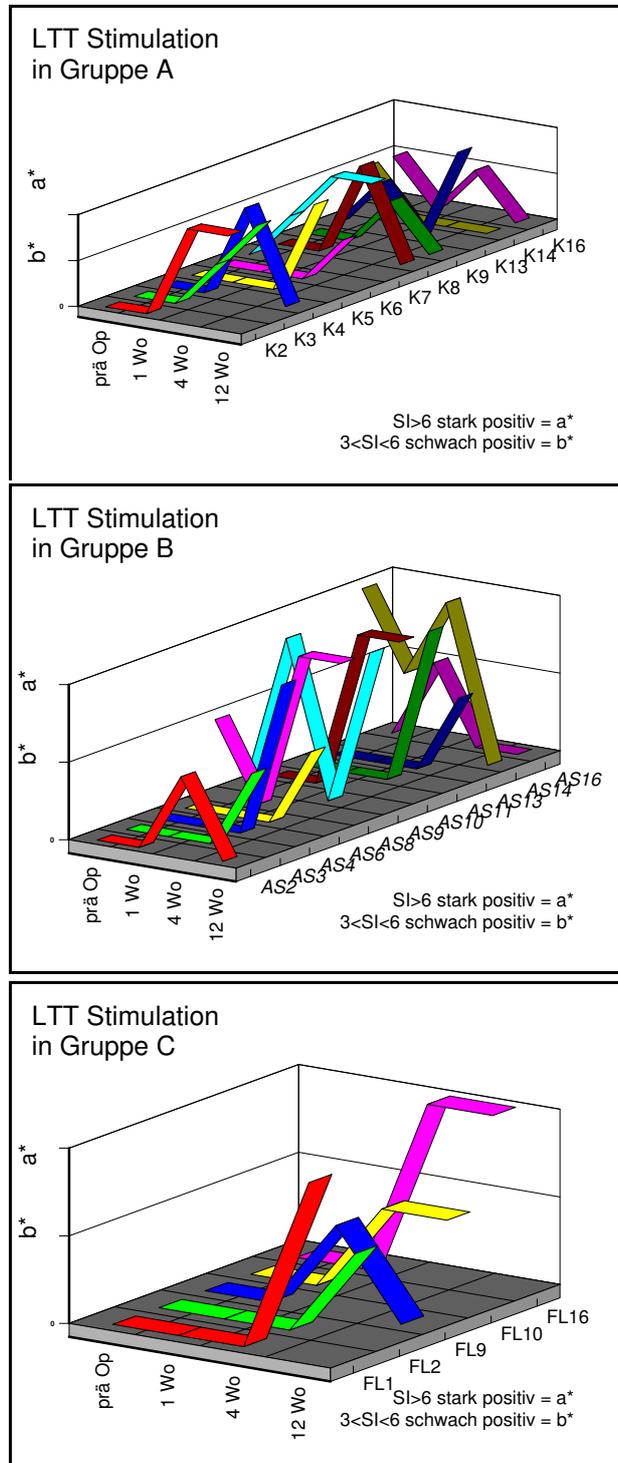
Zunächst wurde der Aprotinineinfluß im präoperativen Stadium gemessen, d.h. vor der lokalen oder systemischen Exposition. Zu diesem Zeitpunkt wiesen drei Patienten eine schwache und ein Patient eine starke Aprotininspezifische Proliferation auf.

ABBILDUNG 3-1: *PROLIFERATIONSINDICES NACH APROTININSTIMULATION DER LYMPHOZYTENKULTUREN IN DEN DREI GRUPPEN (A: KOMBINIERTE APPLIKATION, B: APROTININ SYSTEMISCH, C: FIBRINKLEBER LOKAL) IM VERLAUF DER UNTERSUCHUNG;  $SI > 6$  STARK POSITIV,  $SI > 3$  SCHWACH POSITIV,  $SI < 3$  NEGATIV*



Ergebnisse

ABBILDUNG 3-2 STIMULATION IM LTT DER EINZELNEN PROBANDEN IN GRUPPE A (KOMBINIERTE APROTININAPPLIKATION), GRUPPE B (SYSTEMISCH) UND GRUPPE C (LOKALE APPLIKATION) IM VERLAUF. STIMULATIONINDEX SI GRÖßER 3 WURDE SCHWACH POSITIV, GRÖßER 6 STARK POSITIV BEWERTET. PATIENTEN, DIE IM VERLAUF KEINE POSITIVE STIMULATION ZEIGTEN, SIND NICHT DARGESTELLT.

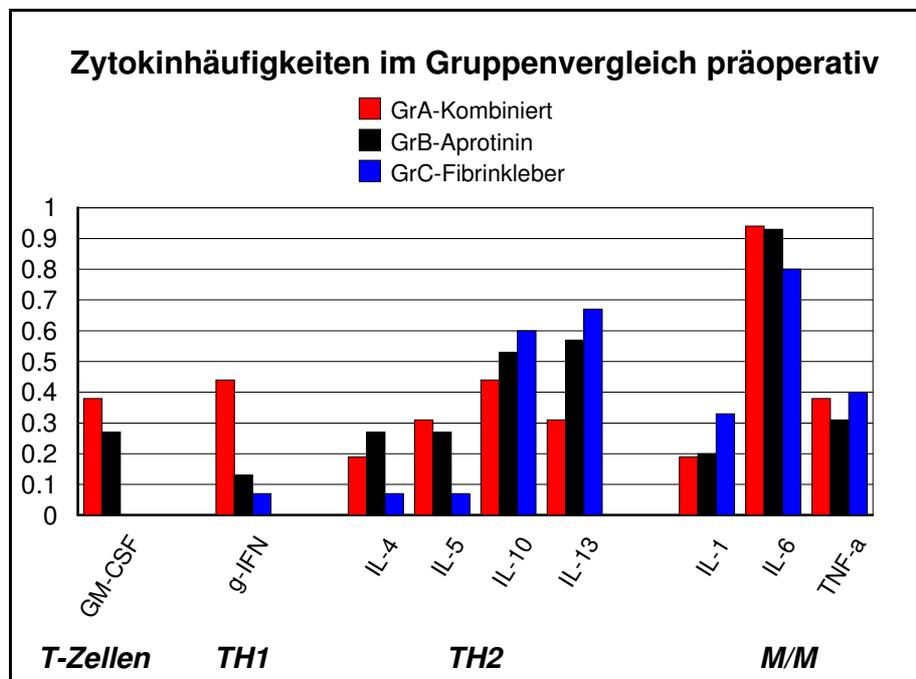


Die Proliferationsergebnisse vor und nach Aprotininexposition sind in Abbildung 3-1 dargestellt. Die Stimulierbarkeit gegenüber Aprotinin war in allen 3 Gruppen am stärksten nach 12 Wochen ausgeprägt. Die meisten positiven Reaktionen waren in Gruppe B zu beobachten ( 8 von 16 Patienten).

### 3.1.2. Zytokinproduktion in den Zellkulturen vor Behandlung

In einem ersten Schritt wurde die Zytokinproduktion durch PBMC auf Aprotinin bei Patienten vor einer Behandlung untersucht. Es zeigt sich, daß die relativen Häufigkeiten für die Zytokine IL-10, IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  sich in allen drei Gruppen im wesentlichen gleichen. GM-CSF und  $\gamma$ -IFN wurden in Gruppe A häufiger gebildet, als in den zwei anderen Gruppen. Ferner wurde die Produktion von IL-4 und IL-5 in Gruppe C seltener beobachtet, als in den anderen Gruppen.

ABBILDUNG 3-3: RELATIVEN HÄUFIGKEITEN DER ZYTOKINE GM-CSF,  $\gamma$ -IFN, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-1, IL-6 UND TNF- $\alpha$  IN DEN ÜBERSTÄNDEN VON APROTININSTIMULIERTEN LYMPHOZYTEN DER GRUPPEN A, B UND C VOR BEHANDLUNG (PRÄOPERATIV)



Vergleicht man die Zytokine untereinander, so wird IL-6 am häufigsten sezerniert, gefolgt von IL-10 und IL-13. Die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-1 werden insgesamt seltener exprimiert (siehe Abbildung 3-3).

### **3.1.3. Verhalten der Zytokine im Verlauf der Behandlung**

#### **3.1.3.1. Gruppe A : systemische Aprotinin- und lokale Fibrinkleberapplikation**

Die Produktion von  $\gamma$ -IFN durch Aprotinin-stimulierte Lymphozyten wurde präoperativ bei 7 von 16 Patienten beobachtet. Im weiteren Verlauf sank die Häufigkeit der  $\gamma$ -IFN Sekretion deutlich ab. Allerdings waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Die mittleren Spiegel stiegen im Gegensatz zur Häufigkeit etwas an, was auf eine stark positive Sekretion, auch an der Standardabweichung abzulesen, hindeutet.

Auch die Häufigkeit der Produktion von IL-5 ging nach der Operation bzw. der Aprotininexposition zurück; die IL-5 Spiegel nahmen ab, die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 3-4).

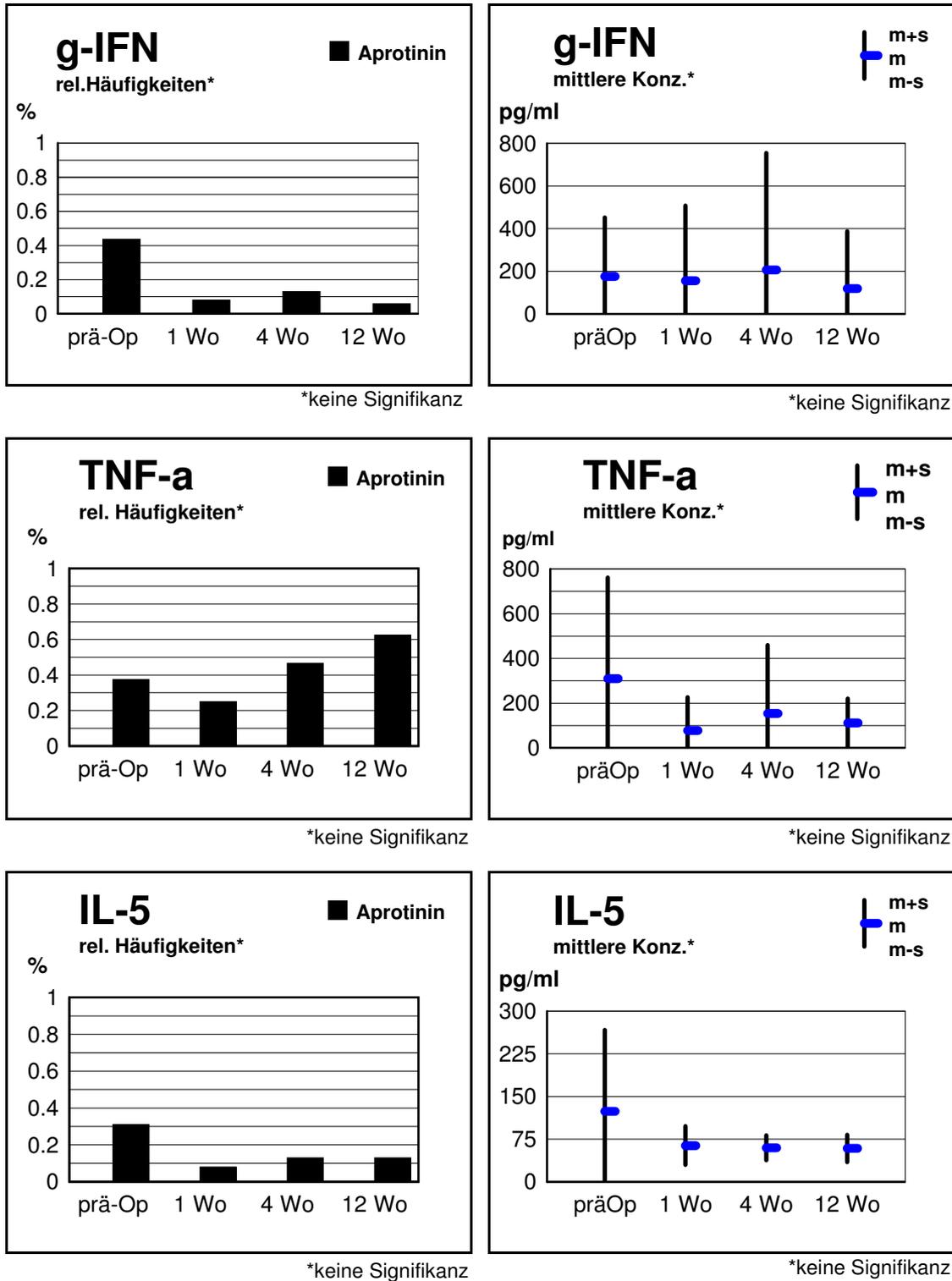
TNF- $\alpha$  wurde vier und 12 Wochen nach Exposition deutlich häufiger sezerniert, die mittleren Zytokinpiegel gingen postoperativ zurück.

Die Häufigkeit der IL-6 Sekretion nahm während der Untersuchung stetig ab. Die mittleren Spiegel lagen aber nach Aprotininexposition höher als davor (nicht dargestellt).

Die Sekretion von IL-1 stellt sich in Gruppe A während des Beobachtungszeitraums konstant in Häufigkeit und mittleren Spiegeln dar. IL-4 wird nach Exposition häufiger sezerniert, die mittlere IL-4 Konzentration steigt ebenfalls, ohne signifikante Unterschiede zu zeigen. Die Sekretionsrate von IL-10 verdoppelt sich nach 4 Wochen gegenüber dem Wert vor und eine Woche nach Operation und ist nach 12 Wochen wieder rückläufig. Die mittlere Konzentration in dieser Gruppe ist 4 Wochen nach Behandlung ebenfalls am höchsten (nicht dargestellt).

