

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. M. Zemlin

Immunologische Charakterisierung von Pleuraergüssen pädiatrischer Patienten nach kardiochirurgischer Operation

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2025

vorgelegt von
Luca Flögel
geboren am 01.12.1998 in Mannheim

Tag der Promotion: 25.07.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Zemlin

Univ.-Prof. Dr. med. Bruno Scheller-Clever

Und aufgeräumt und redensartlich begann er zu schildern, [...] wie also das Blut nicht unmittelbar an die Zellen herankomme, sondern wie der Druck, unter dem es stehe, einen Extrakt und Milchsaft davon durch die Gefäßwände schwitzen lasse und ihn in die Gewebe presse, so daß er überall hindringe, als Gewebeflüssigkeit jedes Spältchen fülle [...].

Thomas Mann, Der Zauberberg

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
ZUSAMMENFASSUNG	VII
ABSTRACT.....	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Pleuraerguss	1
1.1.1 Anatomie pleuraler Strukturen.....	1
1.1.2 Physiologie pleuraler Strukturen.....	2
1.1.3 Pathophysiologie des Pleuraergusses.....	3
1.1.4 Klinisches Management des Pleuraergusses.....	4
1.1.5 Klinisch etablierte Analysen von Pleuraergüssen.....	5
1.2 Immunologie.....	6
1.2.1 Zytokine	6
1.2.2 Zellen des Immunsystems	7
1.3 Immunologie des Pleuraergusses.....	13
1.3.1 Immunologische Analysen von Pleuraergüssen.....	13
1.3.2 Immunologie von Pleuraergüssen nach kardiochirurgischer Operation	13
1.4 Ziele der Arbeit	15
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte.....	16
2.1.2 Chemikalien.....	17
2.1.3 Antikörper	17
2.1.4 Beads.....	19
2.1.5 Primer	20
2.2 Studiendesign	21
2.3 Methoden	21
2.3.1 Erhebung von Patientendaten	21
2.3.2 Probengewinnung.....	21
2.3.3 Aufarbeitung der Blutproben.....	22
2.3.4 Aufarbeitung der Pleurapunktatproben.....	23
2.3.5 Zellbiologische Analysemethoden	23
2.3.6 Proteinbiochemische Analysemethoden.....	28
2.3.7 Molekularbiologische Analysemethoden.....	30
2.3.8 Statistische Methoden	32

3	ERGEBNISSE	34
3.1	Klinische Charakterisierung des Patientenkollektivs	34
3.2	Pseudonymisierung.....	35
3.3	Probenauswahl für immunologische Analysen	35
3.4	Etablierung einer Methode zur Aufarbeitung von Pleurapunktatproben.....	36
3.4.1	Aufarbeitung der Pleurapunktatproben.....	36
3.4.2	Qualität der Aufarbeitung von Pleurapunktatproben.....	37
3.5	Einteilung der Pleuraergüsse in Exsudate und Transsudate	38
3.6	Leukozytensubpopulationen in Blut und Pleuraerguss.....	39
3.6.1	T-Zellen in Blut und Pleuraerguss.....	39
3.6.2	B-Zellen in Blut und Pleuraerguss	43
3.6.3	Monozyten in Blut und Pleuraerguss	46
3.6.4	Natürliche Killerzellen in Blut und Pleuraerguss	47
3.7	Zytokine in Blut und Pleuraerguss.....	49
3.7.1	Grenzen der Quantifizierbarkeit von Zytokinen in Pleurapunktatproben	49
3.7.2	Quotient der Zytokinkonzentrationen in Blut und Pleuraerguss	50
3.7.3	Vergleich der Zytokinkonzentrationen in Blut und Pleuraerguss	51
3.7.4	Korrelation von Zytokinen zwischen Blut und Pleuraergüssen.....	53
3.8	Korrelation zwischen Immunzellen und Zytokinen	54
3.9	Genexpression von Immunzellen in Blut und Pleuraerguss	55
3.10	Einordnung des malignen Pleuraergusses	56
3.11	Einfluss demographischer und klinischer Parameter auf immunologische Charakteristika von Pleuraergüssen.....	57
4	DISKUSSION.....	59
4.1	Exsudate wurden mittels der Light-Kriterien diagnostiziert.....	59
4.2	Ursprung von Leukozyten und Zytokinen in Pleuraergüssen.....	59
4.2.1	Leukozyten in Pleuraergüssen sind systemischen Ursprungs	60
4.2.2	Zytokine in Pleuraergüssen sind systemischen und lokalen Ursprungs.....	62
4.3	Immunantwort in Pleuraergüssen pädiatrischer Patienten nach kardiochirurgischer Operation	64
4.3.1	Die Anteile von Leukozytensubpopulationen unterscheiden sich zwischen Blut und Pleuraergüssen.....	64
4.3.2	TH1 sind in Pleuraergüssen quantitativ dominierend, jedoch ist die TH1- Immunantwort funktionell eingeschränkt	65
4.3.3	Die TH2-Immunantwort ist ausgeglichen zwischen Pleuraergüssen und Blut.....	65
4.3.4	Die TH17-Immunantwort ist in Pleuraergüssen nur marginal ausgeprägt	66

4.3.5	Regulatorische T-Zellen und IL-10 wirken antiinflammatorisch in Pleuraergüssen.....	67
4.3.6	Doppelt-negative T-Zellen in Pleuraergüssen überschreiten klassische Modelle der Zytokinantwort	68
4.3.7	Zytotoxische Immunreaktionen in Form Zytotoxischer T-Zellen und Natürlicher Killerzellen sind in Pleuraergüssen gering ausgeprägt.....	68
4.3.8	Frühe Entwicklungsstufen von B-Zellen sind in Pleuraergüssen dominierend	69
4.3.9	B1- und B2-Zellen sind in Pleuraergüssen präsent	70
4.3.10	IL-7 fördert die Entwicklung von T-Zellen und B-Zellen	71
4.3.11	Monozyten könnten proinflammatorische Prozesse in Pleuraergüssen induzieren	72
4.3.12	IL-8 könnte chemotaktische und regenerative Funktionen in Pleuraergüssen haben.....	73
4.4	Einordnung des malignen Pleuraergusses	74
4.5	Demographische und klinische Parameter beeinflussen immunologische Charakteristika von Pleuraergüssen.....	74
4.5.1	Das Geschlecht hat keine Auswirkungen auf immunologische Charakteristika von Pleuraergüssen.....	75
4.5.2	Säuglinge weisen eine ausgeprägte TH2-Immunantwort auf	75
4.5.3	Herz-Lungen-Maschine verstärken die TH2-Immunantwort in Pleuraergüssen	76
4.6	Limitierungen	77
4.6.1	Limitierungen in Studiendesign und Patientenauswahl	77
4.6.2	Limitierungen der Probenaufarbeitung	78
4.6.3	Limitierungen immunologischer Analysen	79
4.7	Ausblick	81
5	TABELLENVERZEICHNIS	VII
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
7	ABBILDUNGSQUELLEN	IX
8	LITERATURVERZEICHNIS	X
9	PUBLIKATIONEN	XXII
10	DANKSAGUNG	XXIV
11	LEBENS LAUF	XXVI

Abkürzungsverzeichnis

ASD	Atriumseptumdefekt
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CTL	<i>Cytotoxic T cell</i> (Zytotoxische T-Zelle)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EMRA	<i>Effector memory re-expressing CD45RA</i>
et al.	<i>et alii</i>
FKS	Fetales Kälberserum
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HLM	Herz-Lungen-Maschine
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IQR	<i>Interquartile range</i>
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
NK	Natürliche Killerzellen
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PE	Pleuraerguss
PEC	<i>Pleural effusion cells</i>
PFO	Persistierendes Foramen ovale
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
TH	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
VSD	Ventrikelseptumdefekt

Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Gramm oder Maß der Erdbeschleunigung ($1\text{ g} \approx 9,8\text{ m/s}^2$)
l	Liter
min	Minute
s	Sekunde

Präfixe

k	Kilo (10^3)
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})

Zusammenfassung

Pleuraergüsse sind definiert als eine pathologische Ansammlung von Flüssigkeit in der Pleurahöhle. Sie können als Komplikation nach kardiochirurgischen Operationen pädiatrischer Patienten auftreten und verschlechtern das klinische Outcome. Die Entstehung von Pleuraergüssen ist assoziiert mit systemischen immunologischen Veränderungen, die in Folge kardiochirurgischer Operationen auftreten. Jedoch fehlen bis dato grundlegende Informationen sowohl über Charakteristika lokaler Immunreaktionen in Pleuraergüssen als auch deren Zusammenhang mit systemischen Immunreaktionen im Blut.

Folglich wurde in vorliegender Arbeit pädiatrischen Patienten bei Vorhandensein eines Pleuraergusses nach kardiochirurgischer Operation bei angeborenem Herzfehler simultan je eine Blut- und Pleurapunktatprobe entnommen. Daraufhin wurden in beiden Bioproben sich ergänzende immunologische Analysen auf Zell-, Protein- und Genexpressionsebene durchgeführt: Mittels Durchflusszytometrie wurden 37 Leukozytensubpopulationen detektiert, Multiplex-Immunoassays dienten der Quantifizierung von 12 Zytokinen und mittels quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion wurde die Expressionsstärke von 5 Genen untersucht.

Insgesamt wurden Blut- und Pleurapunktatproben von 30 Kindern mit einem medianen Alter von 22 Monaten akquiriert. Zunächst erfolgte die Etablierung einer Methode zur Aufarbeitung von Pleurapunktatproben, die eine Grundvoraussetzung für anschließende immunologische Analysen darstellte. Daraufhin konnten Subpopulationen von T-Zellen, B-Zellen, Natürlichen Killerzellen und Monozyten in korrespondierenden Blut- und Pleurapunktatproben nachgewiesen werden. Der Fokus lag dabei auf der Analyse von T-Zellen und es konnten signifikante Erhöhungen von T-Helferzellen Typ 1 und T-Helferzellen Typ 17 in Pleurapunktatproben gegenüber Blutproben festgestellt werden. Ein ebensolcher Trend konnte bei Gedächtnis Effektor T-Helferzellen, Gedächtnis Effektor Zytotoxischen T-Zellen und doppelt-negativen T-Zellen beobachtet werden. Zudem konnten proinflammatorische Zytokine wie TNF, IL-6 und IL-8 in Pleurapunktatproben in signifikant höheren Konzentrationen als in Blutproben detektiert werden. Gleichzeitig lag auch eine antiinflammatorische Komponente in Pleurapunktatproben in Form von IL-4, IL-10, IL-13 und Regulatorischen T-Zellen vor. Zusätzlich deutete eine Analyse klinischer Patientendaten auf eine Assoziation des Patientenalters und der Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine mit immunologischen Charakteristika von Pleuraergüssen hin.

Die vorliegende Arbeit stellt immunologische Charakteristika von Pleuraergüssen dar, die sowohl auf lokale Immunreaktionen hindeuten als auch einen Zusammenhang mit der systemischen Immunantwort nahelegen. Die hier gewonnenen Erkenntnisse dienen primär dem grundlegenden Verständnis der Immunologie von Pleuraergüssen pädiatrischer Patienten. Darauf aufbauend könnten zukünftige Verbesserungen in der Diagnostik und Therapie von Pleuraergüssen erzielt werden.

Abstract

Immunological characterization of pleural effusions in pediatric patients after cardiac surgery

Pleural effusions are defined as pathological accumulations of fluid in the pleural cavity. They can occur as a complication after cardiac surgery in pediatric patients and worsen the clinical outcome. The development of pleural effusions is associated with systemic immunological changes that occur as a result of cardiac surgery. However, basic information on both the characteristics of local immune reactions in pleural effusions and their connection with systemic immune reactions in the blood is still lacking.

Consequently, in the present study, pediatric patients with pleural effusion after cardiac surgery for congenital heart disease underwent simultaneous blood and pleural effusion sampling. Both specimens were subjected to complementary immunological analyses at the cellular, protein and gene expression levels: Flow cytometry was used to detect 37 leukocyte subpopulations, multiplex immunoassays were used to quantify 12 cytokines and real-time polymerase chain reaction was used to investigate the expression levels of 5 genes.

In total, blood and pleural effusion samples were acquired from 30 children with a median age of 22 months. Initially, a method for processing pleural effusion samples was established, which was a fundamental requirement for subsequent immunological analyses. Then subpopulations of T cells, B cells, natural killer cells and monocytes were detected in corresponding blood and pleural effusion samples. The focus was on the analysis of T cells and significant increases in T helper cells type 1 and T helper cells type 17 were found in pleural effusion samples compared to blood samples. A similar trend was observed for memory effector T helper cells, memory effector cytotoxic T cells and double-negative T cells. In addition, pro-inflammatory cytokines such as TNF, IL-6 and IL-8 were detected in significantly higher concentrations in pleural effusion samples than in blood samples. Simultaneously, an anti-inflammatory component was also present in pleural effusion samples, represented by IL-4, IL-10, IL-13 and regulatory T cells. Moreover, an analysis of patient data indicated an association of patient age and use of cardiopulmonary bypass with immunologic characteristics of pleural effusions.

The present study describes immunological characteristics of pleural effusions that indicate both local immune reactions and suggest a connection with the systemic immune response. The findings primarily serve to enhance the fundamental understanding of the immunology of pleural effusions in pediatric patients. Based on this, future improvements in the diagnosis and treatment of pleural effusions could be achieved.