Ergebnisse

ABBILDUNG 3-4: RELATIVE HÄUFIGKEITEN UND MITTLERE KONZENTRATIONEN MIT STANDARDABWEICHUNG VON  $\gamma$ -IFN, TNF-a UND IL-5 VOR UND NACH APROTININEXPOSITION BEI PATIENTEN DER GRUPPE A

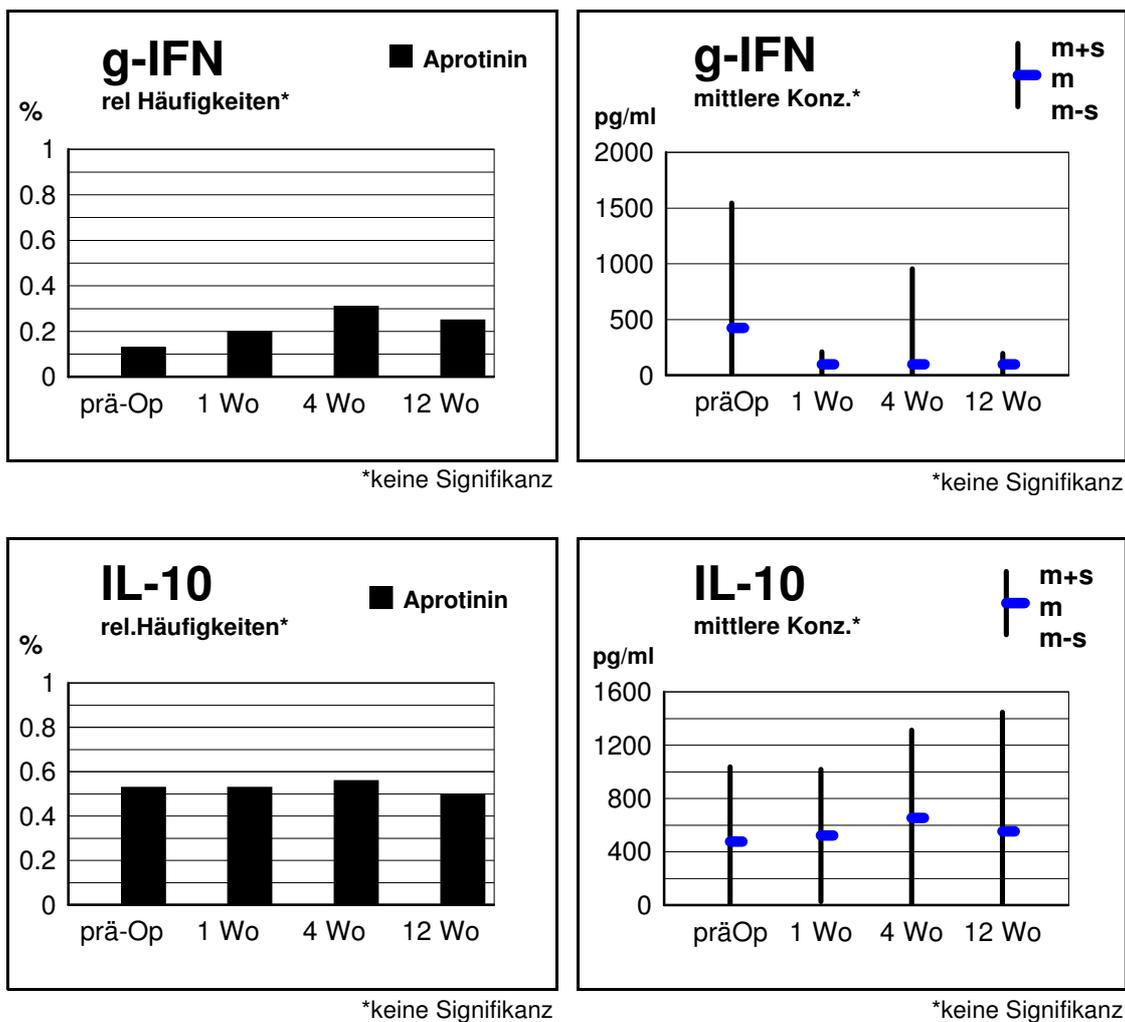


3.1.3.2. Gruppe B: systemische Aprotininapplikation

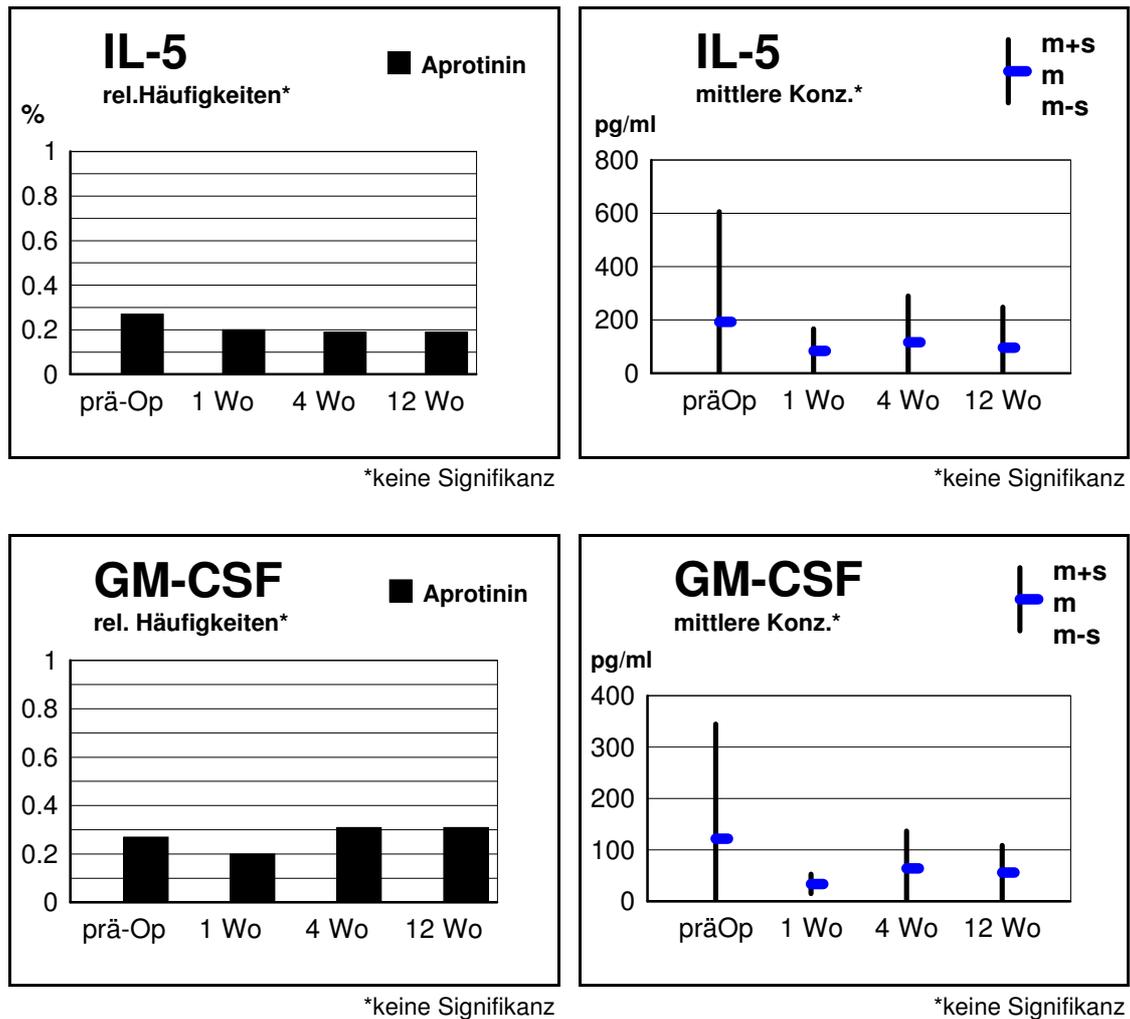
Die Häufigkeit der Sekretion von  $\gamma$ -IFN in den Lymphozytenkulturen stieg in den ersten vier Wochen langsam an, danach war der Trend rückläufig. Die präoperativen mittleren Konzentrationen der  $\gamma$ -IFN und IL-5 Spiegel waren deutlich höher als bei den postoperativen Messungen, die in etwa konstant blieben.

GM-CSF zeigte ein vergleichbares Bild, die mittlere Konzentration ist präoperativ doppelt so hoch wie bei den nachfolgenden Untersuchungen. Die Häufigkeiten der GM-CSF Expression waren im Verlauf gleichbleibend. (siehe Abbildung 3-5)

ABBILDUNG 3-5: RELATIVE HÄUFIGKEITEN UND MITTLERE KONZENTRATIONEN MIT STANDARD-ABWEICHUNG VON  $\gamma$ -IFN, IL-10, IL-5 UND GM-CSF NACH APROTININ-STIMULATION BEI PATIENTEN DER GRUPPE B



## Ergebnisse



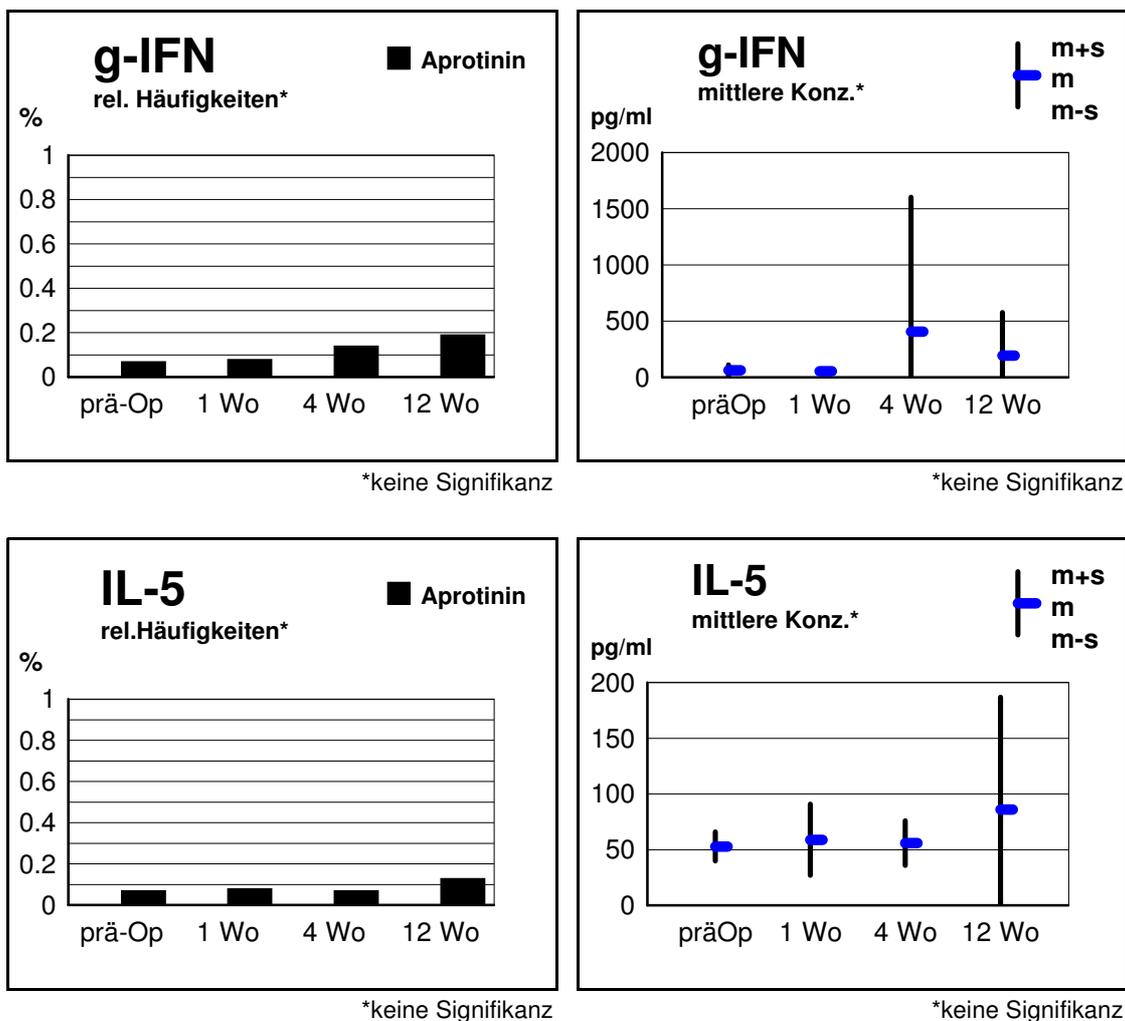
### 3.1.3.3. Gruppe C: lokale Fibrinkleberapplikation

Die mittlere Konzentration der  $\gamma$ -IFN Spiegel in den Lymphozytenüberständen war vier Wochen nach Aprotininapplikation um ein vielfaches höher (aber statistisch nicht signifikant), als bei den Messungen präoperativ und nach der ersten Woche postoperativ. Nach 12 Wochen war sie wieder rückläufig. Die Häufigkeit der  $\gamma$ -IFN Produktion nahm jedoch nicht wesentlich zu.

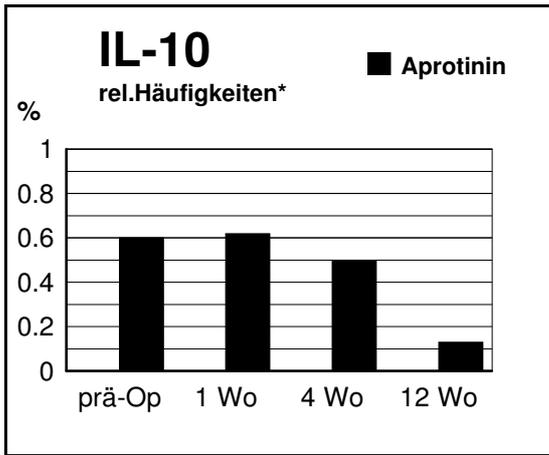
Die Produktion von IL-5 änderte sich in der Zeit nach Aprotiningabe nicht signifikant, während die Sekretion von IL-10 nach 12 Wochen deutlich vermindert war.

Der mittlere Konzentrationspiegel der Zytokine IL-1 und IL-6 stieg eine Woche nach Exposition um ein mehrfaches an und sank nach 12 Wochen bis auf den Ausgangswert ab. Interessant ist die Beobachtung, daß IL-6 in den ersten vier Wochen von etwa 80%, nach 12 Wochen aber nur noch von 50% der Patienten produziert wurde. (siehe Abbildung 3-6)

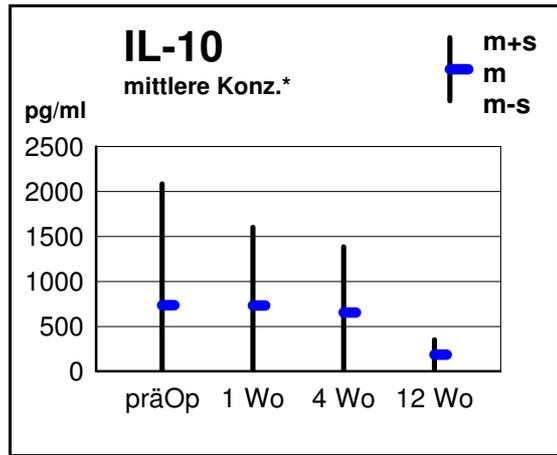
ABBILDUNG 3-6: RELATIVE HÄUFIGKEITEN UND MITTLERE KONZENTRATIONEN MIT STANDARD-ABWEICHUNG VON  $\gamma$ -IFN, IL-5, IL-10, IL-1 UND IL-6 NACH APROTININ-STIMULATION BEI PATIENTEN DER GRUPPE C



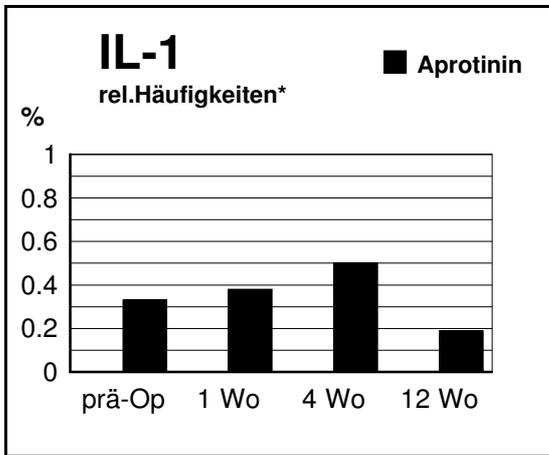
Ergebnisse



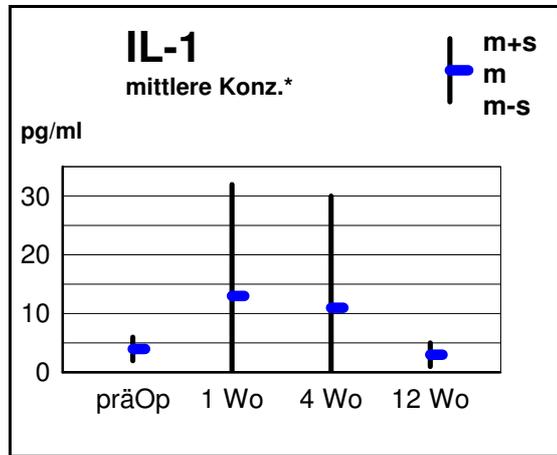
\*keine Signifikanz



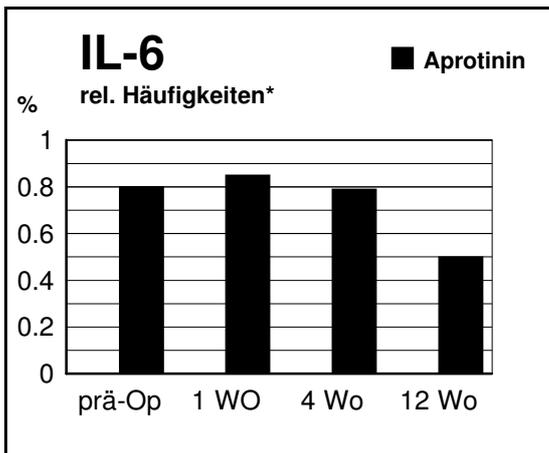
\*keine Signifikanz



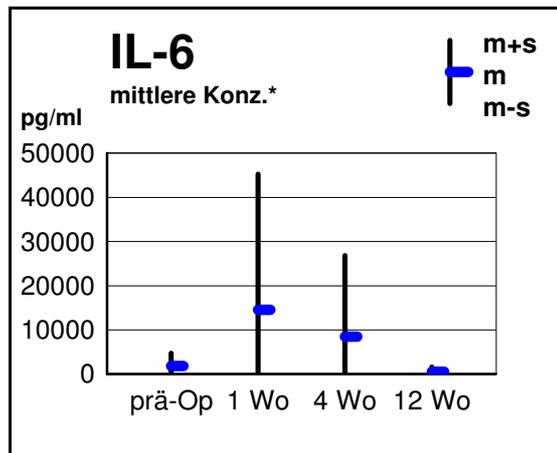
\*keine Signifikanz



\*keine Signifikanz



\*keine Signifikanz



\*keine Signifikanz

#### 3.1.3.4. Zytokinproduktion im Gruppenvergleich

##### 3.1.3.4.1 IL-6

IL-6 zeigt in allen 3 Gruppen eine häufige Sekretionsrate, wobei in den Gruppen A und C nach 12 Wochen die Häufigkeit rückläufig ist. Die mittleren Spiegel in Gruppe A und C steigen postexpositionell über den Wert vor Exposition, in Gruppe C fällt die mittlere IL-6 Konzentration nach 12 Wochen unter den Ausgangswert. Gruppe B zeigt allein nach 4 Wochen einen Anstieg der mittleren IL-6 Konzentrationen, alle anderen Zeitpunkte zeigen ein gleiches Niveau. Der Kaplan-Meier-Test zeigt keine Signifikanz im Gruppenvergleich bezüglich der IL-6 Sekretion, der t-Test zum Vergleich der einzelnen Zeitpunkte ist nicht signifikant (Abb. 3-7).

##### 3.1.3.4.2 $\gamma$ -IFN

Die Expression von  $\gamma$ -IFN im Verlauf des Untersuchungszeitraums ist ohne signifikante Unterschiede. In Gruppe A ist präoperativ eine häufige Expression (7 von 16 ) zu beobachten, im weiteren postoperativen Verlauf ist diese aber stark rückläufig. In Gruppe B ist eine leichte Zunahme der Häufigkeiten nach Exposition zu beobachten, die mittleren Spiegel sind postexpositionell niedriger. Gruppe C zeigt sowohl in der Sekretionshäufigkeit und den mittleren  $\gamma$ -IFN Spiegeln postoperativ eine Steigerung (Abb.3-8)

##### 3.1.3.4.3 IL-5

Die präoperative Sekretionsrate (5/16) in Gruppe A geht postoperativ deutlich zurück, auch die IL-5 Spiegel sind nach Behandlung niedriger als zuvor. In Gruppe B ist die IL-5 Sekretionsrate und Konzentration rückläufig. Gruppe C zeigt sowohl in der Häufigkeit der Expression als auch in der mittleren Konzentration einen konstant niedrigen Verlauf. Statistische Signifikanz ist nicht festzustellen (Abb. 3-9).

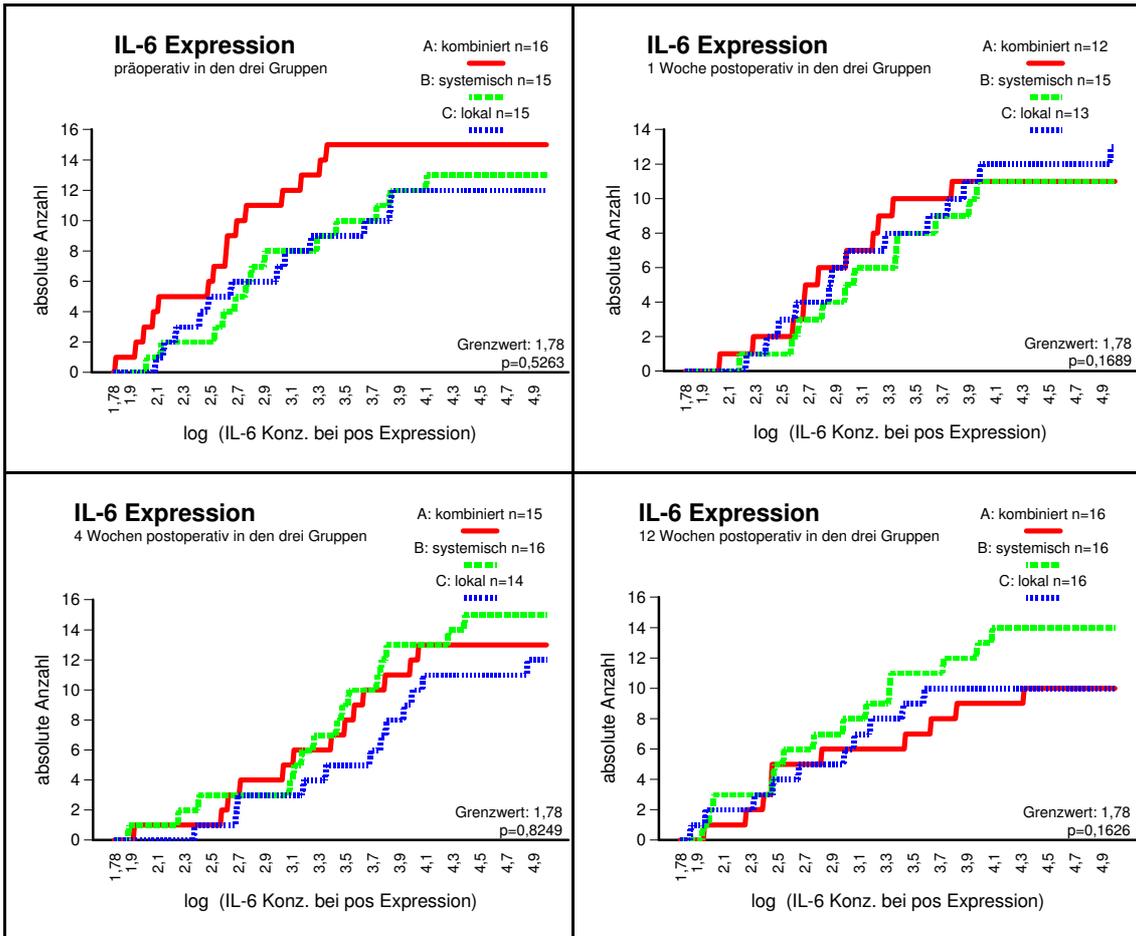
#### 3.1.3.4.4 IL-10

IL-10 wird während des Untersuchungszeitraums in allen drei Gruppen auffallend häufig exprimiert. Die Sekretionsrate in Gruppe A verdoppelt sich nach 4 Wochen gegenüber dem präoperativen und 1 Woche postoperativen Wert und ist nach 12 Wochen wieder rückläufig. Die mittlere IL-10 Konzentration in dieser Gruppe ist 4 Wochen nach Behandlung ebenfalls am höchsten. Die Häufigkeit der IL-10 Sekretion ist in Gruppe B im Verlauf annähernd konstant hoch, die IL-10 Spiegel sind nach 4 Wochen am höchsten. In Gruppe C ist die Häufigkeit der Sekretion und die Höhe der Zytokinspiegel von IL-10 bis zur 4. postoperativen Woche leicht rückläufig. Nach 12 Wochen ist sowohl die Sekretion als auch die Konzentration deutlich reduziert. Die statistische Auswertung ergibt keine signifikanten Unterschied im Verlauf einer Gruppe, als auch im Gruppenvergleich untereinander (Abb. 3-10).

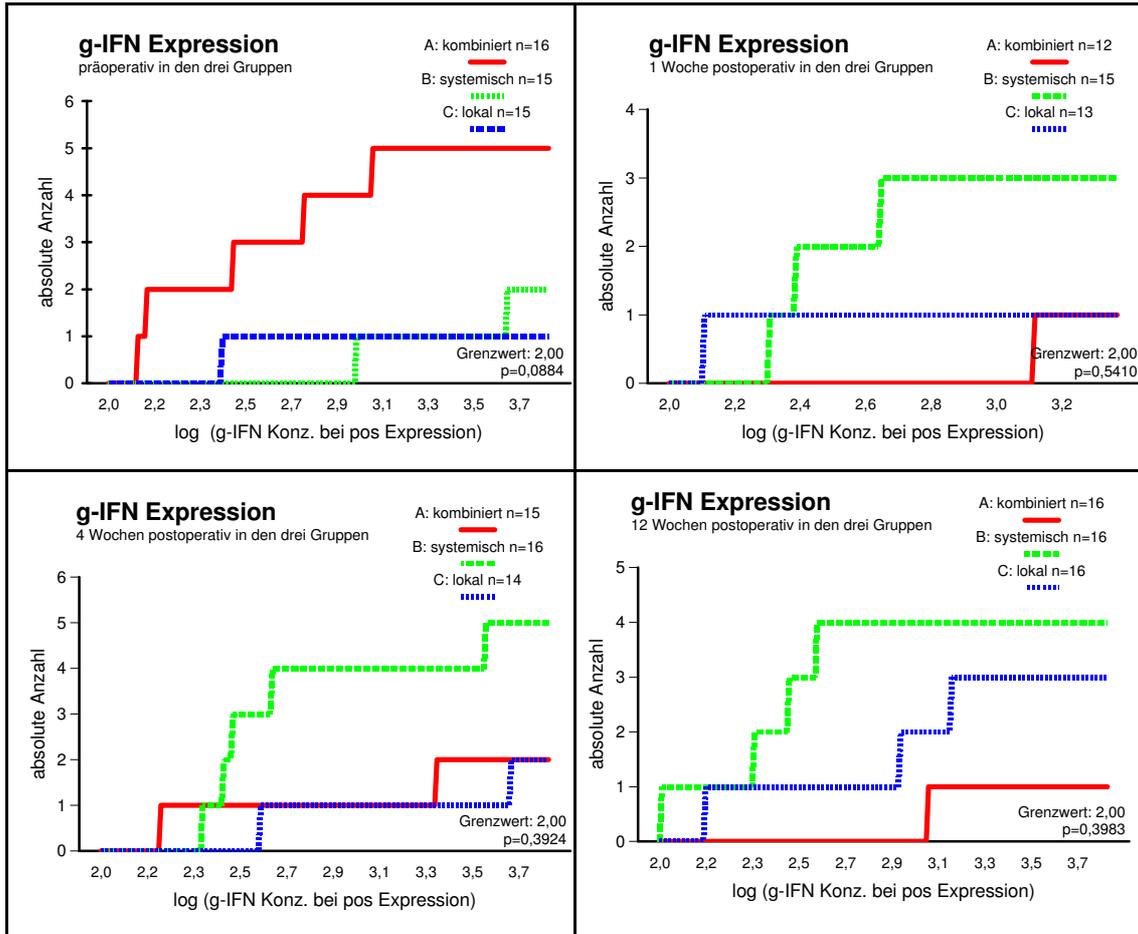
#### 3.1.3.5. Stimulation durch PWM

Die durch das Mitogen PWM induzierte Zytokinproduktion änderte sich für alle gemessenen Zytokine im postoperativen Verlauf nicht (nicht dargestellt).

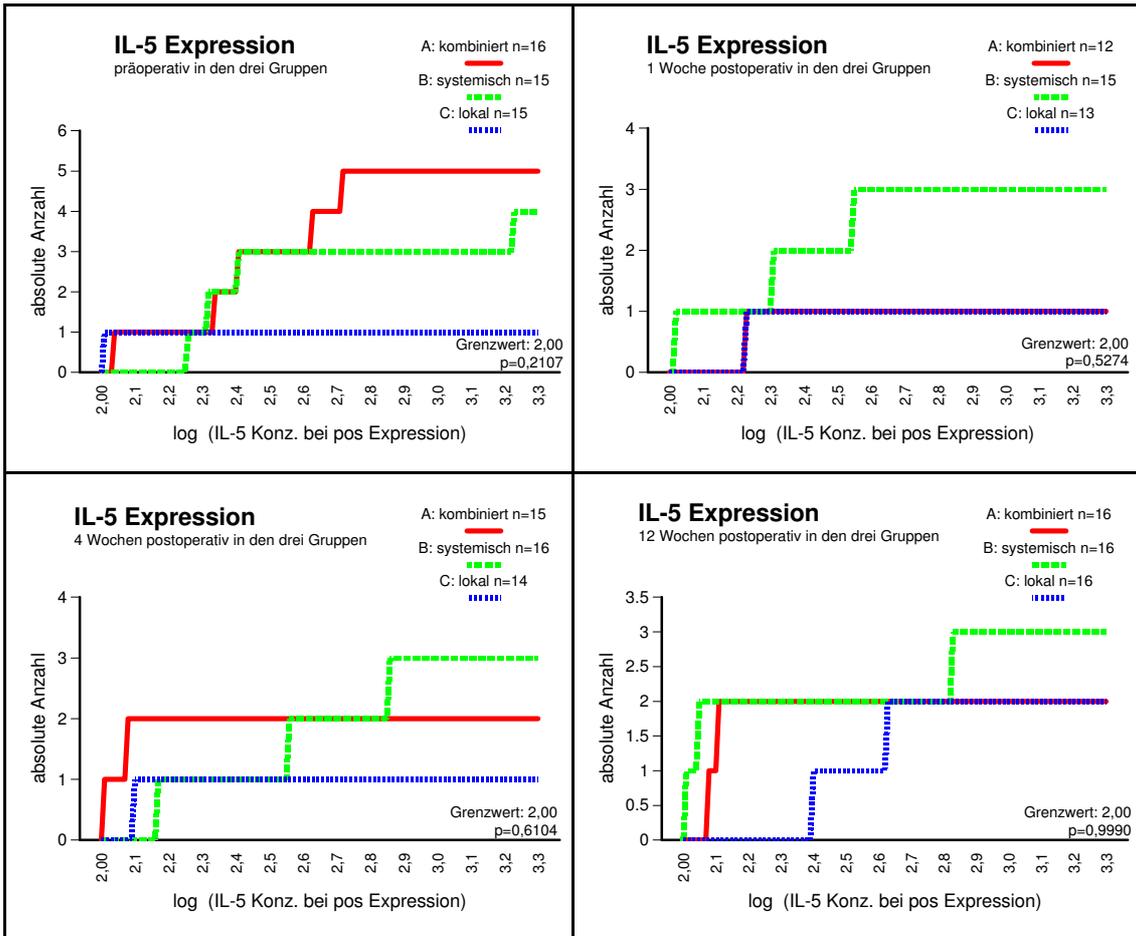
**ABBILDUNG 3-7:** GRUPPENVERGLEICH BEZÜGLICH DER ANZAHL POSITIVER IL-6 PRODUKTION MIT ENTSPRECHENDEN IL-6 SPIEGELN. EINZELDARSTELLUNG ZU JEDEM UNTERSUCHUNGSZEITPUNKT. DER KURVENVERLAUF BEGINNT BEIM GRENZWERT, AB DIESEM WERT WURDEN DIE TESTE POSITIV BEWERTET; DIE KURVE „STEIGT“ UND VERDEUTLICHT DAMIT 1.) DIE GEMESSENE KONZENTRATION DES ZYTOKINS UND 2.) DIE ABSOLUTE ANZAHL DER POSITIVEN TESTS IN DER JEWEILIGEN GRUPPE