1 EINLEITUNG

1.1 Pleuraerguss

1.1.1 Anatomie pleuraler Strukturen

Die Pleurahöhle ist ein schmaler Raum zwischen Lungenoberfläche und Innenseite des Thorax. Die Pleurahöhle wird von einer dünnen Gewebeschicht, der Pleura, ausgekleidet. Die Pleura lässt sich in zwei Bereiche unterteilen, die ineinander übergehen: Die Pleura visceralis bedeckt die Lungenoberfläche; die Pleura parietalis bedeckt die Innenseite des Thorax (22,111) (Abbildung 1). Histologisch besteht die Pleura aus zwei Schichten. Die Grundlage bildet die Tela subserosa. Sie ist eine bindegewebige Verschiebeschicht und liegt der Lungenoberfläche bzw. der Innenseite des Thorax direkt an. Der Tela subserosa nach luminal aufgelagert ist die Tunica serosa. Sie besteht aus den Schichten Lamina propria und Lamina epithelialis. Die Lamina propria ist eine bindegewebige Schicht, die Kapillaren und Lymphgefäßen enthält. Die Lamina epithelialis besteht aus einschichtig angeordneten Mesothelzellen. Die Mesothelzellen sind durch Tight Junctions verbunden und stellen die luminalle Begrenzung der Pleurahöhle dar (111). Trotz des strukturell gleichen histologischen Aufbaus von Pleura visceralis und parietalis unterscheiden sie sich in ihrer Dicke. Die Dicke der Pleura visceralis beträgt 100 µm, die der Pleura parietalis 20 µm (29,195).

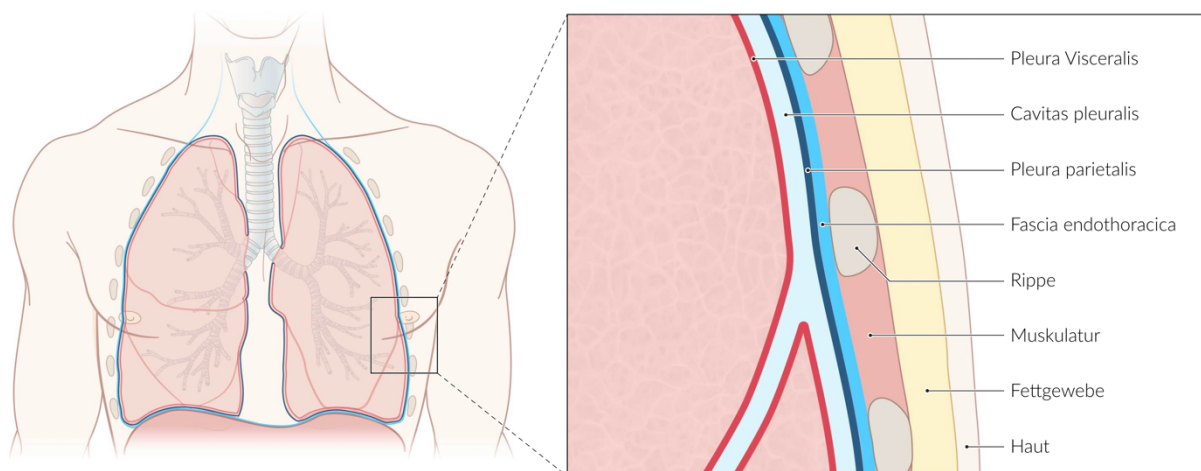


Abbildung 1: Anatomie pleuraler Strukturen

Die Pleurahöhle (Cavitas pleuralis) wird von Pleura visceralis und Pleura parietalis gebildet. Die Pleura visceralis umgibt die Lungenoberfläche, die Pleura parietalis kleidet die Innenseite des Thorax aus. Weiterhin sind verschiedene Strukturen der Thoraxwand aufgeführt. (Abbildungsquelle 1)

1.1.2 Physiologie pleuraler Strukturen

Die Hauptfunktionen pleuraler Strukturen sind die Verhinderung des Kollaps der Lunge und die Ermöglichung der Gleitfähigkeit der Lunge während der Atmung. Die Lunge hat das Bestreben, sich zusammenzuziehen. In der Pleurahöhle besteht ein subatmosphärischer Druck, der den Retraktionskräften der Lunge entgegenwirkt. Trotz des subatmosphärischen Drucks berühren sich Pleura visceralis und parietalis nicht. Dies wird durch die gleichartige Ladung polarer Phospholipide auf der gesamten Pleura verursacht. Die Gleitfähigkeit zwischen Lunge und Thorax wird durch das Vorhandensein von Flüssigkeit in der Pleurahöhle gewährleistet. Im physiologischen Zustand enthält die Pleurahöhle 0,3 ml/kg KG Pleuraflüssigkeit. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen Produktion und Resorption der Pleuraflüssigkeit (105,106,111).

Die unterschiedlichen Dicken von Pleura visceralis und parietalis haben Auswirkungen auf den pleuralen Flüssigkeitsumsatz. Ältere Hypothesen gingen davon aus, dass die pleurale Flüssigkeit durch die Pleura parietalis produziert und durch die Pleura visceralis resorbiert wird. Neuere Studienergebnisse deuten darauf hin, dass die Pleura visceralis aufgrund ihrer circa fünfmal größeren Dicke und damit niedrigen Flüssigkeitsleitfähigkeit am pleuralen Flüssigkeitsumsatz nicht beteiligt ist. Produktion und Resorption der Pleuraflüssigkeit erfolgen somit im physiologischen Zustand durch die Pleura parietalis (29,106).

An der Produktion beteiligte pleurale Strukturen sind Kapillaren, Interstitium und Mesothelzellen (Abbildung 2). Aufgrund hydrostatischer und onkotischer Druckunterschiede gelangt Flüssigkeit aus den Kapillaren zunächst in das die Kapillaren umgebende Interstitium und von dort in die Pleurahöhle. Beim Transport vom Interstitium in die Pleurahöhle wird die Mesothelzellschicht durchquert. Dies geschieht aufgrund der die Mesothelzellen verbindenden Tight junctions transzellulär (106,111).

Die Resorption erfolgt über Lymphgefäße, die als sogenannte Stomata in der Pleura parietalis blind beginnen (175). Die Stomata kommen innerhalb der Pleura parietalis in unterschiedlicher Dichte vor. Mediastinale und diaphragmale Bereiche haben die höchste Dichte an Stomata. Folglich unterscheiden sich die Lokalisationen von Produktion und Resorption innerhalb der Pleura parietalis. Kranial gelegene Bereiche sind vorrangig für die Produktion zuständig; diaphragmale und mediastinale für die Resorption (104,106).

Im physiologischen Zustand liegt zwischen Produktion und Resorption ein Gleichgewicht vor. Die Flussrate der Resorption kann um den Faktor 20 gesteigert werden. So wird das Volumen der Pleuraflüssigkeit im physiologischen Zustand konstant gehalten (103).

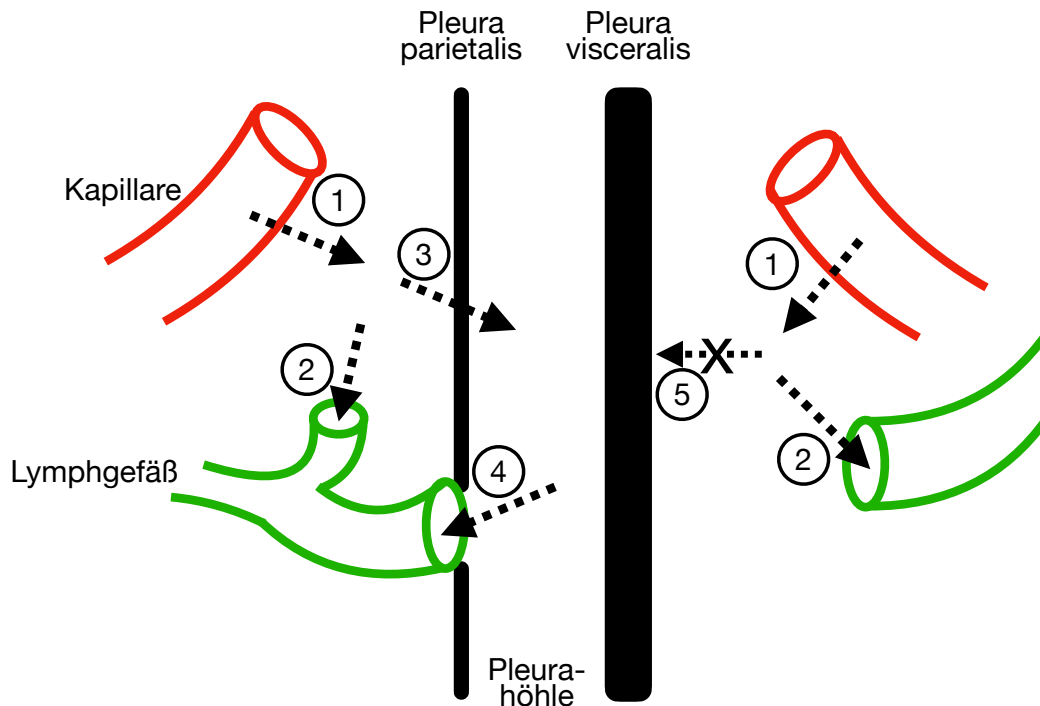


Abbildung 2: Physiologischer Flüssigkeitsumsatz pleuraler Strukturen

Flüssigkeit gelangt aus den Kapillaren in das umgebende Bindegewebe (1). Im Bindegewebe wird sie entweder von Lymphgefäßen resorbiert (2) oder sie gelangt transzytotisch durch die Mesothelzellschicht der Pleura parietalis in die Pleurahöhle (3). Stomata sind blind beginnende Lymphgefäße in der Pleura visceralis und resorbieren die Flüssigkeit der Pleurahöhle (4). Die Pleura visceralis ist aufgrund ihrer fünffach größeren Dicke nicht am pleuralen Flüssigkeitsumsatz beteiligt (5). (Abbildungsquelle 2)

1.1.3 Pathophysiologie des Pleuraergusses

Bei Störung des Gleichgewichts zwischen Produktion und Resorption mit Überschreitung der Kompensationsmechanismen, kommt es zur Akkumulation von Pleuraflüssigkeit in der Pleurahöhle. Die Akkumulation von Flüssigkeit in der Pleurahöhle wird als Pleuraerguss bezeichnet. Pathophysiologisch werden zwei Arten von Pleuraergüssen unterschieden: Transsudat und Exsudat (87,105) (Abbildung 3).

Ein Transsudat entsteht durch die Erhöhung des hydrostatischen Drucks oder die Erniedrigung des onkotischen Druck in den Kapillaren der parietalen Pleura. Die veränderten Druckverhältnisse führen zum Austritt protein- und zellarmer Flüssigkeit aus den intakten Kapillaren. Die Flüssigkeit gelangt zuerst in das die Kapillaren umgebende Interstitium und dann durch die intakte Mesothelzellschicht in die Pleurahöhle. Bei diesem Vorgang liegt *keine* Schädigung pleuraler Strukturen vor (81,195).

Ein Exsudat entsteht durch eine Schädigung pleuraler Strukturen. Dadurch erhöht sich die Permeabilität des Endothels der Kapillaren und der Mesothelzellschicht. Die erhöhte Permeabilität führt zum Austritt protein- und zellreicher Flüssigkeit. Die Flüssigkeit gelangt zuerst in das die Kapillaren umgebende Interstitium und dann durch die geschädigte Mesothelzellschicht in die Pleurahöhle. Im Gegensatz zum hauptsächlich transzellulären Flüssigkeitstransport intakter Mesothelzellen, ist der Flüssigkeitstransport bei Exsudaten parazellulär (81,105,195).

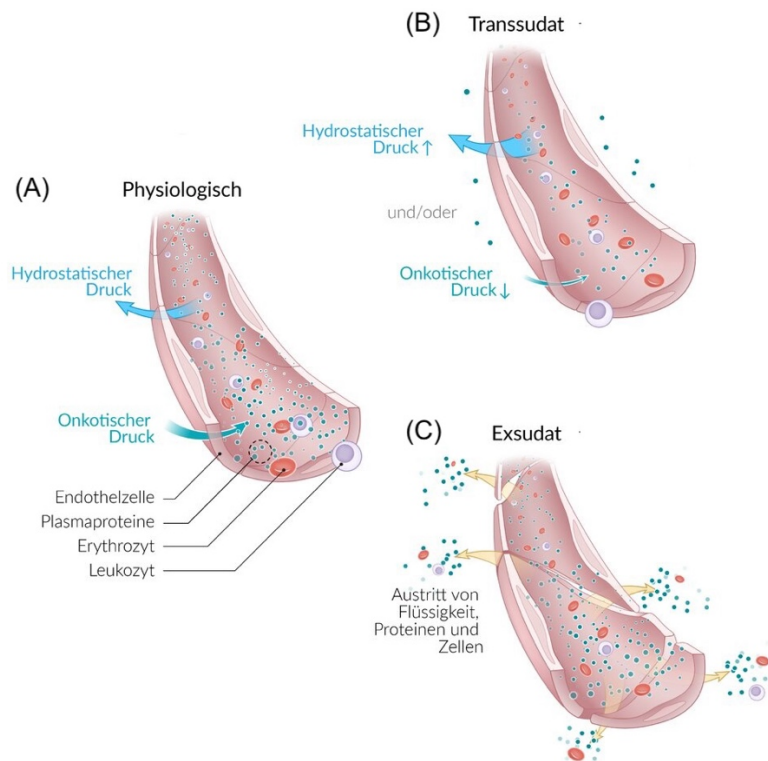


Abbildung 3: Pathophysiologie von Transsudaten und Exsudaten

Im physiologischen Zustand (A) liegt ein Gleichgewicht zwischen hydrostatischem und onkotischem Druck in Blutgefäßen vor, sodass sich Flüssigkeitseintritt und -austritt ausgleichen. Bei Transsudaten (B) führt ein erhöhter hydrostatischer oder erniedrigter onkotischer Druck zum Austritt protein- und zellarmer Flüssigkeit. Bei Exsudaten (C) führt eine Schädigung des Endothels zur erhöhten Permeabilität mit Austritt protein- und zellreicher Flüssigkeit. (Abbildungsquelle 3)

1.1.4 Klinisches Management des Pleuraergusses

Pleuraergüsse (PE) sind mit über 50 Krankheitsbildern assoziiert (172). Patienten mit PE können ein breites Spektrum an Symptomen aufweisen. Es reicht unter anderem von asymptomatischen Verläufen, über Hustenreiz und Schmerzen im Brustkorb bis hin zu ausgeprägter Dyspnoe (69,158). Die Stärke der Symptome korreliert nur leicht mit der Größe des PE (127).