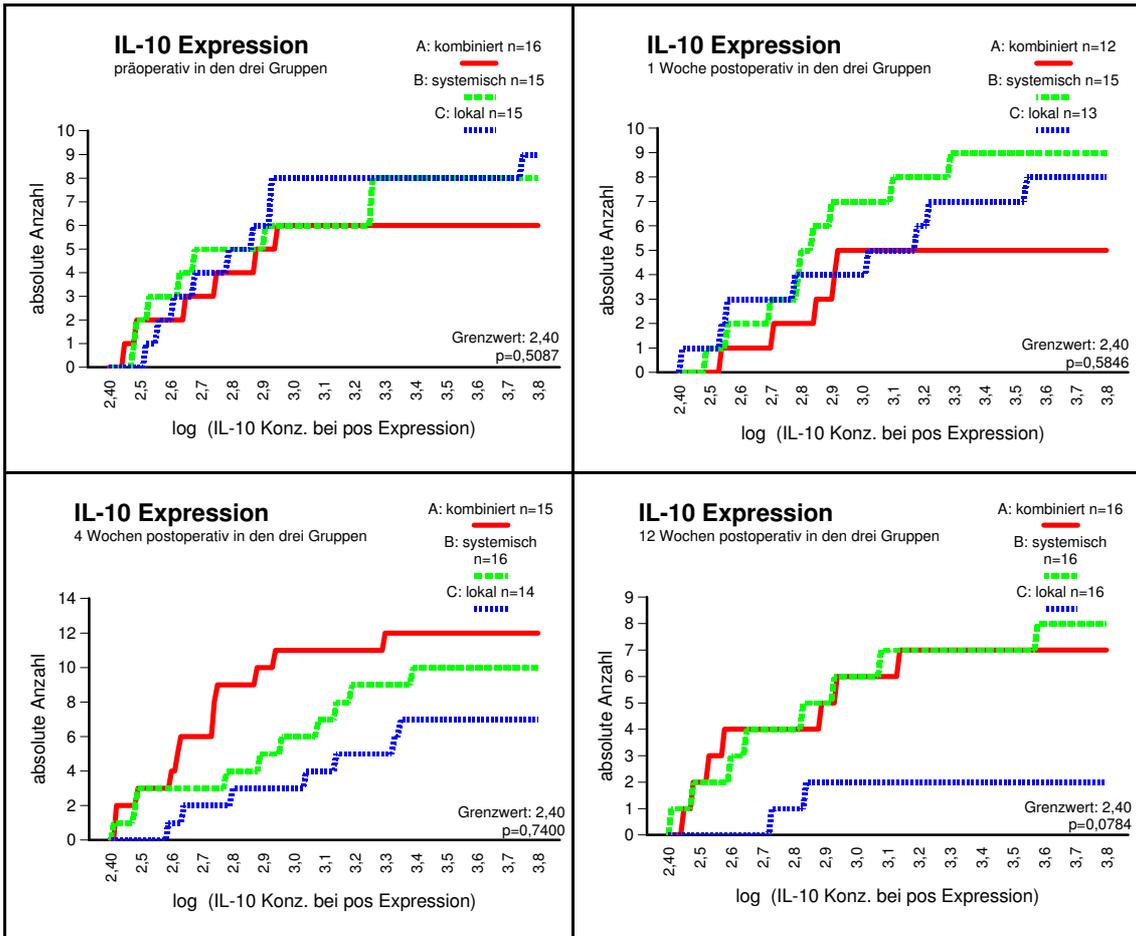
**ABBILDUNG 3-8:** GRUPPENVERGLEICH BEZÜGLICH DER ANZAHL POSITIVER G-IFN PRODUKTION MIT ENTSPRECHENDEN G-IFN-SPIEGELN. EINZELDARSTELLUNG ZU JEDEM UNTERSUCHUNGSZEITPUNKT. DER KURVENVERLAUF BEGINNT BEIM GRENZWERT, AB DIESEM WERT WURDEN DIE TESTE POSITIV BEWERTET; DIE KURVE „STEIGT“ UND VERDEUTLICHT DAMIT 1.) DIE GEMESSENE KONZENTRATION DES ZYTOKINS UND 2.) DIE ABSOLUTE ANZAHL DER POSITIVEN TESTS IN DER JEWEILIGEN GRUPPE



**ABBILDUNG 3-9:** GRUPPENVERGLEICH BEZÜGLICH DER ANZAHL POSITIVER IL-5 PRODUKTION MIT ENTSPRECHENDEN IL-5 SPIEGELN. EINZELDARSTELLUNG ZU JEDEM UNTERSUCHUNGSZEITPUNKT. DER KURVENVERLAUF BEGINNT BEIM GRENZWERT, AB DIESEM WERT WURDEN DIE TESTE POSITIV BEWERTET; DIE KURVE „STEIGT“ UND VERDEUTLICHT DAMIT 1.) DIE GEMESSENE KONZENTRATION DES ZYTOKINS UND 2.) DIE ABSOLUTE ANZAHL DER POSITIVEN TESTS IN DER JEWEILIGEN GRUPPE



**ABBILDUNG 3-10:** GRUPPENVERGLEICH BEZÜGLICH DER ANZAHL POSITIVER IL-10 PRODUKTION MIT ENTSPRECHENDEN IL-10 SPIEGELN. EINZELDARSTELLUNG ZU JEDEM UNTERSUCHUNGSZEITPUNKT. DER KURVENVERLAUF BEGINNT BEIM GRENZWERT, AB DIESEM WERT WURDEN DIE TESTE POSITIV BEWERTET; DIE KURVE „STEIGT“ UND VERDEUTLICHT DAMIT 1.) DIE GEMESSENE KONZENTRATION DES ZYTOKINS UND 2.) DIE ABSOLUTE ANZAHL DER POSITIVEN TESTS IN DER JEWEILIGEN GRUPPE



### 3.2. Zytokinbestimmung in den Seren

In den Patientenseren wurden die Typ1-relevanten Zytokine  $\gamma$ -IFN, IL-12, TNF- $\beta$ , sowie die Typ2-assoziierten Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 untersucht und mit den drei Patientengruppen korreliert. In Tabelle 3-1 sind die Ergebnisse für die einzelnen Gruppen zusammenfassend aufgeführt und anschließend in exemplarischen Diagrammen veranschaulicht.

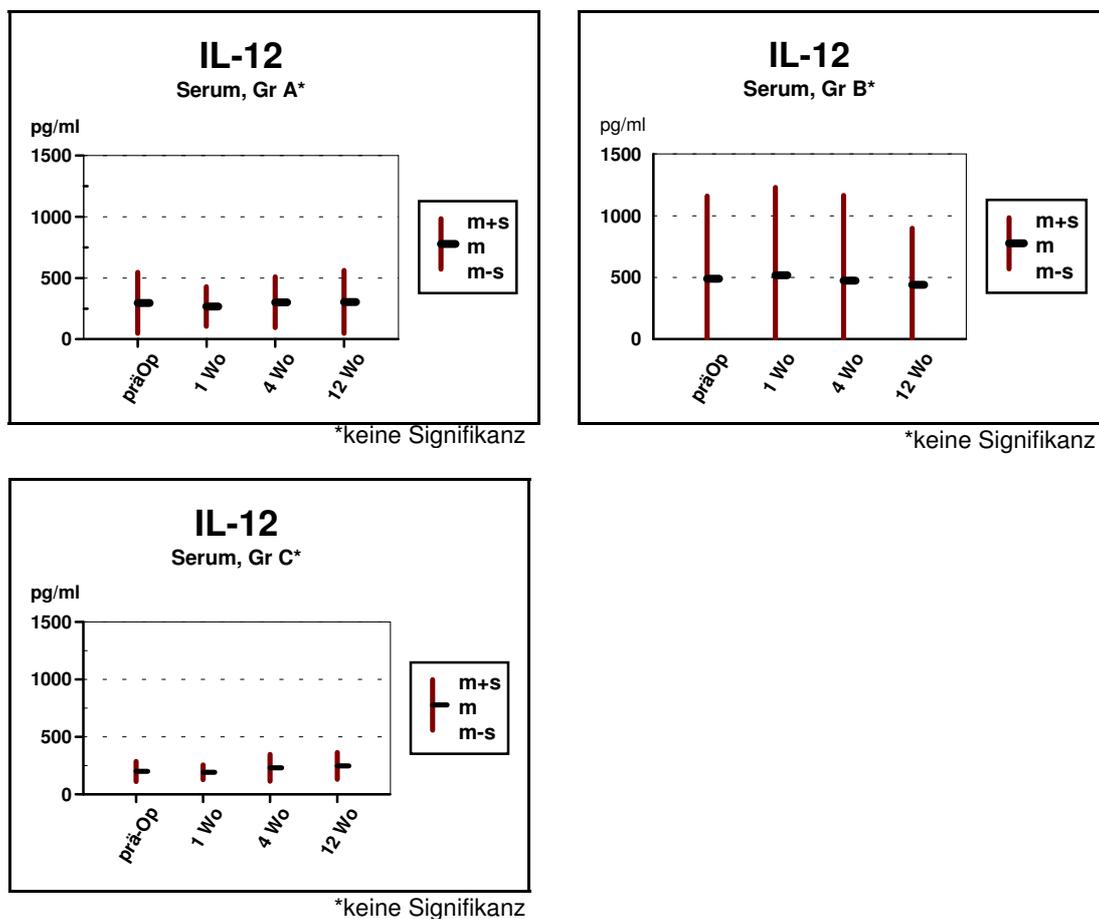
*TABELLE 3-1: ABSOLUTE HÄUFIGKEITEN VON POSITIVEN TESTERGEBNISSEN (P = POSITIV GETESTETE/ G = GESAMTHEIT), M = MITTELWERTE UND ZUGEHÖRIGE S = STANDARDABWEICHUNGEN DER SERUMKONZENTRATIONEN DER ZYTOKINE IL-12, TNF- $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-13 IM VERLAUF; GR A = APROTININ UND FIBRINKLEBER, GR B = APROTININ, GR C = FIBRINKLEBER; KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ*

		$\Sigma$	Gruppe A				Gruppe B				Gruppe C			
			präOp	1 Wo	4 Wo	12 Wo	präOp	1 Wo	4 Wo	12 Wo	präOp	1 Wo	4 Wo	12 Wo
	G	45	16	14	16	16	14	15	16	16	15	14	13	16
<b>IL-12</b> GW 300	P	10	4	4	5	4	4	7	7	8	2	2	2	6
	M	325	297	268	302	305	490	519	475	442	200	194	231	248
	S	423	250	162	208	258	671	710	689	456	88	64	117	117
<b>TNF-<math>\beta</math></b> GW 100	P	18	7	9	7	5	6	9	10	6	5	5	3	3
	M	259	355	289	267	250	214	181	159	154	198	145	153	132
	S	389	588	334	440	516	216	154	144	170	162	166	237	186
<b>IL-4</b> GW 40	P	12	6	5	4	3	4	5	4	4	2	0	0	0
	M	70	114	86	78	94	71	72	79	125	23	20	20	20
	S	167	254	128	183	225	106	111	147	291	8	0	0	0
<b>IL-5</b> GW 100	P	5	3	3	1	3	2	2	2	2	0	0	0	0
	M	73	75	82	60	85	93	96	114	220	53	50	50	50
	S	79	55	81	33	78	124	140	206	582	10	0	0	0
<b>IL-13</b> GW 100	P	23	5	4	4	4	8	9	9	7	10	5	5	5
	M	252	268	185	139	147	302	247	234	199	189	141	177	214
	S	278	352	175	140	228	287	304	340	235	132	130	252	211

Die Zytokinproduktion der einzelnen Gruppen zeigte im Verlauf der Untersuchung keine wesentlichen Veränderungen, ein Vergleich der Gruppen untereinander war ebenfalls unauffällig.  $\gamma$ -IFN wurde in keinem einzigen Fall beobachtet. Sowohl die

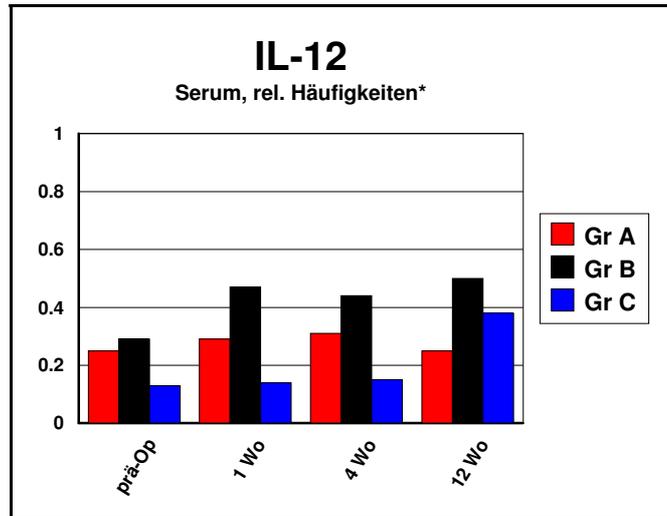
mittleren Konzentrationen, als auch die relativen Häufigkeiten der Produktion von TNF- $\beta$  war im Gruppenvergleich konstant. Ähnlich verhielten sich die Zytokine IL-4 und IL-5, wobei diese in der Gruppe C (Fibrinkleber, lokal) nicht sezerniert wurden. IL-13 wurde in der Gruppe B (Aprotinin, systemisch) insgesamt häufiger beobachtet als in den anderen Gruppen, im Verlauf war aber auch hier keine signifikante Veränderung zu erkennen. Die Expression von IL-12 in der Gruppe B war verglichen mit den anderen Gruppen höher, der Verlauf der Zytokinsekretion in den jeweiligen Gruppen war jedoch konstant. Die Abbildungen 3-11 und 3-12 zeigen am Beispiel von IL-12 das Verhalten der Zytokinsekretion in den Seren. Abbildung 3-11 verdeutlicht die mittleren Konzentrationen und die Standardabweichungen während der Untersuchung. In Abbildung 3-12 sind die relativen Häufigkeiten der IL-12 Expression im Beobachtungsintervall dargestellt.

ABBILDUNG 3-11: MITTLERE SERUMKONZENTRATIONEN AM BEISPIEL VON IL-12 IN DEN DREI GRUPPEN ÜBER DEN BEOBACHTUNGSZEITRAUM VON 12 WOCHEN



Ergebnisse

ABBILDUNG 3-12: PROZENTUALE HÄUFIGKEITEN VON IL-12 IM SERUM WÄHREND DER THERAPIE IN RELATION ZU DEN DREI PATIENTENGRUPPEN



\*keine Signifikanz

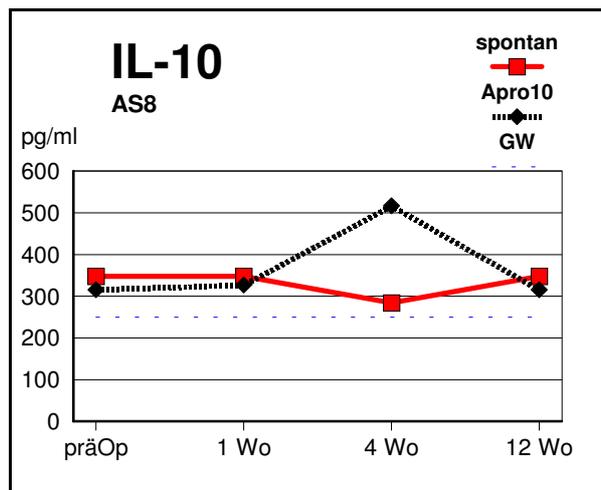
### 3.3. Beispiele für Zytokinausschüttung in Aprotininstimulierten Lymphozytenkulturen (ausgewählte Patienten)

Einige im Verlauf der Beobachtung auffällige und interessante Ergebnisse der Zytokinbestimmung mittels ELISA wurden mit Hilfe der PCR auf ihre Richtigkeit nochmals überprüft.

#### 3.3.1. IL10 im Behandlungsverlauf in ELISA und PCR

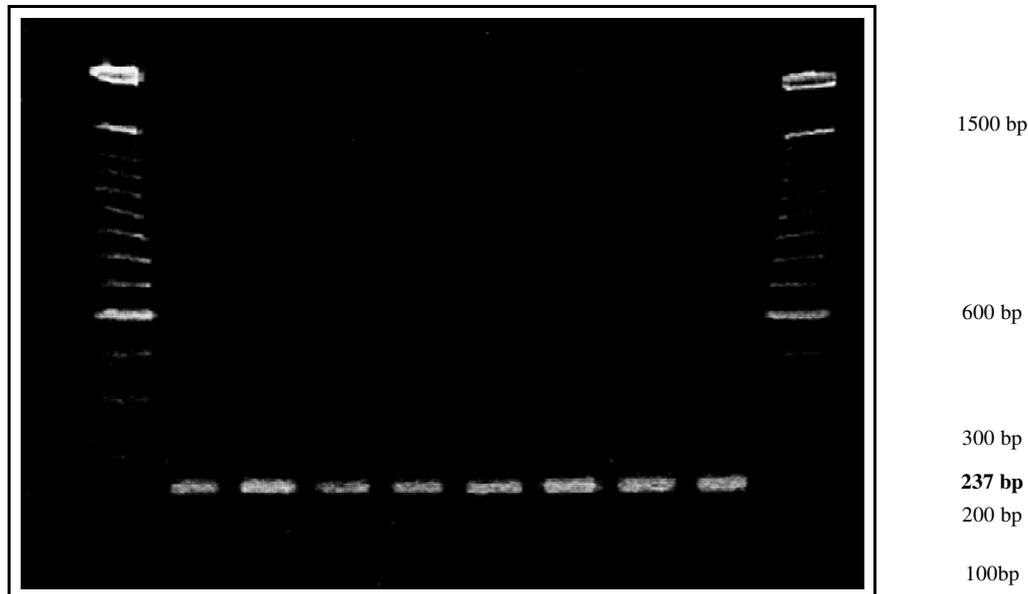
Es zeigte sich, daß IL-10 bei einigen Patienten sowohl spontan als auch unter Aprotininstimulation über den gesamten Beobachtungszeitraum annähernd gleich stark sezerniert wird. Dies läßt sich z.B. beim Pat.AS8 darstellen. Die gemessenen Konzentrationen im ELISA waren beim Leerwert konstant gleichbleibend, bei der Stimulation mit Aprotinin 10µg/ml zeigte sich in der 4 Woche eine erhöhte Sekretion (siehe Abbildung 3-13a). Die entsprechende PCR zeigte beim Leerwert und bei Aprotinin 10µg/ml Ergebnisse, die mit den Daten im ELISA vergleichbar waren (siehe Abbildung 3-13b).

ABBILDUNG 3-13A: VERLAUF DER IL-10 KONZENTRATION WÄHREND DES UNTERSUCHUNGSZEITRAUMS BEI SPONTANER PROLIFERATION UND UNTER STIMULATION MIT APROTININ 10 µG/ML BEI PAT. AS8. GW = GRENZWERT: IL-10 250PG/ML



## Ergebnisse

ABBILDUNG 3-13B: PCR BILD FÜR IL-10 ( FRAGMENTGRÖSSE 237 BP) BEI SPONTANER PROLIFERATION UND UNTER STIMULATION MIT APROTININ 10µg/ML WÄHREND DES UNTERSUCHUNGSZEITRAUMES BEI PAT AS8 ; P =DNA-LADDER



P präOp 1Wo 4Wo 12Wo präOp 1Wo 4Wo 12Wo P  
spontan Aprotinin 10µg/ml

### 3.3.2. präoperativ nachweisbare Unterschiede in der Zytokinausschüttung

Die PCR-Daten zeigten aber auch, daß bei einem negativen ELISA-Test die Expression der Zytokin mRNA in der PCR durchaus nachweisbar sein kann. Beim Pat. K7 war präoperativ in allen Konzentrationsstufen kein IL-5 mittels ELISA nachweisbar (nicht dargestellt). Die PCR zeigte beim Leerwert und bei Aprotinin 10µg/ml eine schwache aber eindeutige Bande. Im ELISA wurden die Zytokine  $\gamma$ -IFN und GM-CSF bei Aprotinin 1µg/ml am stärksten ausgeschüttet, dies läßt sich auch in der entsprechenden PCR beobachten (siehe Abbildung 3-14a und b).

ABBILDUNG 3-14A: PRÄOPERATIVE PRODUKTION VON  $\gamma$ -IFN UND GM-CSF IM ELISA BEI PAT. K7; GRENZWERTE:  $\gamma$ -IFN 200 pg/ml, GM-CSF 50 pg/ml, AP = APROTININ MIT JEWEILIGER KONZENTRATION IN  $\mu$ g/ml

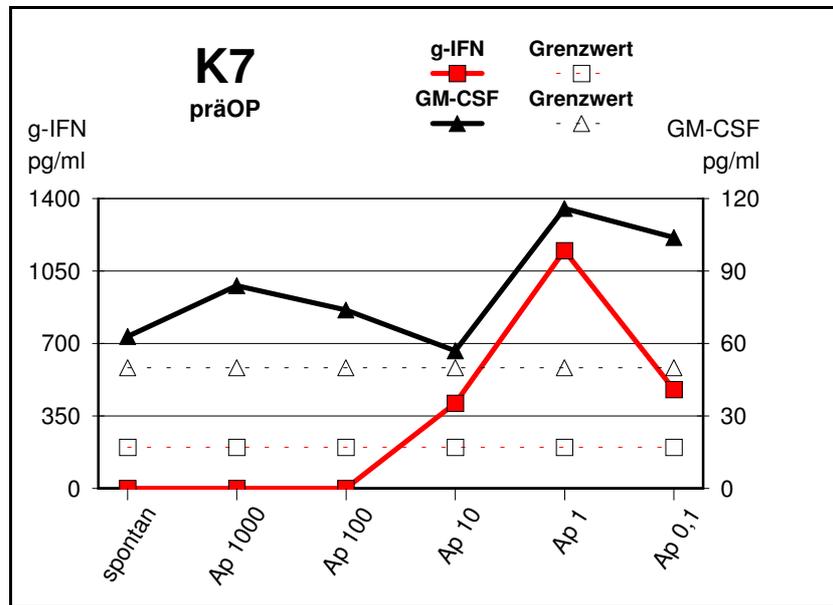
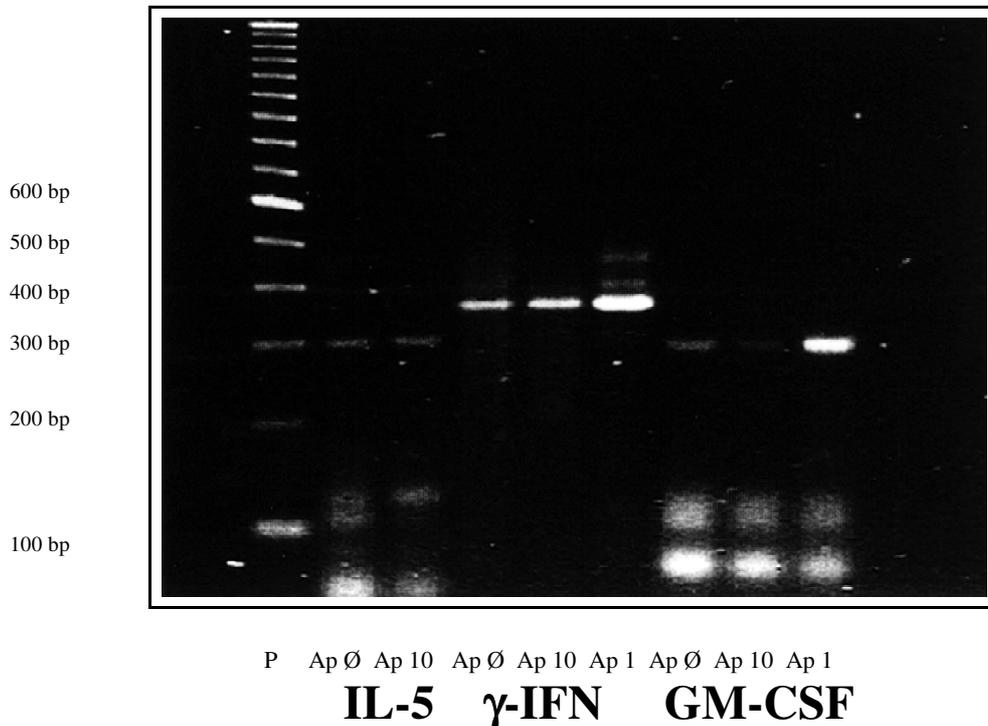


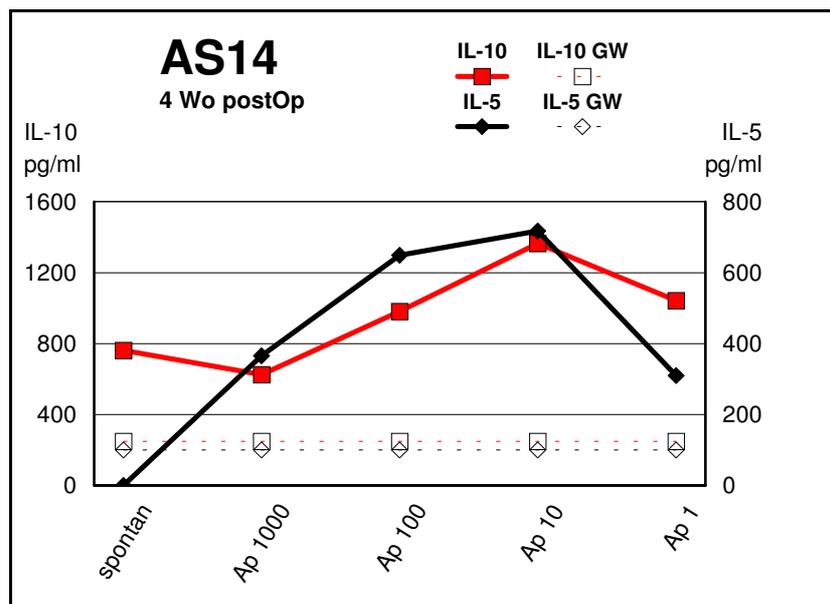
ABBILDUNG 3-14B: PRÄOPERATIVE PCR FÜR IL-5 ( FG 293 BP),  $\gamma$ -IFN ( FG 356 BP) UND GM-CSF ( FG 286 BP) BEI PAT. K7. LEICHTE SPONTANE UND STIMULIERTE SEKRETION VON IL-5. ENTSPRECHEND DEN ERGEBNISSEN IM ELISA-TEST EINDEUTIG STARKE PRODUKTION VON  $\gamma$ -IFN UND GM-CSF AUCH IN DER PCR BEI APROTININSTUFE 1  $\mu$ g/ml. P = DNA-LADDER, AP  $\emptyset$  = SPONTAN, AP 1 = APROTININ 1  $\mu$ g/ml, AP 10 = APROTININ 10  $\mu$ g/ml.



### 3.3.3. postoperativ nachweisbare Unterschiede zwischen ELISA und PCR

Die Ergebnisse der PCR des Pat. AS14 vier Wochen postoperativ waren mit den ELISA-Messungen vergleichbar. IL-10 ließ sich in beiden Testen in großer Menge nachweisen. IL-5 war in der PCR wie zu erwarten bei den Konzentrationsstufen 100µg/ml und 10µg/ml zu erkennen. Gegensätzliche Ergebnisse zeigten beide Tests beim Leerwert und bei Aprotinin 1000µg/ml. Beim Leerwert ließ sich IL-5 im ELISA nicht nachweisen, dafür war die PCR positiv. Die starke Produktion von GM-CSF im ELISA bei Aprotinin 1000µg/ml ließ sich in der PCR nicht verifizieren (siehe Abbildung 3-15a, b und c).

ABBILDUNG 3-15A: *IL-10 UND IL-5 PRODUKTION BEI PAT. AS 14 GEMESSEN 4 WOCHEN NACH EXPOSITION IM ELISA-TEST. GW = GRENZWERTE: IL-10 250PG/ML, IL-5 100PG/ML. AP = APROTININ MIT JEWEILIGER KONZENTRATION IN µG/ML*



Ergebnisse

ABBILDUNG 3-15B: GM-CSF PRODUKTION BEI PAT. AS 14 GEMESSEN 4 WOCHEN NACH EXPOSITION IM ELISA-TEST. GW = GRENZWERTE: GM-CSF 50pg/ML. AP = APROTININ MIT JEWEILIGER KONZENTRATION IN  $\mu\text{g}/\text{ML}$

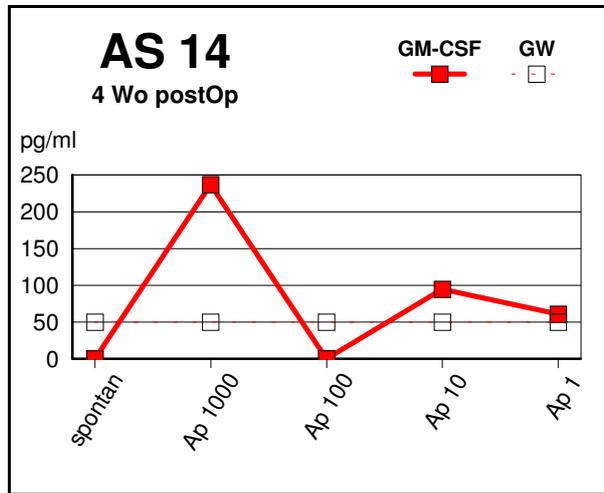
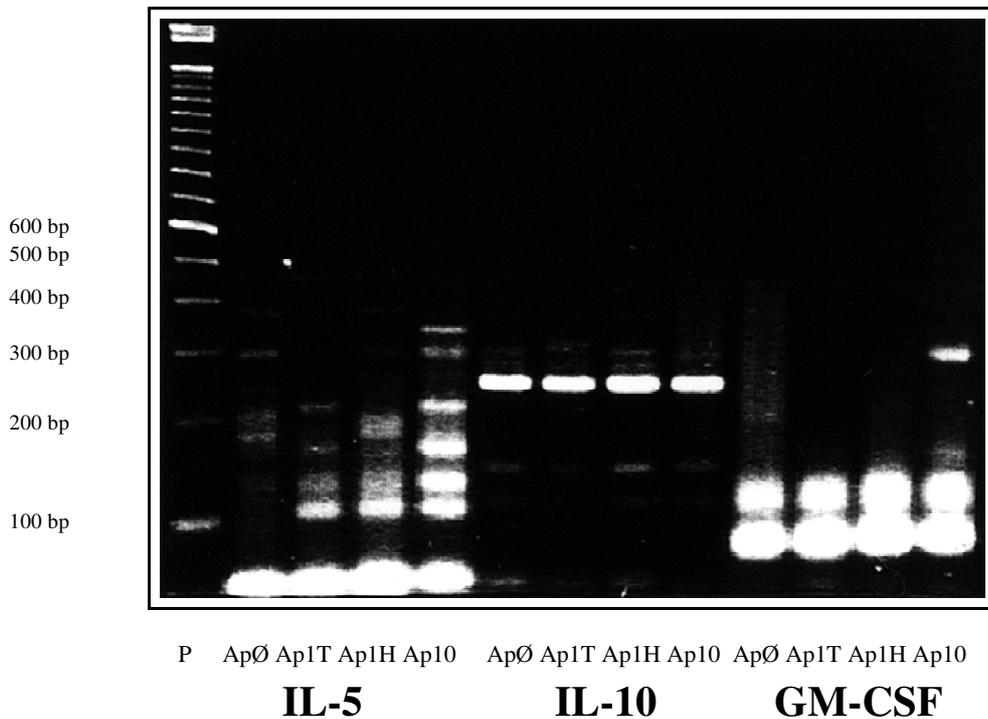