Anamnestisch sind neben den aktuellen Beschwerden Informationen zu eruieren bezüglich Vorerkrankungen, Infekt- und B-Symptomatik und zeitlichem Verlauf der Symptome. Die körperliche Untersuchung kann folgende Auffälligkeiten zeigen: asymmetrische Thoraxexkursion in der Inspektion, verminderter Stimmfremitus in der Palpation, gedämpfter Klopfschall in der Perkussion, abgeschwächte bis fehlende Atemgeräusche und verminderte Bronchophonie in der Auskultation. Die sichere Diagnosestellung eines PE erfolgt mittels bildgebender Verfahren. Standardmäßig werden Sonografie und Röntgen eingesetzt, bei speziellen Fragestellungen auch CT oder MRT (102,158).

Die Punktion des PE hat diagnostischen und therapeutischen Wert. Diagnostisch dient sie der Charakterisierung des PE. Therapeutisch dient sie vor allem der Druck- und damit Symptomentlastung durch Verringerung des Ergussvolumens. Daneben zielt die Therapie von PE insbesondere auf die Behandlung der verursachenden Grunderkrankung ab (69,146).

1.1.5 Klinisch etablierte Analysen von Pleuraergüssen

Die makroskopische Beurteilung des Pleurapunktats kann erste Hinweise auf die Art und Ätiologie des Pleuraergusses geben. So deutet beispielsweise ein milchig-weißes Erscheinungsbild auf einen Chylothorax hin, eine Rotfärbung auf einen Hämatothorax und eine gelb-grünliche Trübung auf ein Pleuraempyem. Eine sichere Einteilung ist mittels makroskopischer Beurteilung jedoch nicht möglich. Beispielsweise können sich Chylothoraces nach Nahrungskarenz klar-serös darstellen und die Rotfärbung eines Pleurapunktats auf eine iatrogene Blutung durch die Punktion zurückzuführen sein (69).

Die sichere Beurteilung eines Pleurapunktats gelingt anhand Kriterien der Mikrobiologie, Pathologie und Klinischen Chemie. Die explizite Durchführung hängt von der klinischen Situation ab. Die Mikrobiologie erlaubt die Anlage einer Bakterienkultur. In der Pathologie kann ein zytologischer Ausstrich zur Detektion neoplastischer Zellen erfolgen. In der Klinischen Chemie werden Parameter wie Gesamtprotein, Laktatdehydrogenase (LDH), Triglyzeride, Cholesterin, Lipase, Glucose, pH-Wert, Tumormarker und Zellzahl bestimmt (102,158).

Die Klinische Chemie erlaubt die Einteilung des Pleurapunktats in Transsudate und Exsudate (87). Diese Einteilung gibt Hinweise auf die zugrunde liegende Pathophysiologie und Ätiologie und beeinflusst maßgeblich das klinische Vorgehen. Vor allem bei Vorliegen eines Exsudats ist eine intensive Diagnostik indiziert. Diese gilt insbesondere der Feststellung maligner oder infektiöser Ursachen (61,69).

Transsudat und Exsudat lassen sich anhand der Light-Kriterien unterscheiden (87). Bei Vorliegen mindestens eines Light-Kriteriums, handelt es sich um ein Exsudat (Tabelle 1). Die ursprünglich aufgestellten Light-Kriterien wurden 1997 leicht modifiziert und sind in dieser Form bis heute gültig (88,132).

Tabelle 1: Light-Kriterien

Die Light-Kriterien dienen der Differenzierung von Transsudaten und Exsudate. LDH = Laktatdehydrogenase

Light-Kriterien		
1.	Pleura-Gesamtprotein / Serum-Gesamtprotein	> 0,5
2.	Pleura-LDH / Serum-LDH	> 0,6
3.	Pleura-LDH	> 2/3 des normwertigen Serum-LDH

Die Light-Kriterien diagnostizieren ein Exsudat mit einer Sensitivität zwischen 90 - 99 %, einer Spezifität zwischen 80 - 85 % und einer Accuracy von circa 95 % (102,158,168).

Neben den Light-Kriterien gibt es noch weitere Kriterien, die die Unterscheidung von Transsudat und Exsudat ermöglichen. So weisen ein Gesamtproteingehalt von > 30 mg/dl, ein Cholesterinwert > 60 mg/dl oder ein spezifisches Gewicht > 1016 g/l des Punktats auf das Vorliegen eines Exsudats hin (151).

1.2 Immunologie

Das Immunsystem des Menschen ist ein komplexes Netzwerk aus Zellen, Proteinen und Molekülen. Es vermittelt die Abwehrreaktion des Organismus auf potentielle Noxen. Immunreaktionen hervorrufende Faktoren sind unter anderem Krankheitserreger wie Viren, Bakterien, Helminthen oder Pilze. Auch nicht-infektiologische Ursachen können eine Aktivierung des Immunsystems auslösen. Dazu gehören u.a. chronische Erkrankungen, Traumata, Operationen oder der Kontakt zu körperfremden Materialien. Unterschieden wird zwischen dem angeborenem und dem erworbenem Immunsystem. Beide umfassen zelluläre und humorale Abwehrmechanismen (40,99).

1.2.1 Zytokine

Zytokine sind eine inhomogene Gruppe von Proteinen die als Mediatoren der dynamischen Interaktion zwischen Zellen dienen. Sie sind neben Antikörpern und Komplementfaktoren der humoralen Immunantwort zuzurechnen. Zytokine werden von Immunzellen und Nicht-Immunzellen produziert und beeinflussen das Verhalten von Zellen mit passenden Zytokinrezeptoren. Manche Zytokine stammen von einem spezifischen Zelltyp, andere von vielen unterschiedlichen Zelltypen. Manche Zytokine beeinflussen nur einen spezifischen Zelltyp, andere viele unterschiedliche Zelltypen. Zytokine können auf drei Arten wirken: Sie können auf die Zelle wirken, von der sie freigesetzt wurden (autokrin), oder sie wirken auf Zellen in ihrer nahen Umgebung (parakrin), oder sie wirken auf weiter entfernte Zellen (endokrin) (91,101).

Die Einteilung der Zytokine ist anhand unterschiedlicher Kriterien möglich, beispielsweise Struktur, Funktion, Ursprungszelle, Zielzelle, pro- oder anti-inflammatorischer Wirkung. Eine häufig genutzte Einteilung differenziert Interleukine (IL), Interferone (IFN), Tumornekrosefaktoren (TNF), Koloniestimulierende Faktoren (CSF) und Chemokine. Es ist jedoch zu beachten, dass innerhalb der Gruppen eine große Heterogenität bezüglich Ursprungszelle, Zielzelle und Wirkung der Zytokine besteht. Weiterhin führt die Inhomogenität der Nomenklatur einiger Zytokine auch zu Überschneidungen bei der Gruppeneinteilung. So ist z.B. Interleukin-8 alias CXCL8 zwar nomenklatorisch gleichermaßen den Interleukinen und den Chemokinen zuteilbar, funktionell agiert es aber eher als Chemokin (101).

Chemokine sind eine spezialisierte Untergruppe der Zytokine, die bei Immunzellen zu einer Wanderungsbewegung, der sogenannten Chemotaxis führt. Dabei bewegen sich die Immunzellen entlang des Konzentrationsgradienten in Richtung des Ortes der Inflammation, an dem die Chemokinkonzentration am höchsten ist (6,64).

Die Über- oder Unterproduktion von Zytokinen ist mit Krankheiten assoziiert. Zum Beispiel können zu niedrige TNF Level bei Lupus erythematodes vorzufinden sein (8), während zu hohe TNF Level bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vorliegen (125,155).

1.2.2 Zellen des Immunsystems

Die Zellen des Immunsystems (Leukozyten) stammen wie Erythrozyten und Thrombozyten von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab. Es existieren zwei Arten von Stammzelllinien. Aus der lymphatischen Stammzelllinie entwickeln sich B- und T-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK) und dendritische Zellen. Aus myeloischen Stammzellen entwickeln sich Granulozyten, Mastzellen, dendritische Zellen, Thrombozyten und Erythrozyten (178,186).

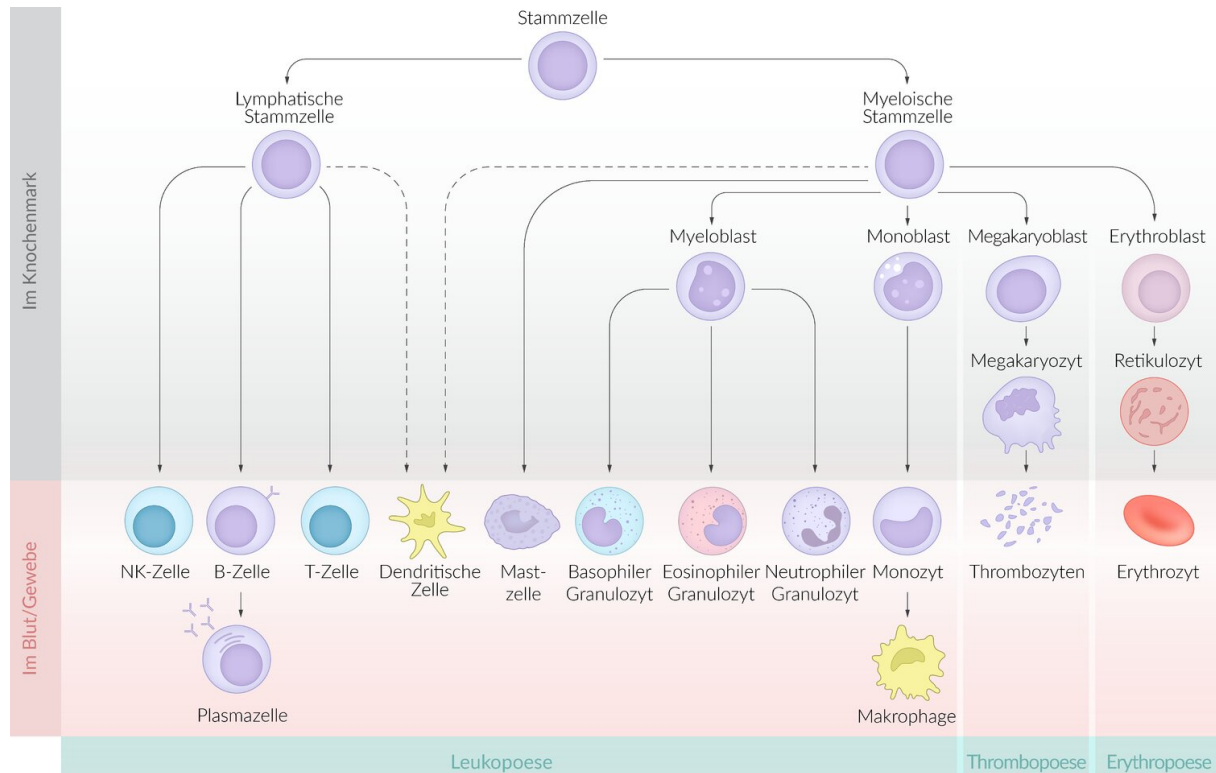


Abbildung 4: Entwicklung von Blutzellen

Stammzellen können sich zu lymphatischen oder myeloischen Stammzellen entwickeln. Über multiple in der Abbildung nicht dargestellte Zwischenschritte entwickeln sich Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Während große Teile der Reifung von Leukozyten im Knochenmark ablaufen, halten sich reife Leukozyten in Blut, lymphatischen Organen oder peripheren Geweben auf. (Abbildungsquelle 4)

Leukozyten besitzen Oberflächenmoleküle, die sich anhand des Clusters of Differentiation (CD) einteilen lassen. Das Präsenz von Oberflächenmolekülen auf einer Zelle, ermöglicht die Zuordnung zu einer spezifischen Leukozytensubpopulation. Zudem kann sich im Laufe des Differenzierungsprozesses von Leukozyten die Expression von Oberflächenmarkern verändern und lässt Rückschlüsse auf das Entwicklungsstadium zu (196).

Leukozyten lassen sich entsprechend ihrer Funktionen der angeborenen oder der adaptiven Immunantwort zurechnen. Monozyten, Granulozyten, Mastzellen, dendritische Zellen und NK gehören der angeborenen Immunantwort an. T- und B-Zellen sind Teil der adaptiven Immunantwort. Angeborene und adaptive Immunantwort sind jedoch keineswegs isoliert funktionierende Einheiten. So aktivieren antigenpräsentierende Zellen der angeborenen Immunantwort die adaptive Immunantwort. Umgekehrt rekrutieren Zellen der adaptiven Immunantwort durch Zytokine wiederum Zellen der angeborenen Immunantwort (99,186).