ABBILDUNG 3-15C: PCR BEI PAT. AS 14 4 WOCHEN NACH APROTININEXPOSITION FÜR DIE ZYTOKINE IL-5 (FG 293 BP), IL-10 (FG 237 BP) UND GM-CSF (FG 286 BP). IL-5 WURDE BEI APROTININ  $10\mu\text{g}/\text{ML}$  DEUTLICH UND IM LEERWERT DEZENT PRODUZIERT. IL-10 LIESS SICH IN ALLEN STUFEN STARK NACHWEISEN. GM-CSF WURDE NUR BEI APROTININ  $10\mu\text{g}/\text{ML}$ , ABER NICHT BEI APROTININ  $1000\mu\text{g}/\text{ML}$  NACHGEWIESEN. Ap $\emptyset$  = SPONTAN, AP = APROTININ, P = DNA-LADDER



Ergebnisse

ABBILDUNG 3-16A: GM-CSF (FG 286 BP) PCR IN DER 4. POSTOPERATIVEN WOCHE BEI PAT. FL 16. NACHWEIS VON GM-CSF PRODUKTION NUR BEI APROTININ 100µG/ML. AP Ø = SPONTAN AP = APROTININ, P = DNA-LADDER

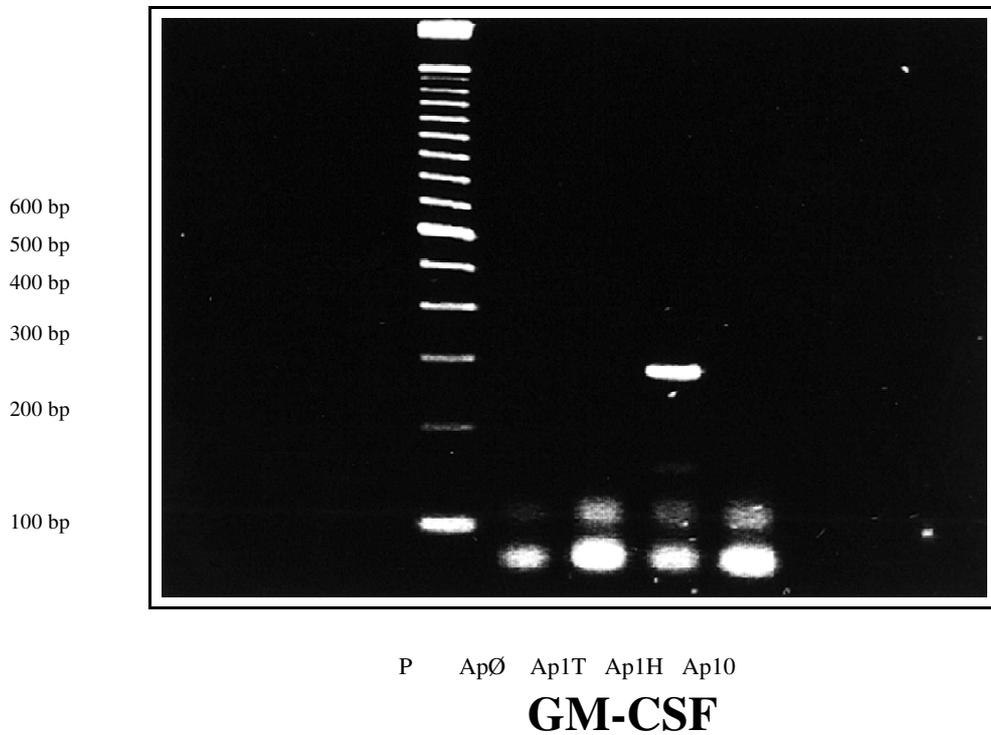
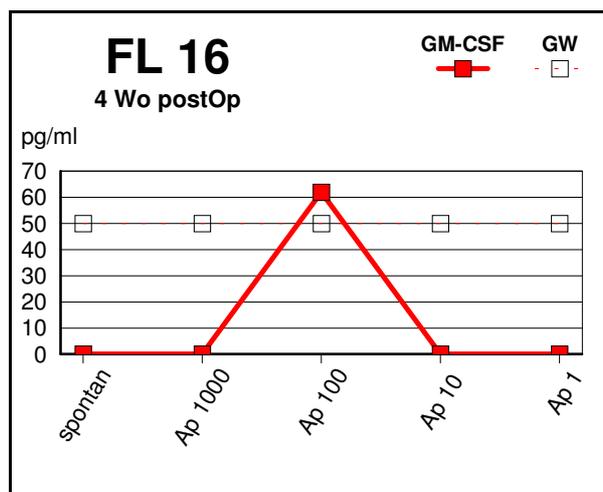


ABBILDUNG 3-16B: GM-CSF ELISA BEI PAT. FL 16 IN DER 4. POSTOPERATIVEN WOCHE. SEKRETION VON GM-CSF NUR BEI APROTININ 100µG/ML. GW = GRENZWERT 50PG/ML, AP = APROTININ MIT JEWEILIGER KONZENTRATIONSTUFE IN µG/ML



Pat. FL16 zeigte vier Wochen postoperativ im ELISA bei Aprotinin 100µg/ml nur eine mäßige GM-CSF-Sekretion von 62pg/ml bei einem Grenzwert von 50pg/ml (Abbildung 3-16b). Die entsprechende PCR bestätigte das Ergebnis im ELISA-Test; nur bei Aprotinin 100µg/ml ist eine Bande zu erkennen (siehe Abbildung 3-16a).

### **3.4. Klinische Manifestation bei den untersuchten Patienten**

In den drei Patientengruppen ist in dem Beobachtungszeitraum keine nennenswerte unerwünschte Reaktion aufgetreten. Das gleichzeitig durchgeführte Routinelabor, insbesondere Differentialblutbild, Elektrophorese und Entzündungsparameter, waren ebenfalls weitgehend unauffällig.

Diese Daten und vor allem die Messung der Aprotinin-spezifischen IgE und IgG sind in einer parallel laufenden Untersuchung im gleichen Patientenkollektiv erhoben worden. Eine IgE-Sekretion ist auch in unserem Beobachtungsintervall nicht zu beobachten (persönliche Mitteilung, H. Stauder).

### **3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse**

#### **3.5.1. Lymphozytenproliferation nach Aprotininstimulation im LTT**

Die Ergebnisse zeigen, daß Aprotinin nach einmaliger systemischer, lokaler oder kombinierter Verabreichung zur Sensibilisierung des Immunsystems führt. In allen Gruppen steigt die Stimulierbarkeit ab der 4 Woche nach Exposition deutlich an, besonders aber in Gruppe B (systemische Anwendung). Wird berücksichtigt, daß sowohl die Gruppen mit systemischer und kombinierter Anwendung schon präoperativ jeweils zwei positive Ergebnisse zeigten, so ist die Stimulierbarkeit in Gruppe B (systemische Anwendung) 12 Wochen nach Exposition am häufigsten. Die zwei anderen Gruppen zeigen dann keinen Unterschied.

### 3.5.2. Zytokinmessung in Aprotinin-stimulierten Zellkulturen im ELISA

Die in der Arbeit bestimmten Zytokine können „grob“ verschiedenen Zelltypen des Immunsystems zugeordnet werden.  $\gamma$ -IFN wird von Typ1-T-Lymphozyten, IL-4, IL-5 und IL-10 von Typ2-T-Lymphozyten, GM-CSF von allen T-Zellen sezerniert. Die Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  werden hauptsächlich von Makrophagen und ihren Vorläuferzellen den Monozyten produziert und sezerniert.

GM-CSF, das von fast allen T-Zellen gebildet wird und die Bildung von Granulozyten, Makrophagen sowie dendritischen Zellen bewirkt, wird in den untersuchten Kulturen der Gruppe C (lokale Applikation) vor Aprotininexposition gar nicht und im weiteren Verlauf nur in wenigen Fällen gebildet. In Gruppe A (kombinierte Applikation) sinkt die Produktion von GM-CSF, wohingegen sie in Gruppe B (systemische Applikation) danach leicht ansteigt.

$\gamma$ -IFN, ein Zytokin, das vorwiegend von Typ1-T-Zellen sezerniert wird, ist vor Exposition in Gruppe A (kombinierte Applikation) am häufigsten zu finden. Während postoperativ sich die Häufigkeit in dieser Gruppe deutlich verringert, zeigen die beiden anderen Gruppen einen Anstieg der  $\gamma$ -IFN-Expression.

Die Zytokine der Typ2-T-Lymphozyten IL-4, IL-5 und IL-10 zeigen einige Besonderheiten. IL-5, das Wachstum und Differenzierung von Eosinophilen induziert, wird nach Aprotininexposition in den Gruppen A und B (kombinierte und systemische Applikation) seltener und in geringeren Mengen gebildet. Auffällig ist weiterhin, daß IL-10 in allen drei Gruppen und im gesamten Untersuchungszeitraum sehr häufig nachgewiesen werden konnte. IL-10 hemmt die Typ1-T-Zellen, steigert die MHC-Klasse-II Expression der B-Zellen und inhibiert die Makrophagenfunktion und Zytokinfreisetzung aus Makrophagen.

IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  sind Zytokine, die vorwiegend von Makrophagen/Monozyten produziert werden. Sie zeigen in den untersuchten Kulturen präoperativ vergleichbare Häufigkeiten in der Zytokinexpression.

Auffallend ist, daß IL-6 weit häufiger als alle anderen Zytokine in den Aprotinin-stimulierten Lymphozytenkulturen nachgewiesen wurde. In Gruppe C (lokale Applikation) verringert sich nach 12 Wochen die IL-6-Expression, alle anderen

Untersuchungen zeigen weitgehend konstante Ergebnisse. Das IL-6 hat ein breites Wirkspektrum, das sich zum Teil mit IL-1 und TNF- $\alpha$  überlappt. Es wirkt auf T-Zellen co-mitogen und unterstützt die Bildung von CTL. In naiven B-Zellen wird durch dieses Zytokin keine Proliferation induziert, doch auf bereits durch T-Helferzellen aktivierte B-Zellen wirkt es zusammen mit anderen Zytokinen wie IL-2 und IL-4 als Wachstums- und Differenzierungsfaktor und erhöht die IgM Produktion. In Kombination mit IL-1 und TNF- $\alpha$  induziert IL-6 den Entzündungsprozess mit Bildung von Akute-Phase-Proteinen.

### **3.5.3. Zytokinbestimmung in Patientenseren mittels ELISA**

Die aus den Patientenseren bestimmten Typ1- bzw. Typ2-relevanten Zytokine  $\gamma$ -IFN, IL-12, TNF- $\beta$  bzw. IL-4, IL-5, IL-13 zeigen einen vergleichsweise unverändert konstanten Verlauf ihrer mittleren Konzentrationsspiegel und ihrer Expressionshäufigkeiten während des Beobachtungszeitraumes.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. testspezifische Besonderheiten der eingesetzten Methoden

#### 4.1.1. Lymphozytentransformationstest

Der Lymphozytentransformations-, -proliferations- oder -stimulationstest wird seit vielen Jahren in der Diagnostik arzneimittelbedingter allergischer Nebenwirkungsreaktionen eingesetzt. Grundsätzlich wird die Proliferation von Lymphozyten nach Inkubation mit einem Antigen gemessen. Der Test erfaßt somit die Induktion und eventuell die Regulation einer durch bereits aktivierte T-Lymphozyten vermittelten Immunreaktion.

Entscheidende Einflußgröße auf das Ergebnis ist die eingesetzte Zellzahl in den Kulturen. Die im LTT verwendete Zellmenge von  $3 \times 10^6$  pro Kultur liegt im oberen Bereich der in der Literatur beschriebenen und verwendeten Zellzahlen zwischen  $2,5 \times 10^4$  und  $3 \times 10^6$  [32,48]. Damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit sensibilisierte, spezifische Lymphozyten in den Zellkulturen anzutreffen. Hieraus ergibt sich aber die Notwendigkeit an größeren Blutvolumina von ca. 40ml Vollblut, um die benötigten Zellzahlen zu gewinnen.

Der Stimulationsindex SI (siehe auch Kap.2.3.2.), berechnet als das Verhältnis aus den cpm (Counts per minute) der Kulturen mit Antigen / cpm aus den Kultur ohne Antigen, wobei die Median aus den mehrfach angesetzten Kulturen verwendet wurde, ist mit  $SI > 3$  als schwach und  $SI > 6$  als stark positiv definiert. In der Literatur werden ebenfalls meist Werte ab  $SI > 1,5$  und  $SI > 4$  als positiv definiert [10,67,92].

Der LTT kann erhebliche Variabilität zeigen, die zum einen auf fehlende Norm- bzw. Schwellenwerte und zum anderen auf die Problematik in der Interpretation der Resultate, die eine erhebliche Erfahrung erfordert, zurück zu führen ist.

Ursachen für falsch-negative Ergebnisse sind in technischen Fehlern, zu geringer Zellzahl, zu hoher oder zu niedriger Antigenkonzentration, in einem falschen Zeitpunkt der Testung (zu früh oder zu spät nach Exposition), einer ungenügenden Antigenpräsentation oder dem Vorliegen des Antigens als Hapten zu suchen.

Falsch-positive Ergebnisse können unter laufender Arzneimitteltherapie, durch direkte pharmakologische Wirkung eines Medikaments auf die Lymphozyten oder aufgrund einer polyklonalen Aktivierung von T-Zellen in der akuten Phase einer Immunreaktion zustande kommen.

#### **4.1.2. Methoden zur Bestimmung von Zytokinen**

Eine genaue und spezifische Methode zur Bestimmung von Zytokinen in den Überständen in Lymphozytenkulturen ist der Sandwich-ELISA (oder auch capture-ELISA). Dabei werden unmarkierte Anti-Zytokin-Antikörper auf einen Kunststoffträger fixiert, anschließend mit den Zytokin-haltigen Überständen der Kulturen inkubiert. Nach einem Waschschrift läßt sich durch Zugabe eines zweiten, markierten Anti-Zytokin-Antikörper, der gegen ein anderes Epitop gerichtet ist, das Zytokin nachweisen. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Anti-Zytokin-Antikörpern ist der Test hochspezifisch, da Antigene (hier Zytokine), die mit einem bestimmten Antikörper reagieren, mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auch noch an einen zweiten binden. Somit lassen sich mit diesem Test Zytokine mit hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit quantifizieren.

Mit der verwendeten ELISA-Methode werden Zytokine bestimmt, die während der gesamten Inkubationszeit der Lymphozytenkulturen produziert und in die Überstände sezerniert wurden und bis zur Auswertung nicht wieder abgebaut wurden.