1.2.2.1 T-Zellen

T-Zellen sind Lymphozyten, die dem Knochenmark entstammen und im Thymus ausreifen. Sie sind charakterisiert durch den Oberflächenmarker CD3. T-Zellen werden anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 unterteilt. Cytotoxische T-Zellen (CTL) sind CD8 positiv. T-Helferzellen (TH) und Regulatorische T-Zellen (Treg) sind CD4 positiv (15,196). TH lassen sich weiter in die Subtypen TH1, TH2 und TH17 aufteilen (1). Zudem existieren doppelt-negative T-Zellen (DN T-Zellen), die weder CD4 noch CD8 exprimieren (184).

T-Zellen entstammen dem Knochenmark und reifen im Thymus aus. Dabei bildet jede T-Zelle durch somatische Rekombination einen individuellen T-Zell-Rezeptor (TCR), der für ein bestimmtes Antigen hochspezifisch ist. Während der Reifung erfolgt eine positive und negative Selektion. Nur T-Zellen, die einerseits auf MHC-Molekülen präsentierte Antigene erkennen können und andererseits gegenüber körpereigenen Antigenen tolerant sind, überleben die Selektion und verlassen als naive T-Zellen den Thymus (15,160).

Naive T-Zellen zirkulieren zwischen Blut und sekundären lymphatischen Organen. In den sekundären lymphatischen Organen treffen sie auf antigenpräsentierende Zellen, die über MHC-Moleküle Antigene präsentieren. Bei Kontakt einer naiven T-Zelle mit dem für sie spezifischen Antigen/MHC-Komplex erfolgt eine Aktivierung der T-Zelle. Antigene, die über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden, interagieren mit TH. Bei Präsentation via MHC-Klasse-I-Molekülen erfolgt die Interaktion mit CTL. Die aktivierte T-Zelle proliferiert im Sinne einer klonalen Expansion. Nach erfolgter Immunabwehr bleiben Gedächtnis T-Zellen zurück. Diese exprimieren den Oberflächenmarker CD45RO und lassen sich dadurch von den CD45RO negativen Naiven T-Zellen unterscheiden (32,171).

Entsprechend ihres Aufenthaltsortes lassen sich T-Zellen in zwei Gruppen unterteilen: In sekundären Lymphorganen lokalisierte T-Zellen werden Zentrale T-Zellen genannt und sind exprimieren CD62L. Der Oberflächenmarker CD62L wird als „*homing factor*“ bezeichnet und erlaubt die Migration durch hochendotheliale Venolen in Lymphknoten. Im Gegensatz dazu halten sich Effektor T-Zellen in Blut oder peripheren Geweben auf und sind CD62L negativ (53,67).

1.2.2.1.1 Zytotoxische T-Zellen

Aktivierte Zytotoxische T-Zellen (CTL) sind vor allem für die Bekämpfung virusinfizierter oder tumoröser Zellen verantwortlich. Alle kernhaltigen, körpereigene Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche MHC-I-Moleküle, an die Antigene aus dem Zellinneren gebunden sind. Tumoröse Zellen präsentieren auf MHC-I ein verändertes Antigenmuster; virusinfizierte Zellen präsentieren Viruspartikel. CTL erkennen mit ihrem T-Zell-Rezeptor pathologische Zellen. Die Induktion der Apoptose erfolgt entweder durch die Aktivierung des Todesrezeptors oder die Freisetzung zytotoxischer Enzyme wie Perforine oder Granzyme. Folglich ähneln sie funktionell den Natürlichen Killerzellen der angeborenen Immunantwort. Jedoch besitzt jede

CTL einen einzigartigen T-Zell-Rezeptor und ist somit für ein bestimmtes Antigen hochspezifisch. Nach erfolgter Immunreaktion verbleiben Gedächtnis CTL. Es besteht eine enge Assoziation zwischen der Aktivierung von CTL und der TH1-Immunantwort (11,30,136).

1.2.2.1.2 T-Helferzellen

CD4⁺ subsumieren unter anderem TH1, TH2, TH17 und Treg. Die Differenzierung naiver T-Zellen zur jeweiligen Subpopulation ist abhängig von den auf sie einwirkenden Zytokinen. Die Entwicklung von TH1 wird via IL-12 und IFN- γ gefördert, TH2 via IL-4, TH17 via IL-6 und IL-23, Treg via IL-2 und TGF- β (Abbildung 5). Zudem wird die Entwicklung der eigenen Subpopulation durch Sezernierung der entsprechenden Zytokine im Sinne einer positiven Rückkopplung gefördert (1,76).

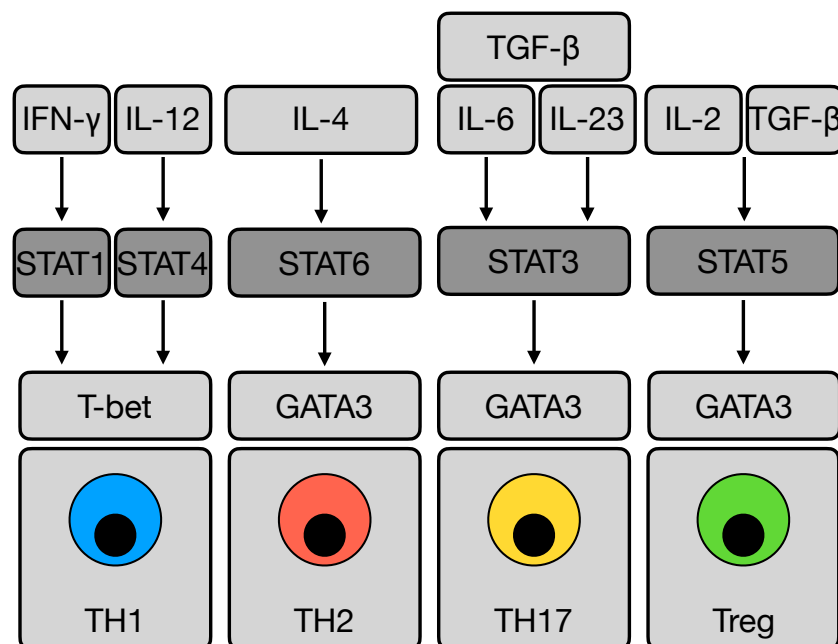


Abbildung 5: Entwicklung von T-Helferzellen

Zytokine regulieren die Aktivität von Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie. Die Transkriptionsfaktoren induzieren die Expression der Gene TBX21, GATA3, ROR γ T bzw. FoxP3, die entsprechend die Entwicklung naiver T-Zellen zu TH1, TH2, TH17 bzw. Treg regulieren. (Abbildungsquelle 5)

Die Entwicklung von TH wird über Kreuz reguliert (Abbildung 6). Das heißt, dass die Sezernierung von Zytokinen einer Subpopulation die Differenzierung anderer Subpopulationen hemmt. Das von TH1-Zellen produzierte IFN- γ hemmt die Proliferation von TH2-Zellen. Das umgekehrte gilt für TH2-Zellen: Sie induzieren über die Produktion von IL-4 eine Hemmung der Entwicklung von TH1-Zellen. Sowohl TH1- als auch TH2-Zellen hemmen via IFN- γ bzw. IL-4 die Entwicklung von TH17-Zellen. Treg sezernieren das antiinflammatorische Zytokin TGF- β . Dieses hemmt wiederum sowohl TH1- als auch TH2-Zellen, sodass diese die Entwicklung von TH17-Zellen nicht mehr hemmen können (117,123).

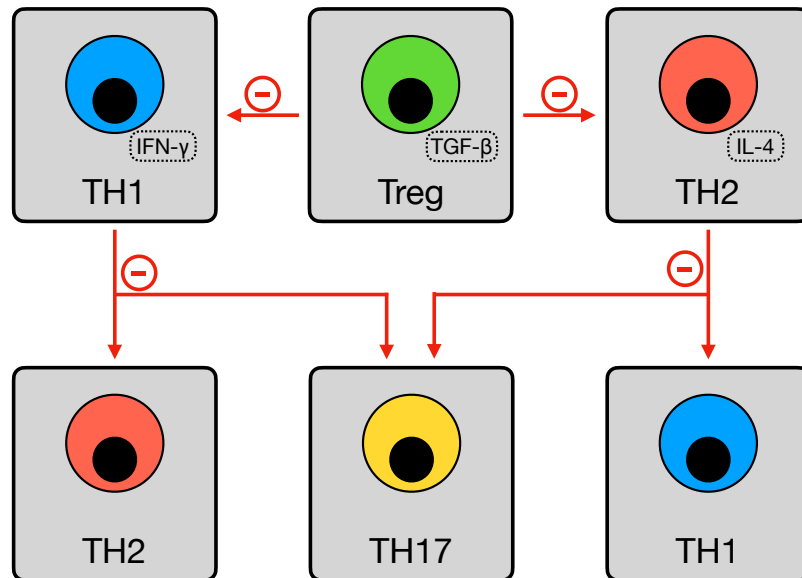


Abbildung 6: Gegenseitige Regulation der Differenzierung von T-Helferzellen

TH1 und TH2 hemmen durch Produktion von Zytokinen die Differenzierung der jeweils anderen Subpopulation. Zudem hemmen beide TH17. Treg wirken sowohl auf TH1 als auch TH2 hemmend (Abbildungsquelle 6)

Die klassische Funktion der TH1-Immunantwort besteht in der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene, wie Viren oder Mykobakterien. Zur Erreichung dieses Ziels koordinieren TH1-Zellen die Aktivierung von CTL und NK und fördert in B-Zellen den Antikörperwechsel zu IgG-Antikörpern. Zudem wird in Makrophagen die Fähigkeit verstärkt, intrazellulär persistierende Pathogene zu eliminieren. Bei der TH1-Immunantwort spielen die Zytokine IFN- γ und IL-12 eine zentrale Rolle, da diese sowohl von aktivierten Zellen der TH1-Immunantwort produziert werden als auch die TH1-Immunantwort im Sinne einer positiven Rückkopplung verstärken (1,25). Die TH1-Immunantwort tritt jedoch nicht nur bei Infektionen auf, sondern liegt auch bei nicht-infektiologischen Pathologien wie Autoimmunerkrankungen z.B. bei M. Crohn vor (124). Die TH2-Immunantwort wird durch Infektionen mit extrazellulären Parasiten, wie Helminthen ausgelöst. Sie tritt aber auch bei nicht-infektiologischen Erkrankungen wie Allergien auf. TH2-Zellen produzieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. An der TH2-Immunantwort sind neben TH2-Zellen Eosinophile, Basophile, Mastzellen und IgE-Antikörper produzierende B-Zellen beteiligt (78,173). Mastzellen und Basophile setzen nach Aktivierung Histamin und Prostaglandine frei, die beispielsweise im Rahmen der Typ I Allergie nach Coombs und Gell zu Vasodilatation und Permeabilitätserhöhung von Gefäßen mit Flüssigkeitsaustritt ins Interstitium führt (83).

Die TH17-Immunantwort ist zuständig für die Bekämpfung extrazellulärer Bakterien und Pilze. Durch Sezernierung der Zytokine IL-17 und IL-22 werden Neutrophile und IgG-produzierende B-Zellen aktiviert. Zudem steigt die Produktion antimikrobieller Substanzen durch Epithelzellen. Im Gegensatz zu TH1 und TH2 induzieren TH17 die Differenzierung weiterer TH17 aus naiven T-Zellen nicht direkt. Das von TH17 produzierte IL-17 fördert jedoch die

Sezernierung von IL-6 durch Makrophagen und induziert auf diesem Weg indirekt die Differenzierung weiterer TH17 (45,76,149).

Regulatorische T-Zellen (Treg) wirken supprimierend auf die Aktivierung des Immunsystems bzw. regulieren nach erfolgter Immunantwort das Ende derselben. Dafür produzieren Treg antiinflammatorische Zytokine wie TGF- β und IL-10. IL-10 hemmt die Produktion von IL-12 und IL-23 durch Monozyten und vermindert damit indirekt die Ausdifferenzierung naiver T-Zellen zu Effektorzellen der TH1- bzw. TH17-Immunantwort. Die Bedeutung von Regulatorischen T-Zellen und IL-10 wird durch Zustände ihrer quantitativen Verminderung deutlich, die zu Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel chronisch entzündlichen Darmerkrankungen führen können (54,167).

1.2.2.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK) sind Teil des angeborenen Immunsystems. Ähnlich den Zytotoxischen T-Zellen reagieren sie auf Tumorzellen, virusinfizierte Zellen und zellulären Stress. Auf Grundlage der Expression von MHC-Klasse-I-Moleküle unterscheiden NK zwischen gesunden und pathologischen Zellen. Bei verminderter oder veränderter Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen erfolgen Degranulation zytotoxischer Enzyme, die zur Apoptose der Zielzelle führen (93,169,180).

NK können unter anderem durch die Expression der Oberflächenmarker CD16 und CD56 identifiziert werden. Während die Expression von CD16 erst in reifen Stadien von NK vorliegt, ist die Stärke der Expression von CD56 mit der Funktion der NK assoziiert. NK mit schwacher Expression von CD56 (CD56^{dim}) halten sich präferiert im Blut auf und sind vor allem an der Abtötung von Zellen mittels Perforin und Granzymen beteiligt. NK mit starker Expression von CD56 (CD56^{bright}) sind in Knochenmark, sekundären Lymphorganen und Leber lokalisiert und produzieren Zytokine, wie beispielsweise IFN- γ (35,126,182).