Ein anderes Verfahren zum Nachweis von Zytokinen ist die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR-Polymerase Chain Reaction), die die intrazelluläre Zytokin-mRNA identifiziert. Nach Präparation der mRNA aus antigenstimulierten T-Zellen, wird diese zunächst mittels Reverse-Transkriptase in entsprechende cDNA umgeschrieben. Unter Verwendung zytokinspezifischer Primer läßt sich die cDNA in der PCR amplifizieren. Man spricht von RT PCR.

Diese Methode ermöglicht die exponentielle und selektive Amplifikation von kleinsten Mengen spezifischer DNA-Sequenzen.

Die Menge an gebildeter DNA ist proportional zum Anteil der mRNA in den Zellen, die am Ende der Inkubationszeit der Lymphozytenkulturen eine Zytokin-mRNA-Expression zeigen. Nachweis von Zytokin-mRNA, die zum früheren Zeitpunkt der Inkubation produziert wurden, ist durch den raschen Abbau der intrazellulären mRNA nicht möglich.

#### **4.2. Bedeutung unterschiedlicher Applikationsformen**

Systemisch verabreichtes Aprotinin erreicht nach einmaliger Gabe alle immunkompetenten Organe. Folglich kann es von vielen antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und an naive T-Zellen präsentiert werden. Wegen seiner kurzen Halbwertszeit von 2,5 Std. ist einmalig, systemisch verabreichtes Aprotinin dem Immunsystem zwar nur kurzzeitig präsent, es ist aber nicht unwahrscheinlich, daß es von Makrophagen gespeichert wird..

Die im Vergleich zur lokal angewendeten Menge, die weniger als 3 ‰ der systemischen Menge beträgt, hohe systemische intravenöse Dosis, ist nach rascher Verteilung im System geringer als die lokale Aprotininmenge. Aprotinin als Bestandteil von Zwei-Komponenten-Fibrinklebern stabilisiert das Fibrinklebergerinsel bis zu 4 Wochen. Es ist anzunehmen, daß nur kleine Mengen des lokal applizierten Aprotinin ins System gelangen, so daß die lokale Konzentration letztendlich um das 10-15fache über der systemisch erreichten Konzentration liegt.

Diese unterschiedlichen Applikationsformen des Aprotinin könnten das Immunsystem in verschiedener Weise aktivieren. Die kurzzeitige, einmalige systemische Aprotininexposition führt zu einem Kontakt mit einer Vielzahl von an der Immunantwort beteiligten Zellen in verschiedenen lymphatischen Organen z.B. dendritischen Zellen, B-Lymphozyten, Makrophagen. Die lokale Applikation mit daraus resultierendem, über Wochen dauerndem Kontakt aktiviert dagegen nur einige wenige immunkompetente Zellen, die den Wundbereich infiltrieren, sowie die APC.

Kommt es zur Aktivierung des Immunsystems, so ist davon auszugehen, daß die unterschiedlichen Bedingungen im Mikromilieu, in der Aprotininmenge und Zeit der

Exposition entscheidende Einflußfaktoren auf die Differenzierung einer naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zelle zur Typ1- oder Typ2-Zelle sind.

### **4.3. Modulation der Effektormechanismen systemischer Entzündungsreaktionen**

Der in den letzten Jahren vielfach beschriebene Effekt von Aprotinin auf systemische Entzündungsreaktionen bei kardiopulmonalen Operationen in der Herz-Thorax-Chirurgie, insbesondere die Modulation der pro- und antiinflammatorischen Reaktionen bzw. die Hemmung einer systemischer Entzündungsreaktion, ließ sich anhand der durchgeführten Tests nicht verifizieren (siehe Kap. 1.0.4) [36, 45,52,80].

Es ist aber an den erhobenen Daten zu beobachten, daß neben dem proinflammatorischen Zytokin IL-6 das antiinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10 in den mit Aprotinin inkubierten Lymphozytenkulturen häufig sezerniert wird (siehe Abb. 3-2).

In Studien konnte gezeigt werden, daß die Prognosewertigkeit bei septischen Patienten höher lag, wenn man nicht die Plasmaspiegel der einzelnen anti- oder proinflammatorischen Zytokine (IL-10 versus TNF- $\alpha$  bzw. IL-6) betrachtete, sondern wenn ihr Verhältnis im Plasma zu Grunde gelegt wurde [19,83,90]. Der Effekt von Aprotinin auf die systemische Entzündungsreaktion wurde in einigen Studien, mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen, untersucht; es ist zu empfehlen, nicht nur die einzelnen pro- und antiinflammatorischen Marker zu untersuchen, sondern auch das Verhältnis insbesondere von IL-10 zu TNF- $\alpha$  und IL-10 zu IL-6 [83]. Berücksichtigt man das Netzwerk, über das Zytokine wirken, ist es insgesamt aber sinnvoller Zytokinprofile zu bestimmen.

Ein weiterer negativ prognostischer Parameter in septischen oder operierten Patienten scheint eine verminderte HLA-DR-Expression und Zytokinproduktionskapazität in zirkulierenden Immunzellen trotz deutlich erhöhter Zytokinplasmaspiegel zu sein. Es konnte gezeigt werden, daß die Produktionskapazität von Monozyten für IL-1 und IL-8 u.a. bei operierten Patienten mit der Schwere der Erkrankung korrelierte, und ein

Anstieg der Kapazität auf eine Besserung des klinischen Bildes mit guter Prognose hinweist [25,65].

#### **4.4. Aktivierung des Immunsystems**

Aprotinin ist ein Fremdartigen (siehe Kap. 1.0.1.), gegen das eine Immunreaktion zu erwarten ist. Die bereits nachgewiesenen spezifischen Antikörper (s. Kap. 1.1.2.) und das in der Literatur beschriebene allergische Potential unterstreichen seinen Effekt auf das Immunsystem [24,75,76].

Im Hinblick auf die Aktivierung des Immunsystems zeigen die Ergebnisse nach einmaliger Aprotiniegabe im Lymphozytenproliferationstest, daß 4 und 12 Wochen nach Aprotininexposition in vitro eine eindeutig positive Stimulation in den drei Gruppen vorliegt (siehe Abb 3-1). Dieser zeitliche Verlauf spricht für die Aktivierung einer spezifische Immunantwort, da das adaptive Immunsystem etwa eine Woche bis zur Ausbildung spezifischer Zellen benötigt.

Anhand der Ergebnisse lassen sich keine signifikanten Unterschiede in Hinblick auf die Expositionsweise, lokal versus systemisch bzw. eventuelle synergistische Effekte bei kombinierter Applikation, feststellen.

In allen drei Gruppen findet nach einmaligem und erstmaligem Kontakt mit Aprotinin eine primäre Immunsensibilisierung statt.

Die Charakterisierung der Immunantwort anhand von Zytokinmustern aus den mit Aprotinin inkubierten Lymphozytenkulturen läßt keine Typisierung in Hinblick auf Typ1 bzw. Typ2 Reaktion zu. Es zeigen sich sowohl im Verlauf der Untersuchung als auch im Vergleich der drei Gruppen mit den unterschiedlichen Applikationsweisen von Aprotinin keine signifikanten Differenzen im Zytokinprofil.

Ein Hinweis auf Effektorreaktionen des Immunsystems läßt sich bei fehlender Steigerung der Zytokinproduktion daher nicht erkennen, was aber auch mit der klinischen Beobachtung übereinstimmt, daß bei der vorliegenden Studie die untersuchten Patienten nach der erstmaligen und einmaligen Aprotiniegabe keine unerwünschten Nebenwirkungen zeigten.

Wurden in Einzelfällen Zytokine induziert, so finden sich eher Typ2-Zytokinmuster, die die beschriebene Bereitschaft zu anaphylaktischen Reaktionen und IgE Antikörperproduktion erklären könnten. Desweiteren findet man in Einzelfällen gehäuft die Produktion von IL-6, ein Zytokin, das B-Zellen und Typ2 Reaktionen und somit die Antikörperproduktion induziert oder als ein inflammatorisches Zytokin seine Funktion hat. Eine weitere wichtige Rolle scheint das IL-6 in der Wundheilung zu spielen, wobei es die Wundheilung fördert. IL-10 wiederum hat einen regulierenden und inhibierenden Einfluß auf die Wundheilung bzw. -infiltration über seine Wirkung auf Neutrophile, Makrophagen und proinflammatorischen Zytokine, u.a. das IL-6 [28,69,82].

Die vorgelegten immunologischen Untersuchungen versuchen einen Beitrag zu liefern, Aprotinininduzierte Effekte in der Klinik zu interpretieren.

Positive Effekte scheinen in der Induktion und Modulation von antiinflammatorischen Reaktionen und in der Induktion von Faktoren, hier speziell das IL-6, die in die Prozesse der Wundheilung eingreifen und diese fördern, zu liegen.

Andererseits könnte Aprotinin in Einzelfällen Typ2-Reaktionen stimulieren und damit die Produktion Aprotininspezifischer Antikörper, die die „allergisierende“ Potenz dieser Substanz erklären könnte.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Das bovine Fremdartigen Aprotinin besitzt die Fähigkeit, das Immunsystem nach erst- und einmaligem Kontakt unabhängig vom Applikationsmodus zu aktivieren. Wie die Ergebnisse des LTT zeigen, ist in allen drei Gruppen nach einem Intervall von etwa vier Wochen das adaptive Immunsystem sensibilisiert. Unerwünschte, allergische Nebenwirkungen nach Reexposition sind somit erklärbar. Eine genaue Aussage über die zugrunde liegenden Mechanismen der Immunantwort läßt sich aber aus dem LTT nicht ableiten.

Eine eindeutige Zuordnung der Zytokinprofile zu einer Typ1- bzw. Typ2-Reaktion, und somit eine nähere Charakterisierung der Immunantwort, ließ sich bei den Patienten nicht treffen; in einzelnen Fällen kann man aber eine Tendenz zu Typ2-Reaktionen erkennen, wodurch ebenfalls die „allergisierende“ Potenz mitunter bis zu anaphylaktischen Reaktionen erklärt werden könnte.

Für weitere, nähere Analysen der Immunreaktion auf Aprotinin mittels der hier vorgestellten Teste (Lymphozytentransformationstest und Zytokinbestimmung aus Aprotinin-inkubierten Kulturen) ist es notwendig, Patienten mit mehrmaligem Aprotininkontakt in der Anamnese (ohne oder mit allergischen Nebenwirkungsreaktionen) zu untersuchen. Hier ist aufgrund des wiederholten Antigenkontaktes eventuell eine Zuordnung zu einem bestimmten Zytokinprofil zu erwarten.

Für die klinische Anwendung sind beide Teste vor allem in der perioperativen Routine, wegen des sehr großen Zeitaufwandes, nur eingeschränkt praktikabel, auch wenn der Sensibilisierungsnachweis im LTT eine Kontraindikation für die erneute Aprotinigungabe darstellen könnte.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A. (1996)  
Functional diversity of helper T lymphocytes  
*Nature*, 383, 787-793
  
2. Aloisi F., Ria F., Adorini L. (2000)  
Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes  
*Immunol Today*, 21, 141-147
  
3. Alving B.M., Weinstein M.J., Finlayson J.S., Menitove J.E., Fratantoni J.C. (1995)  
Fibrin sealant: summary of a conference on characteristics and clinical uses  
*Transfusion*, 35, 783-790
  
4. Anderer F.A., Hornle S. (1966)  
The disulfide linkages in kallikrein inactivator of bovine lung  
*J Biol Chem*, 241, 1568-1572
  
5. Arai K.I., Lee F., Miyajima A., Miyatake S., Arai N., Yokota T. (1990)  
Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses  
*Annu Rev Biochem*, 59, 783-836
  
6. Azzoni A.R., Kusnadi A.R., Miranda E.A., Nikolov Z.L. (2002)  
Recombinant aprotinin produced in transgenic corn seed: extraction and purification studies  
*Biotechnol Bioeng*, 80, 268-276
  
7. Baenkler H.W. (1989)  
Functional classification of allergic diseases  
*Fortschr Med*, 107, 463-466
  
8. Banchereau J., Steinman R.M. (1998)  
Dendritic cells and the control of immunity  
*Nature*, 392, 245-252

9. Bell D., Young J.W., Banchereau J. (1999)  
Dendritic cells  
Adv Immunol, 72, 255-324
10. Berg P.A., Becker E.W. (1995)  
The lymphocyte transformation test- a debated method for the evaluation of drug  
allergic hepatic injury  
J Hepatol, 22, 115-118
11. Berg P.A., Daniel P.T., Holzschuh J., Brattig N. (1988)  
Medikamentöse Allergien. Diagnose und Immunpathogenese  
Dtsch Med Wochenschr, 113, 65-73
12. Beuchelt H. (1963)  
Trasylol, ein Proteinase-Inhibitor, in Experiment und klinischer Anwendung.  
Med Chem, 7, 763-768
13. Biron C.A., Gazzinelli R.T. (1995)  
Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in  
regulating disease outcome  
Curr Opin Immunol, 7, 485-496
14. Blauhut B., Gross C., Necek S., Doran J.E., Spath P., Lundsgaard-Hansen P.  
(1991)  
Effects of high-dose aprotinin on blood loss, platelet function, fibrinolysis,  
complement, and renal function after cardiopulmonary bypass  
J Thorac Cardiovasc Surg, 101, 958-967
15. Brinkmann T., Korfer R., Wenzel H.R., Tschesche H., Kleesiek K. (1997)  
Strong crossreaction of human anti-aprotinin antibodies from heart transplant  
patient with [Arg15]aprotinin  
Immunopharmacology, 35, 221-228
16. Carter L.L., Dutton R.W. (1996)  
Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets  
Curr Opin Immunol, 8, 336-342
17. Constant S.L., Bottomly K. (1997)  
Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches  
Annu Rev Immunol, 15, 297-322

18. Davies D.R., Metzger H. (1983)  
Structural basis of antibody function  
*Annu Rev Immunol*, 1, 87-117
19. Day N.P., Hien T.T., Schollaardt T., Loc P.P., Chuong L.V., Chau T.T., Mai N.T.,  
Phu N.H., Sinh D.X., White N.J., Ho M. (1999)  
The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines  
in severe malaria  
*J Infect Dis*, 180, 1288-1297
20. de Weck A.L. (1984)  
Pathophysiologic mechanisms of allergic and pseudo-allergic reactions to foods,  
food additives and drugs  
*Ann Allergy*, 53, 583-586
21. Defraigne J.O., Pincemail J., Larbuisson R., Blaffart F., Limet R. (2000)  
Cytokine release and neutrophil activation are not prevented by heparin-coated  
circuits and aprotinin administration  
*Ann Thorac Surg*, 69, 1084-1091
22. Descotes J., Choquet-Kastylevsky G. (2001)  
Gell and Coombs's classification: is it still valid?  
*Toxicology*, 158, 43-49
23. Diehl S., Rincon M. (2002)  
The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation  
*Mol Immunol*, 39, 531-536
24. Dietrich W., Spath P., Ebell A., Richter J.A. (1997)  
Prevalence of anaphylactic reactions to aprotinin: analysis of two hundred  
forty-eight reexposures to aprotinin in heart operations  
*J Thorac Cardiovasc Surg*, 113, 194-201
25. Faist E., Storck M., Hultner L., Redl H., Ertel W., Walz A., Schildberg F.W.  
(1992)  
Functional analysis of monocyte activity through synthesis patterns of  
proinflammatory cytokines and neopterin in patients in surgical intensive care  
*Surgery*, 112, 562-572
26. Fritz H., Kruck J., Russe I., Liebich H.G. (1979)  
Immunofluorescence studies indicate that the basic trypsin-kallikrein-inhibitor of

bovine organs (Trasylol) originates from mast cells  
Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem, 360, 437-444

27. Fritz H., Wunderer G. (1983)  
Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs  
Arzneimittelforschung, 33, 479-494
  