Die Aktivität der NK wird durch Kontakt mit Zytokinen wie IL-12 und Interferone verstärkt. IL-12 führt in Kombination mit IL-18 zur Freisetzung von IFN- γ durch NK. Das von NK produzierte IFN- γ ist im Gegensatz zu dem durch CD8+Zellen IFN- γ bereits in einer sehr frühen Phase der Immunantwort vorhanden. IFN- γ wirkt auf die angeborene Immunabwehr indem es Makrophagen aktiviert. Diese Aktivierung wird weiterhin durch die von NK-Zellen sezernierten Zytokine GM-CSF und TNF gefördert. Zudem führt das von NK produzierte IFN- γ zur Differenzierung naiver TH zu TH1, wobei Letztere wiederum durch Freisetzung von IL-12 die Aktivierung weiterer NK fördern (93,169).

1.2.2.3 Monozyten und Makrophagen

Die drei Hauptfunktionen von Monozyten bzw. Makrophagen sind Phagozytose, Antigenpräsentation und Zytokinproduktion von u.a. IL-1 β , TNF, IL-6 und IL-8. Sie stellen eine Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar (55,68).

Der Oberflächenmarker CD14 ist spezifisch für Monozyten. Zudem exprimieren bestimmte Subpopulationen von Monozyten auch CD16 wodurch sich folgende drei Subpopulationen unterscheiden lassen: Klassische Monozyten ($CD14^+CD16^-$), Intermediäre Monozyten ($CD14^+CD16^+$) und Nicht-Klassische Monozyten ($CD14^{dim}CD16^+$) (37,194).

Hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks können sich unter Einwirkung von Zytokinen wie GM-CSF und M-CSF über Monoblasten zu Monozyten differenzieren. Daraufhin zirkulieren Monozyten für 1-3 Tage im Blut bis sie in periphere Gewebe auswandern und sich dabei zu Makrophagen differenzieren. Bei Vorliegen einer Infektion werden Monozyten durch lokale Konzentrationserhöhungen von Chemokinen wie MCP-1 zum Infektionsherd dirigiert (64,65). Weiterhin existieren geweberesidente Makrophagen, die sich während der Embryonalentwicklung in Geweben wie Peritoneum oder Pleura ansiedeln und dort dauerhaft lokalisiert sind (43,96,183).

1.2.2.4 B-Zellen

B-Zellen sind in der Lage Antikörper zu produzieren und tragen damit zur humoralen Immunantwort des adaptiven Immunsystems bei. Sie entwickeln sich im Knochenmark und besitzen bereits in frühen Stadien einen unreifen B-Zell-Rezeptor, dessen Autoreaktivität ähnlich dem T-Zell-Rezeptor via positiver und negativer Selektion getestet wird. Nicht-autoreaktive B-Zellen wandern in sekundär lymphatische Organe und entwickeln sich zu naiven B-Zellen. Naive B-Zellen zirkulieren zwischen sekundär lymphatischen Organen und Blut, bis sie auf ein für sie spezifisches Antigen treffen. B-Zellen sind neben Makrophagen und Dendritischen Zellen zur Antigenpräsentation fähig. Körperfremde Antigene werden vom B-Zell-Rezeptor gebunden, intrazellulär prozessiert und schließlich mittels MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Oberfläche von B-Zellen präsentiert. T-Helferzellen (TH) binden an das präsentierte Antigen und aktivieren über diese Interaktion B-Zellen. Weiterhin sezernieren TH Zytokine, insbesondere IL-4, die die Entwicklung von B-Zellen fördern. Schließlich differenzieren sich B-Zellen über Plasmablasten zu Plasmazellen, welche für das initial gebundenen Antigen spezifische Antikörper produzieren. Dabei werden die fünf Antikörper-Klassen IgM, IgG, IgD, IgE und IgA unterschieden (82,129).

In der frühen Phase der adaptiven Immunantwort werden IgM produziert, die eine tendenziell geringe Affinität aufweisen. Daraufhin erfolgt ein Klassenwechsel, der durch Zytokine beeinflusst wird. Beispielsweise hemmen sowohl IFN- γ als auch IL-4 die Bildung von IgM; gleichzeitig fördert IFN- γ die Bildung der Antikörper-Isotypen IgG2a und IgG3, während IL-4 die Bildung von IgG1 und IgE verstärkt. Ergebnis des Klassenwechsels sind somit spezialisierte, hochaffine Antikörper (42,156).

Neben antikörperbildenden Plasmazellen bilden sich auch B-Gedächtniszellen aus, die im Falle einer Reinfektion mit dem gleichen Antigen proliferieren und somit eine schnelle und spezifische Immunantwort auslösen (3,66).

1.3 Immunologie des Pleuraergusses

1.3.1 Immunologische Analysen von Pleuraergüssen

Die Bestimmung von Laborparameter der Klinischen Chemie, wie Gesamtprotein, LDH, Glucose oder Amylase ist in der Diagnostik von Pleuraergüssen (PE) ein etabliertes Vorgehen (102,158). Im Gegensatz dazu haben immunologische Analysen von PE in der klinischen Praxis bisher keine Bedeutung. Nichtsdestotrotz gibt es eine steigende Anzahl an Untersuchungen, die immunologische Parameter zur diagnostischen Differenzierung von PE nutzen. Dabei wird hauptsächlich die Differenzierung von malignen, tuberkulösen und parapneumonischen PE angestrebt. Im Rahmen dessen werden meist Zytokinanalysen von PE durchgeführt, während Analysen von Immunzellen in PE seltener sind.

So wurden zur Differenzierung maligner und tuberkulöser PE in verschiedenen Studien unter anderem die Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-31, IL-36, TNF, INF- γ herangezogen (51,154,191). Eine von Zeng et al. veröffentlichte Metaanalyse analysierte Muster von Zytokinen in PE und ergab, dass die TH1-Immunantwort in tuberkulösen PE prädominant ist, während maligne Pleuraergüsse eher eine TH2-spezifische Immunantwort aufweisen (191).

Auch durch Pneumonien verursachte parapneumonische PE lassen sich durch Zytokinanalysen von anderen Arten von PE differenzieren (2,7,115). Zudem ist die Unterscheidung von Transsudaten und Exsudaten via Zytokininanalyse möglich (2,115).

Eine Sonderform von PE sind Chylothoraces, die durch Verletzungen des Ductus thoracicus zum Beispiel während Operationen im Thorax entstehen. Die im Ductus thoracicus transportierte Lymphe sammelt sich daraufhin in der Pleurahöhle an (100,148). Die Akkumulation spezifischer Leukozytenpopulationen im Chylus führt zur Depletion ebendieser Leukozytenpopulationen in Blut (116,133). Ob der Verlust immunologischer Faktoren wie Leukozyten durch die Drainage eines PE zu einer klinisch relevanten Einschränkung des Immunsystems führt ist noch nicht abschließend geklärt.

1.3.2 Immunologie von Pleuraergüssen nach kardiochirurgischer Operation

Die Prävalenz angeborener Herzfehler in Deutschland liegt bei circa 1 Prozent (59,90). Bei hämodynamisch relevanten Herzfehler sind kardiochirurgische Operationen oder interventionelle Eingriffe indiziert. Kardiochirurgische Operationen sind im Kindesalter mit einer hohen Morbidität bzw. Mortalität assoziiert, die im Neugeborenenalter 30 bzw. 10 Prozent beträgt (73). Pleuraergüsse (PE) treten als Komplikation nach kardiochirurgischer Operation pädiatrischer Patienten mit einer Inzidenz von bis zu 25 Prozent auf (63,80). Im Vergleich dazu lag die Inzidenz von PE bei Erwachsenen nach kardiochirurgischer Operationen in einer Studie mit mehr als 2800 Patienten bei nur circa 7 Prozent (80). Anhaltende PE nach kinderkardiochirurgischen Operationen führen zu längeren Aufenthalten auf der Intensivstation und erhöhen das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko (92).

Einleitung

Die Entstehung von PE nach kinderkardiochirurgischen Operationen wird unter anderem durch immunologische Faktoren bedingt. So führen kardiochirurgische Operationen zu einer Ausschüttung von Zytokinen und Komplementfaktoren (49). Zudem zeigt sich eine Verschiebung der Anteile von Leukozytensubpopulationen und es treten Veränderungen von Oberflächenmarkern auf Leukozyten auf (112,141). Im Rahmen angeborener Herzfehler können immunologische Veränderungen auftreten, welche Auswirkungen auf die Permeabilität des Gefäßsystems haben und zu peripheren Ödemen, Aszites und Pleuraergüssen führen können (16,17,161).

Auch im präoperativen Zustand liegen immunologische Risikofaktoren für die Entwicklung von Pleuraergüssen nach kinderkardiochirurgischer Operation vor. So weisen erhöhte Werte von TNF, C3, C5 und sE-Selektin auf eine bereits präoperativ vorliegende, erhöhte Vulnerabilität des Endothels mit erhöhtem Risiko postoperativer PE hin (16). Auch die präoperative Erhöhung von Aktivitäts- und Adhäsionsmarkern auf Monozyten, Neutrophilen und Eosinophilen sind unabhängige Risikofaktoren für postoperative PE kinderkardiologischer Patienten (161).

Somit bewirken prä- und intraoperative immunologische Veränderungen die Entstehung von PE. Umgekehrt werden die Auswirkungen postoperativer PE kinderkardiologischer Patienten auf das Immunsystem diskutiert.

1.4 Ziele der Arbeit

Pleuraergüsse sind ein in der klinischen Praxis häufiges Phänomen und bedürfen akkurater Diagnostik. Diagnostische Aufarbeitung von Pleuraergüssen in der Klinischen Chemie, der Mikrobiologie und der Pathologie sind alltägliche Standardverfahren.

Im Gegensatz dazu haben immunologische Analysen von Pleuraergüssen noch keinen Stellenwert in der Klinik, sondern bisher nur in der Forschung. Bis dato lag der Fokus immunologischer Analysen von Pleuraergüssen auf der Differenzierung maligner und tuberkulöser Pleuraergüsse. Dabei wurden meist erwachsene Patienten untersucht; Studien pädiatrischer Patienten mit Pleuraergüssen umfassten nur kleine Stichproben. Zudem wurden bisher fast ausschließlich isoliert entweder Zell- oder Zytokin- oder Genanalysen durchgeführt. Weiterhin wurden diese Analysen entweder nur in Pleuraergüssen oder nur in Blutproben von Patienten mit Pleuraergüssen durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit soll sich in folgenden Aspekten von der bisher publizierten Literatur unterscheiden:

1. Das untersuchte Patientenkollektiv soll pädiatrische Patienten umfassen und dabei ein vergleichsweise großes Patientenkollektiv darstellen.
2. Die untersuchte Art von Pleuraergüssen soll Folge kardiochirurgischer Operationen sein.
3. Die immunologischen Analysen sollen sich ergänzende Zell- und Zytokin- und Genanalysen umfassen.
4. Die immunologischen Analysen sollen sowohl in Pleuraergüssen als auch in Blutproben durchgeführt werden.

Zur grundlegenden immunologischen Charakterisierung von Pleuraergüssen pädiatrischer Patienten nach kardiochirurgischer Operation wurden folgende Ziele angestrebt:

- A) Etablierung einer Methode zur Aufarbeitung von Pleuraergüssen, die konsekutive immunologische Analysen ermöglicht
- B) Biochemische Charakterisierung der Pleuraergüsse zur Einteilung in Trans- und Exsudate
- C) Simultaner Vergleich von Leukozytensubpopulationen in Blut und Pleuraerguss
- D) Simultaner Vergleich von Zytokinen in Blut und Pleuraerguss
- E) Simultaner Vergleich von Genexpressionen in Blut und Pleuraerguss
- F) Messung der Korrelation zwischen Leukozytensubpopulationen in Blut und Pleuraerguss
- G) Messung der Korrelation zwischen Zytokinen in Blut und Pleuraerguss
- H) Messung der Korrelation zwischen Leukozytensubpopulationen und Zytokinen in Blut bzw. Pleuraerguss
- I) Beurteilung des Einflusses demographischer und klinischer Faktoren auf immunologische Charakteristika von Pleuraergüssen

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

In Tabelle 2 sind die in vorliegender Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Softwares aufgelistet.

Tabelle 2: Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software

Hersteller	Geräte / Verbrauchsmaterialien / Software
ATMOS MedizinTechnik GmbH, Lenzkirch	C 051 Thorax
Bandelin electronic GmbH, Berlin	Sonorex RK 255 H
Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA	FlowJo™ v10 Software
	FACSCelesta™ Cell Analyzer
	FACSDIVA™ Software
Benchmark Scientific, Sayreville, USA	Microplate Microcentrifuge
Brand GmbH & Co. KG, Wertheim	Einkanal-Mikroliterpipetten Transferpette® S
Eppendorf SE, Hamburg	Centrifuge 5415 R
	Centrifuge 5810 R
	Mastercycler® gradient
	ThermoMixer® C
GraphPad Software, Inc., San Diego, USA	GraphPad Prism Software, Version 10.0.2
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	Zentrifugenröhrchen
	Cellstar® 96 Well Cell Culture Plate
Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen	Zentrifuge EBA 12
logos biosystems, Anyang, Südkorea	LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter
	LUNA™ Cell Counting Slide
Luminex Corporation, Austin, USA	MAGPIX® System
Merck KGaA, Darmstadt	Belysa™ Curve Fitting Software
neoLab Migge GmbH, Heidelberg	Cellcamper® Mini
SAP SE, Walldorf	C21 Produktiv System
Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht	Reaktionsgefäß 5 ml, 15 ml und 50 ml
	S-Monovette® K3 EDTA, 4,9 ml
	Micro-Probengefäß K3 EDTA, 1,3 ml
Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz	Infinite® 200 ProM Plex
Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA	NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer
	7500 Fast Real-Time PCR System

2.1.2 Chemikalien

In Tabelle 3 sind die in vorliegender Arbeit verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 3: Chemikalien

Hersteller	Gerät / Software
BD Biosciences, San Diego, USA	BD™ CellWash
	BD™ FACSRinse
	BD™ FACSClean
	BD Pharmingen™ Stain Buffer (BSA)
	BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer
	BD FACSuite™ CS&T Research Beads
	BD FACS™ Lysing Solution (1:10)
	BD Horizon™ Fixable Viability Stain 780
Linaris, Wertheim-Bettingen	FicoLite-H
logos biosystems, Anyang, Südkorea	Acridin Orange / Propidium Iodide Stain F23001
Merck KGaA, Darmstadt	Milliplex® Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel
	Milliplex® Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A Magnetic Bead Panel
	Phosphate-buffered saline (PBS)
	Dimethylsulfoxid (DMSO)
Quantabio, Beverly, USA	qScript® cDNA Supermix
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	High Pure RNA Isolation Kit
Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA	ProcartaPlex™ Human Th1/Th2/Th9/Th17 Cytokine Panel, 18plex
	TaqMan™ Multiplex Master Mix
	Pierce™ BCA Protein Assay Kit
	Gibco® Qualified Fetal Bovine Serum (FBS)

2.1.3 Antikörper

Im Rahmen der Durchflusszytometrie wurden die in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgelisteten Antikörper verwendet. Tabelle 4 listet die Detektionsantikörper auf, welche für Probenanalysen und FMO-Kontrollexperimente verwendet wurden. Tabelle 5 stellt die verwendeten Antikörper der Isotyp-Kontrollexperimente dar. Alle Antikörper stammen von Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, USA.

Tabelle 4: Detektionsantikörper für durchflusszytometrische Analysen

Marker	Fluorochrom	Klon	Spezies	Isotyp	Katalog-nummer	RRID-Nummer
CD3	BV786	SK7	Maus	IgG ₁	563800	AB_2744384
CD4	PE-CF594	SK3	Maus	IgG ₁	566317	AB_2739679
CD8	FITC	SK1	Maus	IgG ₁	347313	AB_400279
CD14	BV421	MΦP9	Maus	IgG _{2b}	563743	AB_2744289
CD16	PE	3G8	Maus	IgG ₁	555407	AB_395807
CD19	APC-R700	HIB19	Maus	IgG ₁	564977	AB_2744308
CD20	BB700	2H7	Maus	IgG _{2b}	745889	AB_2743319
CD25	BV421	M-A251	Maus	IgG ₁	562442	AB_11154578
CD27	BV650	L128	Maus	IgG ₁	563228	AB_2744352
CD38	FITC	HB7	Maus	IgG ₁	340927	AB_400180
CD43	BV605	1G10	Maus	IgG ₁	563378	AB_2738166
CD45RO	BV605	UCHL1	Maus	IgG _{2a}	562791	AB_2744411
CD56	APC	B159	Maus	IgG ₁	555518	AB_398601
CD62L	BB700	SK11	Maus	IgG _{2a}	745995	AB_2743396
CD127	Alexa-Fluor 647	HIL-7R-M21	Maus	IgG ₁	558598	AB_647113
CD183	BV480	CXCR3	Maus	IgG ₁	746283	AB_2743613
CD194	PE	1G1	Maus	IgG ₁	551120	AB_394054
CD196	APC-R700	CCR6	Maus	IgG ₁	565173	AB_2739092
CD294	BV650	BM16	Ratte	IgG _{2a}	740616	AB_2740314
IgD	PE-CF594	IA6-2	Maus	IgG _{2a}	562540	AB_11153129
IgM	BV480	G20-127	Maus	IgG ₁	566146	AB_2739544

Tabelle 5: Isotyp-Antikörper für durchflusszytometrische Kontrollexperimente

Klon	Spezies	Isotyp	Fluorochrom
X-40	mouse	IgG ₁	BV421
X-40	mouse	IgG ₁	BV480
G155-178	mouse	IgG _{2a}	BV605
R35-95	rat	IgG _{2a}	BV650
X-40	mouse	IgG ₁	BV786
MOPC-21	mouse	IgG ₁	FITC
MOPC-21	mouse	IgG ₁	PE
X-40	mouse	IgG ₁	PE-CF594
G155-178	mouse	IgG _{2a}	BB700

Tabelle 5 (Fortsetzung): Isotyp-Antikörper für durchflusszytometrische Kontrollexperimente

Klon	Spezies	Isotyp	Fluorochrom
MOPC-21	mouse	IgG ₁	Alexa-Fluor 647
X-40	mouse	IgG ₁	APC-R700
X-40	mouse	IgG _{2b}	BV421
X-40	mouse	IgG ₁	BV480
X-40	mouse	IgG ₁	BV605
R35-95	mouse	IgG _{2a}	BV650
X-40	mouse	IgG ₁	BV786
MOPC-21	mouse	IgG ₁	FITC
MOPC-21	mouse	IgG ₁	PE
G155-178	mouse	IgG _{2a}	PE-CF594
27-35	mouse	IgG _{2b}	BB700
MOPC-21	mouse	IgG ₁	Alexa-Fluor 647
X-40	mouse	IgG ₁	APC-R700

2.1.4 Beads

In Tabelle 6 sind die in im Rahmen der Zytokinanalysen (Multiplex- und Singleplex-Immunoassays) verwendeten Kits inklusive Beads aufgelistet.

Tabelle 6: Beads für Multiplex- und Singleplex-Immunoassays

Kit; Hersteller	Beads
Milliplex® Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel; Merck KGaA, Darmstadt	Anti-Human IL-4
	Anti-Human IL-5
	Anti-Human IL-6
	Anti-Human IL-7
	Anti-Human IL-8
	Anti-Human IL-10
	Anti-Human IL-12p70
	Anti-Human IL-13
	Anti-Human IL-17A
	Anti-Human INF-γ
	Anti-Human TNF
Milliplex® Human Cytokine / Chemokine / Growth Factor Panel A Magnetic Bead Panel HCYTA-60K-1; Merck KGaA, Darmstadt	Anti-Human GM-CSF
	Anti-Human IL-6

Tabelle 6 (Fortsetzung): Beads für Multiplex- und Singleplex-Immunoassays

Kit; Hersteller	Beads
ProcartaPlex™ Human Th1/Th2/Th9/Th17 Cytokine Panel, 18-Plex; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA	Anti-Human IL-1b
	Anti-Human IL-2
	Anti-Human IL-4
	Anti-Human IL-5
	Anti-Human IL-6
	Anti-Human IL-9
	Anti-Human IL-10
	Anti-Human IL-12p70
	Anti-Human IL-13
	Anti-Human IL-17A
	Anti-Human IL-18
	Anti-Human IL-21
	Anti-Human IL-22
	Anti-Human IL-23
	Anti-Human IL-27
	Anti-Human TNF
	Anti-Human INF-γ
	Anti-Human GM-CSF

2.1.5 Primer

Die in Tabelle 7 aufgelisteten Primer (DNA-Oligonukleotide) wurden für die qRT-PCR verwendet. Alle Primer stammen von Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA.

Tabelle 7: Primer für die qRT-PCR

Ziel-Gen	Fluoreszenzfarbstoff	Assay ID
<i>TNF</i>	FAM	Hs00174128_m1
<i>TBX21</i>	JUN	Hs00894392_m1
<i>IL-8</i>	VIC	Hs00174103_m1
<i>IL-17</i>	ABY	Hs99999082_m1
<i>GATA3</i>	JUN	Hs00231122_m1
<i>ACTB</i>	VIC	Hs00357333_g1

2.2 Studiendesign

Im Zeitraum von Juni 2021 bis September 2022 erfolgte die Patientenrekrutierung an den Kliniken für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes. Einschlusskriterien waren das Vorliegen eines Pleuraergusses und ein Alter zwischen 0 und 18 Jahren. Es gab keine Ausschlusskriterien. Die Einwilligung zur Teilnahme an der Studie erfolgte bei Patienten im Alter von 0 bis 13 Jahren durch die Eltern. Bei Patienten über 13 Jahren erfolgte eine gemeinsame Einwilligung von Patient und Eltern. Die Durchführung der Studie erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes bewilligt (Kenn-Nr. 57/20).

2.3 Methoden

2.3.1 Erhebung von Patientendaten

Klinische Daten der Patienten wurden mithilfe des Datensystems „SAP C21 Produktiv System“ erhoben. Laborparameter entstammten der klinischen Routinediagnostik. Die Auswertung der Daten erfolgte in pseudonymisierter Form (vgl. 3.2).

2.3.2 Probengewinnung

Bei Vorliegen eines Pleuraergusses (PE) wurde den Patienten zeitgleich eine venöse Blutprobe und eine Pleurapunktatprobe entnommen. Die Gewinnung der Blutprobe erfolgte im Rahmen einer ohnehin stattfindenden Blutentnahme. Die Blutprobe wurde in eine EDTA-Monovette gefüllt. Das maximal entnommene Volumen der Blutprobe wurde an das Körpergewicht des Patienten adaptiert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Volumen der Blutprobe in Abhängigkeit vom Körpergewicht des Patienten

Körpergewicht [kg]	Volumen der Blutprobe [ml]
< 2	0,5
≥ 2 bis < 5	1,0
≥ 5 bis < 10	2,0
≥ 10	4,0

Zur Gewinnung einer Pleurapunktatprobe erfolgte die Drainage eines Pleuraergusses mittels des Thoraxdrainagesystems Atmos C 051 Thorax. Ein Teil der Pleurapunktatprobe wurde für die klinische Routinediagnostik verwendet. Der Rest der Pleurapunktatprobe wird normalerweise als Abfallprodukt verworfen. Dieser Rest wurde im Rahmen dieser Arbeit für immunologische Analysen genutzt. Blut- und PE-Probe wurden bis zur weiteren Aufarbeitung am selben Tag bei 4 °C gelagert.

2.3.3 Aufarbeitung der Blutproben

Die Blutproben wurden entsprechend dem Ausgangsvolumen wie folgt aufgeteilt: Aus einem oder mehreren 500 µl Aliquots erfolgte die Isolierung von PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) (2.3.3.1). Volumina zwischen 100 - 500 µl wurden für die Isolierung von Blutplasma genutzt (2.3.3.2).

2.3.3.1 Isolierung von PBMC

Die Isolierung der PBMC entsprach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurden 500 µl Aliquots der Blutprobe 1:1 mit PBS verdünnt. 750 µl FicoLite-H wurden in Reaktionsgefäße vorgelegt. Das FicoLite-H wurde mit der verdünnten Blutprobe beschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (15 min, 300 g). Da Blut als heterogene Flüssigkeit Bestandteile unterschiedlicher Dichte aufweist, ordneten sich diese Bestandteile durch die Zentrifugation in voneinander abgrenzbaren Schichten an (Abbildung 7). FicoLite-H, ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer mit einem Dichtewert von 1077 g/ml, fungierte dabei als Trennschicht.

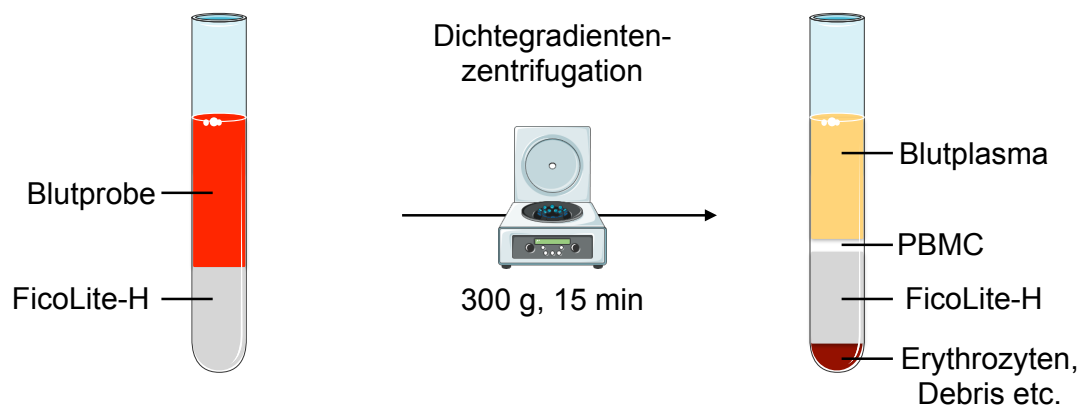


Abbildung 7: Dichtegradientenzentrifugation von Blutproben

Durch die Zentrifugation wurden die Bestandteile der Blutprobe entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Aufgrund der hohen Dichte sammelten sich u.a. Erythrozyten, Granulozyten und Debris am Boden des Reaktionsgefäßes. Die Dichte von PBMC liegt zwischen der von FicoLite-H (1,077 g/ml) und Blutplasma (1,026 g/ml). Folglich sammelten sich PBMC in einer abgrenzbaren Schicht und konnten isoliert werden. Im Rahmen der Dichtegradientenzentrifugation anfallendes Blutplasma wurde nicht zu Analysezwecken verwendet. Abbildung erstellt mit BioRender.com

Die PBMC wurden in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit 1 ml PBS gewaschen (10 min, 200g). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde eine Bild-basierte automatische Zellzählung durchgeführt und der Waschschrift wiederholt. Das nach dem zweiten Waschschrift entstandene Zellpellet wurde in einem Einfriermedium aus 900 µl Dimethylsulfoxid und 100 µl Fetalem Kälberserum resuspendiert und bei -80 °C in einem Cellcamper® bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.3.3.2 Separation von Blutplasma

Die Separation von Blutplasma erfolgte durch Zentrifugation der Blutprobe (10 min, 4.800 g) und anschließendes Abpipettieren des Blutplasmas. Bis zur weiteren Analyse wurde es bei -80°C gelagert. Das während der Dichtegradientenzentrifugation separierte Blutplasma wurde aufgrund der Verdünnung mit FicoLite-H nicht zu Analysezwecken verwendet.