28. Gallucci R.M., Simeonova P.P., Matheson J.M., Kommineni C., Guriel J.L., Sugawara T., Luster M.I. (2000)  
Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice  
FASEB J, 14, 2525-2531
  
29. Gause W.C., Halvorson M.J., Lu P., Greenwald R., Linsley P., Urban J.F., Finkelman F.D. (1997)  
The function of costimulatory molecules and the development of IL-4-producing T cells  
Immunol Today, 18, 115-120
  
30. Gold M.R., DeFranco A.L. (1994)  
Biochemistry of B lymphocyte activation  
Adv Immunol, 55, 221-295
  
31. Gulba D.C., Dechend R. (1994)  
Thrombolysis in thromboembolic diseases  
Ann Hematol, 69, S41-S57
  
32. Hahn C., Roseler S., Fritzsche R., Schneider R., Merk H.F. (1993)  
Allergic contact reaction to dexpanthenol: lymphocyte transformation test and evidence for microsomal-dependent metabolism of the allergen  
Contact Dermatitis, 28, 81-83
  
33. Hart D.N. (1997)  
Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response  
Blood, 90, 3245-3287

34. Haverich A., Walterbusch G., Borst H.G. (1981)  
The use of fibrin glue for sealing vascular prostheses of high porosity  
*Thorac Cardiovasc Surg*, 29, 252-254
35. Imrie C.W., Benjamin I.S., Ferguson J.C., McKay A.J., Mackenzie I., O'Neill J.,  
Blumgart L.H. (1978)  
A single-centre double-blind trial of Trasylol therapy in primary acute pancreatitis  
*Br J Surg*, 65, 337-341
36. Isbir C.S., Dogan R., Demircin M., Yaylim I., Pasaoglu I. (2001)  
Aprotinin reduces the IL-8 after coronary artery bypass grafting  
*Cardiovasc Surg*, 9, 403-406
37. Janeway C.A. and Travers P. (1997)  
Immunologie.  
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. Aufl.
38. Kassell B. (1970)  
Naturally occurring activators and inhibitors: Bovine trypsin-kallikrein inhibitor  
(Kunitz inhibitor, basic pancreatic trypsin inhibitor, polyvalent inhibitor from  
bovine organs).  
*Methods Enzymol*, 19, 844-852
39. Kassell B., Laskowski M.Sr (1965)  
The basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. V. The disulfide linkages  
*Biochem Biophys Res Commun*, 20, 463-468
40. Kaufmann S.H. (1993)  
Immunity to intracellular bacteria  
*Annu Rev Immunol*, 11, 129-163
41. Kelso A. (1998)  
Cytokines: principles and prospects  
*Immunol Cell Biol*, 76, 300-317
42. Kraut H., Frey E.K., Werle E. (1930)  
Über die Inaktivierung des Kallikreins  
*Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 192, 1-21
43. Kunitz M., Northrop J.H. (1936)  
Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor,

and an inhibitor trypsin compound  
J Gen Physiol, 19, 991-1007

44. Lambrecht B.N. (2001)  
Allergen uptake and presentation by dendritic cells  
Curr Opin Allergy Clin Immunol, 1, 51-59
  
45. Landis R.C., Asimakopoulos G., Poullis M., Thompson R., Nourshargh S.,  
Haskard D.O., Taylor K.M. (2001)  
Effect of aprotinin (trasylol) on the inflammatory and thrombotic complications of  
conventional cardiopulmonary bypass surgery  
Heart Surg Forum, 4 Suppl 1, S35-S39
  
46. Langman M.J., Weil J., Wainwright P., Lawson D.H., Rawlins M.D., Logan R.F.,  
Murphy M., Vessey M.P., Colin-Jones D.G. (1994)  
Risks of bleeding peptic ulcer associated with individual non-steroidal  
anti-inflammatory drugs  
Lancet, 343, 1075-1078
  
47. Laubenthal H., Hugler P. (1998)  
Überempfindlichkeitsreaktionen  
Internist, 39, 171-178
  
48. Lauerma A.I., Rasanen L., Reunala T., Reitamo S. (1990)  
Langerhans cells but not monocytes are capable of antigen presentation in vitro in  
corticosteroid contact hypersensitivity  
Br J Dermatol, 123, 699-705
  
49. Levy J.H., Pifarre R., Schaff H.V., Horrow J.C., Albus R., Spiess B., Rosengart  
T.K., Murray J., Clark R.E., Smith P. (1995)  
A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of aprotinin for reducing  
blood loss and the requirement for donor-blood transfusion in patients undergoing  
repeat coronary artery bypass grafting  
Circulation, 92, 2236-2244
  
50. Marcel R.J., Stegall W.C., Suit C.T., Arnold J.C., Vera R.L., Ramsay M.A.,  
O'Donnell M.B., Swygart T.H., Hein H.A., Whitten C.W. (1996)  
Continuous small-dose aprotinin controls fibrinolysis during orthotopic liver  
transplantation  
Anesth Analg, 82, 1122-1125

51. Mehlich A., Beckmann J., Wenzel H.R., Tschesche H. (1989)  
Semisynthetic aprotinin derivatives with specific alterations at the reactive-site peptide bond can be used to study structure-function relationships  
*Biochim Biophys Acta*, 996, 23-29
52. Mojcić C.F., Levy J.H. (2001)  
Aprotinin and the systemic inflammatory response after cardiopulmonary bypass  
*Ann Thorac Surg*, 71, 745-754
53. Molenaar I.Q., Begliomini B., Grazi G.L., Ringers J., Terpstra O.T., Porte R.J. (2001)  
The effect of aprotinin on renal function in orthotopic liver transplantation  
*Transplantation*, 71, 247-252
54. Mosmann T.R., Sad S. (1996)  
The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more  
*Immunol Today*, 17, 138-146
55. O'Rourke L., Tooze R., Fearon D.T. (1997)  
Co-receptors of B lymphocytes  
*Curr Opin Immunol*, 9, 324-329
56. Oliveira S.C., Harms J.S., Rech E.L., Rodarte R.S., Bocca A.L., Goes A.M., Splitter G.A. (1998)  
The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection  
*Braz J Med Biol Res*, 31, 77-84
57. Parker C.W. (1982)  
Allergic reactions in man  
*Pharmacol Rev*, 34, 85-104
58. Pearce E.J., Reiner S.L. (1995)  
Induction of Th2 responses in infectious diseases  
*Curr Opin Immunol*, 7, 497-504
59. Petersen K.U. (2002)  
From toxic precursors to safe drugs. Mechanisms and relevance of idiosyncratic drug reactions  
*Arzneimittelforschung*, 52, 423-429

60. Petz L.D., Mueller-Eckhardt C. (1992)  
Drug-induced immune hemolytic anemia  
*Transfusion*, 32, 202-204
61. Pfannschmidt J., Steeg D., Jugert F. (1995)  
Routine intraoperative application of high-dose aprotinin in open heart surgery in adults: antibody formation after first exposure  
*Curr Med Res Opin*, 13, 282-284
62. Putterman C. (1989)  
Aprotinin therapy in septic shock  
*Acta Chir Scand*, 155, 367
63. Reid S.D., Penna G., Adorini L. (2000)  
The control of T cell responses by dendritic cell subsets  
*Curr Opin Immunol*, 12, 114-121
64. Rieder M.J. (1993)  
Immunopharmacology and adverse drug reactions  
*J Clin Pharmacol*, 33, 316-323
65. Riese J., Denzel C., Mehler C., Zowe M., Hohenberger W., Haupt W. (2000)  
The diminished postoperative capacity of blood leukocytes to produce IL-6 is associated with high concentrations of IL-6 in the circulation  
*Cytokine*, 12, 531-534
66. Ring J. (1985)  
Pseudoallergische Arzneimittelreaktionen. Überlegungen zur Pathophysiologie, Klinik und Diagnostik am Beispiel von Röntgenkontrastmitteln und Lokalanästhetika  
*Allergologie*, 8, 342-350
67. Roujeau J.C., Albengres E., Moritz S., Piacentino A., Cuny M., Revuz J., Touraine R. (1985)  
Lymphocyte transformation test in drug-induced toxic epidermal necrolysis  
*Int Arch Allergy Appl Immunol*, 78, 22-24
68. Royston D. (1992)  
High-dose aprotinin therapy: a review of the first five years' experience  
*J Cardiothorac Vasc Anesth*, 6, 76-100

69. Sato Y., Ohshima T., Kondo T. (1999)  
Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing  
*Biochem Biophys Res Commun*, 265, 194-199
70. Scheule A.M., Beierlein W., Arnold S., Eckstein F.S., Albes J.M., Ziemer G. (2000)  
The significance of preformed aprotinin-specific antibodies in cardiosurgical patients  
*Anesth Analg*, 90, 262-266
71. Scheule A.M., Beierlein W., Wendel H.P., Eckstein F.S., Heinemann M.K., Ziemer G. (1998)  
Fibrin sealant, aprotinin, and immune response in children undergoing operations for congenital heart disease  
*J Thorac Cardiovasc Surg*, 115, 883-889
72. Scheule A.M., Beierlein W., Wendel H.P., Jurmann M.J., Eckstein F.S., Ziemer G. (1999)  
Aprotinin in fibrin tissue adhesives induces specific antibody response and increases antibody response of high-dose intravenous application  
*J Thorac Cardiovasc Surg*, 118, 348-353
73. Schoenemann J., Munter K.H., Enayati-Kashani S. (1998)  
Unerwünschte Arzneimittelwirkungen in der Klinik  
*Dtsch Med Wochenschr*, 123, 448-452
74. Scholl P.R., Geha R.S. (1994)  
MHC class II signaling in B-cell activation  
*Immunol Today*, 15, 418-422
75. Schuler T.M., Frosch P.J., Arza D., Wahl R. (1987)  
Allergie vom Soforttyp: Anaphylaktische Reaktion auf Aprotinin  
*Münch Med Wschr*, 129, 816-817
76. Schulze K., Graeter T., Schaps D., Hausen B. (1993)  
Severe anaphylactic shock due to repeated application of aprotinin in patients following intrathoracic aortic replacement  
*Eur J Cardiothorac Surg*, 7, 495-496

77. Sheffer A.L., Pennoyer D.S. (1984)  
Management of adverse drug reactions  
*J Allergy Clin Immunol*, 74, 580-588
78. Sher A., Coffman R.L. (1992)  
Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines  
*Annu Rev Immunol*, 10, 385-409
79. Shresta S., Pham C.T., Thomas D.A., Graubert T.A., Ley T.J. (1998)  
How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?  
*Curr Opin Immunol*, 10, 581-587
80. Soeparwata R., Hartman A.R., Frerichmann U., Stefano G.B., Scheld H.H., Bilfinger T.V. (1996)  
Aprotinin diminishes inflammatory processes  
*Int J Cardiol*, 53 Suppl, 55-63
81. Stavnezer J. (1996)  
Immunoglobulin class switching  
*Curr Opin Immunol*, 8, 199-205
82. Swartz K.R., Liu F., Sewell D., Schochet T., Campbell I., Sandor M., Fabry Z. (2001)  
Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system  
*Brain Res*, 896, 86-95
83. Taniguchi T., Koido Y., Aiboshi J., Yamashita T., Suzaki S., Kurokawa A. (1999)  
Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome  
*Crit Care Med*, 27, 1262-1264
84. Tassani P., Augustin N., Barankay A., Braun S.L., Zaccaria F., Richter J.A. (2000)  
High-dose aprotinin modulates the balance between proinflammatory and anti-inflammatory responses during coronary artery bypass graft surgery  
*J Cardiothorac Vasc Anesth*, 14, 682-686
85. Thürmann P.A., Schmitt K. (1998)  
Erfassung und Bewertung unerwünschter Arzneimittelwirkungen  
*Med Klin*, 93, 687-692

86. Trapani J.A. (1995)  
Target cell apoptosis induced by cytotoxic T cells and natural killer cells involves synergy between the pore-forming protein, perforin, and the serine protease, granzyme B  
Aust N Z J Med, 25, 793-799
87. Trapani J.A., Smyth M.J. (2002)  
Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway  
Nat Rev Immunol, 2, 735-747
88. Trapnell J.E., Rigby C.C., Talbot C.H., Duncan E.H. (1974)  
A controlled trial of Trasylol in the treatment of acute pancreatitis  
Br J Surg, 61, 177-182
89. Tuxen D.V., Cade J.F. (1986)  
Effect of aprotinin in adult respiratory distress syndrome  
Anaesth Intensive Care, 14, 390-399
90. van Dissel J.T., van Langevelde P., Westendorp R.G., Kwappenberg K., Frolich M. (1998)  
Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients  
Lancet, 351, 950-953
91. Verstraete M. (1985)  
Clinical application of inhibitors of fibrinolysis  
Drugs, 29, 236-261
92. Warrington R.J., Tse K.S. (1979)  
Lymphocyte transformation studies in drug hypersensitivity  
Can Med Assoc J, 120, 1089-1094
93. Wei M., Kuukasjarvi P., Laurikka J., Pehkonen E., Kaukinen S., Laine S., Tarkka M. (2001)  
Pump prime aprotinin fails to limit proinflammatory cytokine release after coronary artery bypass surgery  
Scand Cardiovasc, 35, 50-54

## Literaturverzeichnis

94. Weipert J., Meisner H., Jochum M., Dietrich W. (1997)  
Long-term follow-up of aprotinin-specific immunoglobulin G antibodies after cardiac operations  
J Thorac Cardiovasc Surg, 114, 676-678
  
95. World Health Organization (1972)  
International drug monitoring: the role of national centres. Report of a WHO meeting  
World Health Organ Tech Rep Ser, 498, 1-25
  
96. Zinkernagel R.M., Bachmann M.F., Kundig T.M., Oehen S., Pirchet H., Hengartner H. (1996)  
On immunological memory  
Annu Rev Immunol, 14, 333-367

**Hier möchte ich besonders allen danken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit immerwieder unterstützt haben.**

Frau Prof. Dr. med. R. Klein für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die fortwährende Motivation.

Herrn PD Dr. med. Scheule für die organisatorische Unterstützung und Hilfestellung bei der Auswahl der Patienten.

Frau Dr. rer. nat. H. Barth für zahlreiche Anregungen und ausgezeichnete Anleitung im Labor.

Frau H. Stauder für eine hervorragende Zusammenarbeit und Kooperation.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dietz und Frau Dr. sc. hum. F.Koch für Hilfestellung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Allen Mitarbeitern des Immunpathologischen Labor sei für die große Hilfsbereitschaft gedankt.

Abschließend gilt mein Dank allen an der Studie beteiligten Patienten.

## **Lebenslauf**

Norbert Waluga, geboren am 13. Januar 1971 in Ratiborhammer in Polen als drittes der drei Kinder von Adelheid Waluga, geborene Sulski und Wilhelm Waluga.

Allgemeine Hochschulreife am 22. Mai 1992 am Gymnasium in der Pfarrwiesen in Sindelfingen.

Zivildienst von September 1992 bis November 1993 am Städtischen Krankenhaus Sindelfingen.

Medizinstudium ab dem Wintersemester 1993 in Tübingen.

Praktisches Jahr mit Wahlfach Orthopädie in Sindelfingen.

Ärztliche Prüfung am 16. November 2000.

Arzt im Praktikum von Dezember 2000 bis Mai 2002 in der I. Medizinischen Klinik des Städtischen Klinikums Dresden-Friedrichstadt Chefarzt Prof. Dr. med. H. Nüßlein.

Approbation als Arzt am 2. Juli 2002.

Assistenzarzt seit September 2002 in der Allgemein- und Gefäßchirurgie des Kreiskrankenhauses in Waiblingen Chefarzt Dr. med. H.O. Barth.

Sindelfingen, den 15. Juli 2003

Norbert Waluga