2.3.4 Aufarbeitung der Pleurapunktatproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst eine Methode zur Aufarbeitung und Gewinnung von Pleurapunktatproben etabliert. Ziel der Methode war die Gewinnung von Immunzellen aus Pleurapunktatproben für zellbiologische und molekularbiologische Analysen und die Gewinnung von zellfreiem Pleurapunktatüberstand für proteinbiochemische Analysen. Die Methode wird im Ergebnisteil beschrieben (3.4).

2.3.5 Zellbiologische Analysemethoden

2.3.5.1 Bild-basierte automatische Zellzählung

Mittels Bild-basierter automatischer Zellzählung konnte die Anzahl lebender, kernhaltiger Zellen gemessen werden. Dazu wurden 10 µl der zu analysierenden Probe mit 1,2 µl des Fluoreszenzfarbstoffs Acridin Orange / Propidium Iodid (AO/PI) gemischt. AO/PI ermöglicht die Differenzierung toter und lebender kernhaltiger Zellen. 10 µl der mit AO/PI gefärbten Probe wurden auf LUNA™ Cell Counting Slides pipettiert. Durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 470 nm emittierten tote Zellen rote und lebende Zellen grüne Fluoreszenzsignale, die automatisiert ausgewertet wurden. Die automatische Zellzählung erfolgte mittels LUNA-FL™ Automated Cell Counter im Fluoreszenz-Modus.

2.3.5.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse struktureller und morphologischer Eigenschaften von Zellen. In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie verwendet, um Subpopulationen von PBMC und PEC zu identifizieren. Dafür wurden Oberflächenmarker von PBMC und PEC mit fluoreszenzmarkierten, monoklonalen Detektionsantikörpern gekoppelt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometer.

Die bei -80 °C gelagerten PBMC bzw. PEC wurden auf Eis akklimatisiert (5 min) und dann in Raumtemperatur-warmem Wasser aufgetaut (2 min). Die Zellen wurden anschließend jeweils im Verhältnis 1:5 in PBS resuspendiert und zentrifugiert (500 g, 10 min). Das entstandene Zellpellet wurde in adäquatem Volumen PBS resuspendiert und eine Bild-basierte automatische Zellzählung durchgeführt (2.3.5.1). Entsprechend den gemessenen Zellzahlen wurde die Zellsuspension wie in Tabelle 9 dargestellt aufgeteilt.

Tabelle 9: Aufteilung von PBMC und PEC für die Durchflusszytometrie und qRT-PCR

Wenn die vorhandene Zellzahl einer Probe nicht für alle drei Experimente ausreichte, wurde folgende Priorisierung durchgeführt: 1. Durchflusszytometrie: Analyse von T-Zellen, 2. RNA-Isolation für qRT-PCR, 3. Durchflusszytometrie: Analyse von Monozyten, Natürlichen Killerzellen (NK) und B-Zellen. Die angegebene Zellzahlen stellen Mindestangaben für die valide Auswertung der entsprechenden Experimente dar.

Priorisierung	Experiment	Zellzahl
1.	Durchflusszytometrie: T-Zellen	100.000 – 300.000
2.	RNA-Isolation für qRT-PCR	50.000 – 300.000
3.	Durchflusszytometrie: Monozyten, NK, B-Zellen	600.000

Die für die Durchflusszytometrie vorgesehenen Zellen wurden mit je 0,5 µl / 1 Mio. Zellen des Lebend-/Totfarbstoffs FVS780 inkubiert (15 min, RT, unter Lichtausschluss). Es folgte eine Waschzentrifugation (10 min, 500 g) mit jeweils 1 ml BD™ CellWash, um überschüssiges FVS780 zu entfernen. Die entstandenen Zellpellets wurden auf Grundlage ihrer Zellzahl in einem entsprechenden Volumen der jeweiligen Antikörpermixe resuspendiert und inkubiert (30 min, RT, unter Lichtausschluss; Tabelle 10). Beiden Antikörpermixen wurden jeweils 50 µl BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer und BD Pharmingen™ Stain Buffer (jeweils ad 100 µl Gesamtvolumen) hinzugefügt.

Tabelle 10: Pipettierschema Antikörpermixe Durchflusszytometrie

Antikörpermix A ermöglichte die durchflusszytometrische Analysen von T-Zellen. Antikörpermix B ermöglichte die durchflusszytometrische Analyse von Subpopulationen von Monozyten, Natürlichen Killerzellen und B-Zellen. Die dargestellten Konzentrationen beider Antikörpermixe sind exemplarisch für jeweils 300.000 Zellen dargestellt.

Antikörpermix A		Antikörpermix B		Kanal
Volumen [µl]	Antikörper [anti-]	Volumen [µl]	Antikörper [anti-]	
1,0	CD25	0,75	CD14	BV421
2,0	CD183	1,50	IgM	BV480
3,0	CD45RO	1,50	CD43	BV605
6,0	CD294	0,75	CD27	BV650
0,5	CD3	0,75	CD3	BV786
0,5	CD8	3,00	CD38	FITC
5,0	CD194	6,00	CD16	PE
0,2	CD4	1,50	IgD	PE-CF594
1,0	CD62L	3,00	CD20	BB700
6,0	CD127	7,50	CD56	APC
1,0	CD196	15,0	CD19	APC-R700

Nach der Inkubation wurde pro Zellsuspension 1 ml BD FACS™ Lysing Solution (1:10 mit H₂O verdünnt) hinzugefügt (5 min, RT, unter Lichtausschluss), um restliche störende Erythrozyten zu lysieren. Es folgte eine weitere Waschzentrifugation (10 min, 500 g) mit BD™ CellWash zur Entfernung lysierter Erythrozyten und ungebundener Detektionsantikörper. Das Zellpellet

wurde in 200 µl PBS resuspendiert und die Messung mit dem Durchflusszytometer FACSCelesta™ Cell Analyzer durchgeführt.

Im Durchflusszytometer wurden die mit Detektionsantikörpern gekoppelten Zellen durch einen Hüllstrom fokussiert. Dadurch passierten sie einzeln und nacheinander einen Messbereich, der Laser verschiedener Wellenlängen enthält. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer besitzt einen violetten (405 nm), blauen (488 nm) und roten (640 nm) Laser. Während die Zellen die Laser durchquerten, erfolgte eine Anregung der Fluorochrome der Detektionsantikörper. Die daraufhin emittierten Fluoreszenzsignale haben definierte Wellenlängen und sind für die jeweiligen Detektionsantikörper spezifisch. Anhand der emittierten Fluoreszenzsignale konnte auf Oberflächenmarker einer Zelle geschlossen werden. Die Kombination von Oberflächenmarkern ermöglichte die Differenzierung spezifischer Subpopulation. Die Auswertung erfolgte mittels FlowJo™ v10 (BD Biosciences) Software. Die Gating-Strategien für T-Zellen (Abbildung 8), B-Zellen (Abbildung 9) sowie Monozyten und NK (Abbildung 10) sind im Folgenden dargestellt.

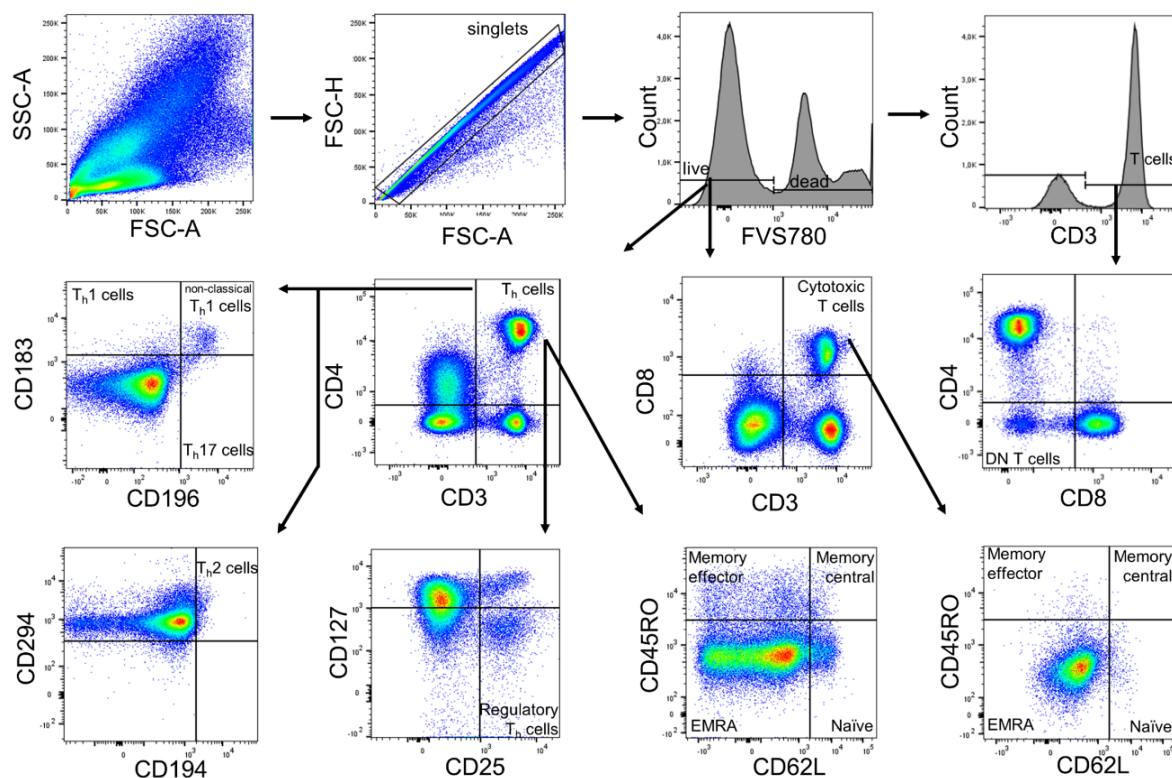


Abbildung 8: Gatingstrategie T-Zell-Populationen

Die Gatingstrategie von T-Zellen und deren Subpopulationen ist anhand einer repräsentativen PBMC-Probe eines Studienteilnehmers aufgeführt. Das Gating basierte im ersten Schritt auf morphologischen Parametern (FSC-H/FSC-A). Daraufhin wurden FVS780 negative Zellen als lebende Zellen definiert. Die CD3+ Fraktion wurde in CD4+ T-Helferzellen (TH) und CD8+ Zytotoxische T-Zellen (CTL) unterteilt. Beide Zellfraktionen wurden weiterhin in naive (CD45RO-CD62L+), EMRA (Effector memory re-expressing CD45RA, CD45RO-CD62L-), Gedächtnis Effektor- (CD45RO+CD62L-) und Gedächtnis Zentrale T-Zellen (CD45RO+CD62L+) unterteilt. CD4+ T-Helferzellen wurden zudem unterteilt in TH1 Zellen (CD183+CD196-), TH2 Zellen (CD194+CD294+) und TH17 (CD183-CD196+). Regulatorische T-Zellen wurden als CD25+ CD127- und doppelt-negative T-Zellen (DN T-Zellen) als CD3+CD4-CD8- definiert. (Daten dieser Abbildung wurden veröffentlicht in Flögel et al., 2024, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt).

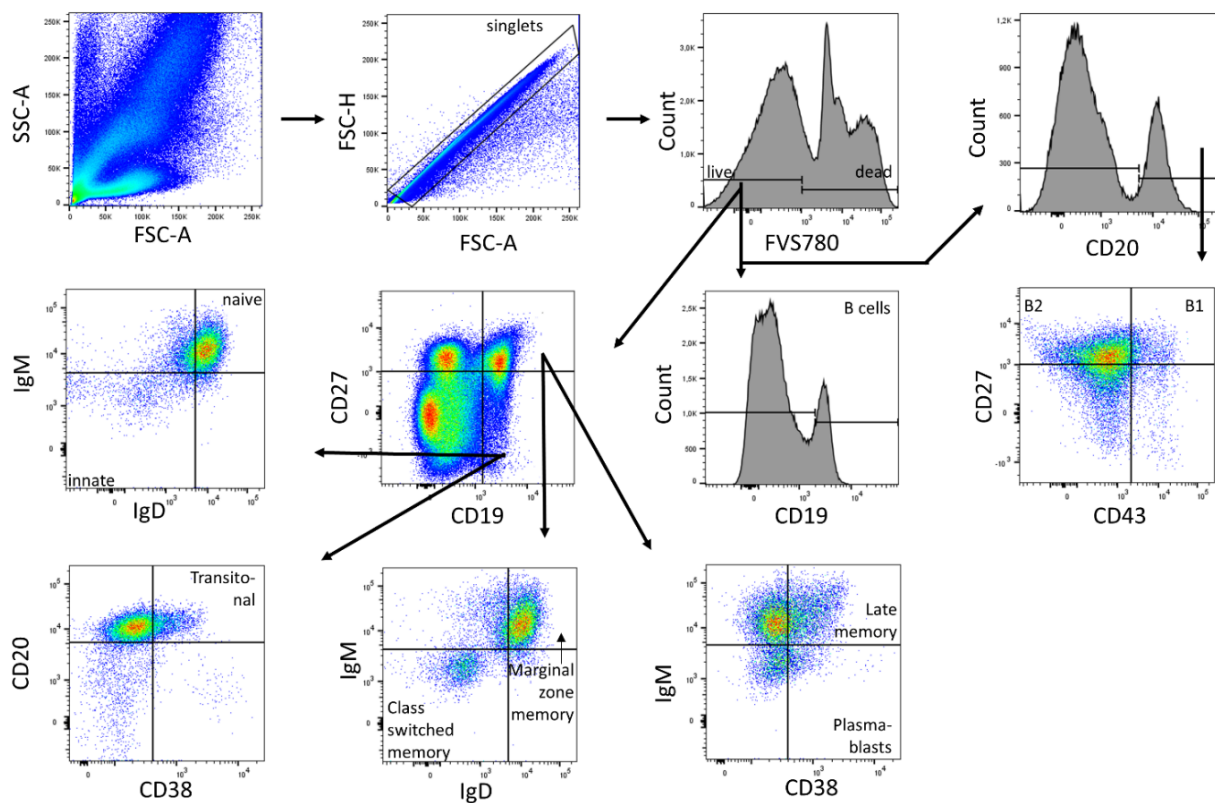


Abbildung 9: Gatingstrategie B-Zell-Populationen

Die Gatingstrategie von B-Zellen und deren Subpopulationen ist anhand einer repräsentativen PBMC-Probe eines Studienteilnehmers aufgeführt. Das Gating basierte im ersten Schritt auf morphologischen Parametern (FSC-H/FSC-A). Daraufhin wurden FVS780 negative Zellen als lebende Zellen definiert. Innerhalb der lebenden Zellen wurden CD19+ und CD20+ Zellen bestimmt. Die CD19+ Fraktion wurde unterteilt in CD27+ und CD27- B-Zellen. CD27+ Zellen wurden weiter unterteilt in Marginalzonen-ähnliche Gedächtnis B-Zellen (IgD+IgM+), Klassengewechselte Gedächtnis B-Zellen (IgD-IgM-), Späte Gedächtnis B-Zellen (CD38+IgM+) und Plasmablasten (CD38++IgM-). CD27- wurden unterteilt in angeborene B-Zellen (IgD-IgM-), naive B-Zellen (IgD+IgM+), and Transitionale B cells (CD20+CD38+). CD20+ wurden unterteilt in B1 Zellen (CD27+CD43+) und B2 Zellen (CD27+CD43-). (Daten dieser Abbildung wurden veröffentlicht in Flögel et al., 2024, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt).

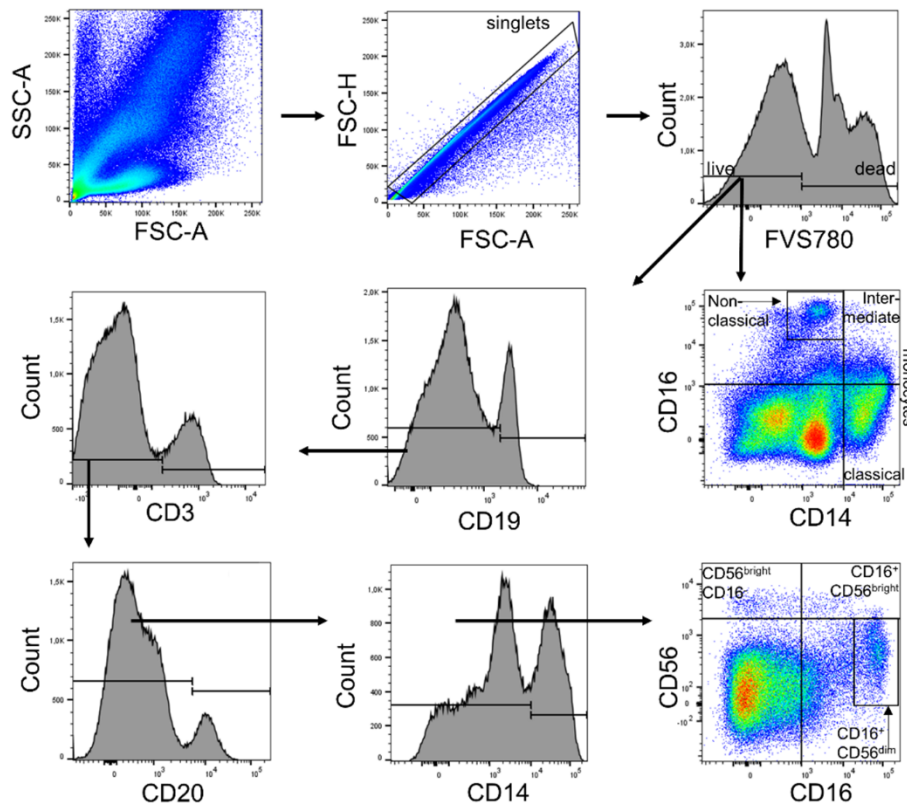


Abbildung 10: Gatingstrategie Monozyten bzw. Natürliche Killerzellen und jeweilige Subpopulationen

Die Gatingstrategie von Monozyten und Natürliche Killerzellen (NK) und deren Subpopulationen ist anhand einer repräsentativen PBMC-Probe eines Studienteilnehmers aufgeführt. Das Gating basierte im ersten Schritt auf morphologischen Parametern (FSC-H/FSC-A); daraufhin wurden FVS780 negative Zellen als lebende Zellen definiert. Zum einen wurden die lebenden Zellen in die folgenden Monozyten-Subpopulationen unterteilt: Monozyten ($CD14^+$), Klassische Monozyten ($CD14^+CD16^-$), Intermediäre Monozyten ($CD14^+CD16^+$) und Nicht-Klassische Monozyten ($CD14^{dim}CD16^+$). Des Weiteren erfolgte nach Ausschluss von $CD3^+$, $CD14^+$, $CD19^+$ und $CD20^+$ Zellen die Identifikation von NK (Gesamtheit der $CD16^+CD56^{bright}$ und $CD16^+CD56^{dim}$ und $CD16^-CD56^{bright}$) und deren einzelne Subpopulationen $CD16^+CD56^{bright}$ NK, $CD16^+CD56^{dim}$ NK und $CD16^-CD56^{bright}$ NK. (Daten dieser Abbildung wurden veröffentlicht in Flögel et al., 2024, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt).

2.3.5.3 Durchflusszytometrische Kontrollexperimente

Zur validen Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurden zwei Arten von Kontrollexperimenten durchgeführt. Dafür wurden PBMC eines gesunden, erwachsenen Spenders verwendet.

Fluorescence Minus One (FMO) – Kontrollexperimente dienen dem Ausschluss eines *Spillover*-Effekts der Fluoreszenzsignale anderer Detektionsantikörper und folglich der exakten Differenzierung positiver und negativer Populationen. Pro Antikörpermix (A bzw. B; siehe Tabelle 10) wurden 12 Kontrollexperimente durchgeführt. Dazu wurden die Antikörpermixe wie oben aufgeführt angesetzt; jedoch abzüglich jeweils eines Antikörpers. Der jeweils fehlende Antikörper fungierte als richtig-negative Kontrolle. Die weitere Vorbereitung und die Färbung von jeweils 300.000 Zellen pro Kontrollexperiment entsprachen dem oben beschriebenen Vorgehen.

Isotyp-Kontrollexperimente ermöglichten den Ausschluss unspezifischer Bindungen von Antikörpern. Isotyp-Antikörper gleichen einem Detektionsantikörper bezüglich Spezies, Fluoreszenzfarbstoff, schwerer und leichter Kette. Jedoch sind Isotyp-Antikörper spezifisch für Antigene, die auf den zu untersuchenden Zellen nicht vorhanden sind. Eine dennoch vorkommende Bindung ist folglich unspezifisch. Jedem Detektionsantikörper wurde ein entsprechender Isotyp-Antikörper zugeordnet. Die relativen Konzentrationen der Isotyp-Antikörper entsprachen denjenigen der korrespondierenden Antikörpermixe der Probenanalysen (Tabelle 10). Die Volumina der Isotyp-Antikörpermixe wurden auf 100.000 Zellen angepasst. Die sonstige Vorbereitung und Färbung der Zellen glichen dem oben beschriebenen Vorgehen.

Das Cytometer Setup and Tracking Module (CS&T, BD Biosciences) wurde verwendet, um die Performance, die Stabilität, die Fluoreszenzkalibrierungen des Durchflusszytometers und die Reproduzierbarkeit der Daten zu überprüfen und zu erhalten. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Daten, wurden Sphero™ Rainbow Calibration Particles (BD Biosciences) verwendet und die Einstellungen für jede Erfassung genutzt. Die Kompensationseinstellungen wurden mit BD™ CompBeads (BD Biosciences) berechnet.

2.3.6 Proteinbiochemische Analysemethoden

2.3.6.1 Bicinchoninsäure-Assay

Der Bicinchoninsäure- Assay (BCA-Assay) diente der Bestimmung der Proteinkonzentration in Blutplasma und Pleurapunktatüberstand. Er beruht auf zwei Reaktionen und einer anschließenden kolorimetrischen Messung. Die erste Reaktion ist eine durch Proteine vermittelte Reduktion von Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen. In einer zweiten Reaktion binden die entstandenen Kupfer(I)-Ionen an Bicinchoninsäure (BCA). Der violette Komplex aus Kupfer(I)-Ionen und BCA hat ein Absorptionsmaximum bei 562 nm. Mit steigender Proteinkonzentration nimmt das Ausmaß der Absorption linear zu.

Die Durchführung erfolgte mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits entsprechend den Herstellerangaben. Auf Grundlage von Vorversuchen wurden die Proben 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt, da sie sonst oberhalb des messbaren Bereichs lägen. Die verdünnten Proben und Standards mit bekannten Proteinkonzentrationen wurden in Triplikaten à 1 µl mittels NanoDrop™ One im Modus „Protein - BCA“ gemessen. Aus den Absorptionswerten der Standards erstellte der NanoDrop™ automatisiert eine Standardkurve, anhand derer die Proteinkonzentration der Proben bestimmt wurde.

2.3.6.2 Multiplex-Immunoassay

Multiplex-Immunoassays ermöglichen die simultane Bestimmung mehrerer Analyten in einer einzelnen Probe. In der vorliegenden Arbeit dienten sie der Messung von Zytokin-Konzentrationen in Blutplasma und Pleuraerguss (PE).

Grundlage der verwendeten Methode sind magnetische, 6,5 µm große Polystyrolkugeln, sogenannte Beads. Die Beads sind mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Beide Fluoreszenzfarbstoffe liegen in bis zu zehn Konzentrationsstufen vor. Dadurch ergeben sich bis zu 100 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten. Jede Kombinationsmöglichkeit definiert eine gleichartig gefärbte Bead-Gruppe. Auf jeder Bead-Gruppe sind monoklonale Fänger-Antikörper immobilisiert, die sowohl für die jeweilige Bead-Gruppe als auch für einen Analyten spezifisch sind. Bei Vorhandensein des zu messenden Analyten bildet sich ein Komplex aus Fänger-Antikörper und Analyten. Dieser Komplex wird ergänzt durch die Bindung eines fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörpers an den Analyten. Ungebundene Detektionsantikörper werden entfernt, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Aufgrund der magnetischen Eigenschaften der Beads lassen sich diese in einer eindimensionalen Schicht positionieren. Daraufhin werden Beads und Detektionsantikörper durch LEDs zur Emission von Fluoreszenzsignalen angeregt. Die Spektralbereiche der Fluoreszenzsignale von Beads und Detektionsantikörpern unterscheiden sich und werden von einer Kamera erfasst. Somit gelingt mittels Bestimmung der Bead-Gruppe eine qualitative Identifizierung des Analyten. Anschließend erfolgt mittels quantitativer Messung der Signalstärke der Detektionsantikörper die Konzentrationsbestimmung des jeweiligen Analyten.

Im Rahmen dieser Arbeit kamen drei Immunoassay-Panels (A, B und C; Tabelle 11) zur Anwendung: Panel A diente als Vortest der Auswahl geeigneter Parameter. Auf Grundlage der Ergebnisse des Vortests erfolgte die Auswahl der Parameter für Panel B. Panel B wurde für die Zytokinquantifizierung des gesamten Probenkollektives verwendet. Die bereits mittels Panel B bestimmten IL-6 Konzentrationen in PE wurden durch Panel C (Singleplex-Immunoassay – gleicht dem beschriebenen Prinzip der Multiplex-Immunoassays) präzisiert. Alle Immunoassays wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt und mittels MAGPIX® (Luminex Corp., Austin, TX, USA) analysiert. Zur Auswertung wurde die Belysa® Immunoassay Curve Fitting Software (Version 1.2, Millipore by Merck, Burlington, MA, USA) verwendet.

Tabelle 11: Panels mit Charakteristika der jeweiligen Immunoassays

	Panel A	Panel B	Panel C
Probenart	Blutplasma bzw. PE	Blutplasma bzw. PE	PE
Replikate (n)	3	3	3
Verdünnung	1:0, 1:4, 1:16	keine	1:4
Analyten	INF- γ , TNF, GM-CSF, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27	INF- γ , TNF, GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A	IL-6
Produkt	ProcartaPlex™ Human Th1 / Th2 / Th9/Th17 Cytokine Panel, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA	Milliplex® Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel, Merck, Darmstadt	Milliplex® Human Cytokine / Chemokine / Growth Factor Panel A Magnetic Bead Panel, Merck, Darmstadt
Analyten (n)	18	12	1

2.3.7 Molekularbiologische Analysemethoden

2.3.7.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Die RNA-Isolation aus PBMC und PEC basiert auf dem Prinzip der „*spin column-based nucleic acid purification*“. Sie wurde mithilfe des High Pure RNA Isolation Kits (Roche Diagnostics GmbH) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Zuerst wurden mindestens 50.000 PBMC oder PEC lysiert. Die entstandenen freien Zellbestandteile wurden auf einen Siliciumdioxid enthaltenden Filter gegeben. Das Siliciumdioxid bindet RNA und DNA. Zum Schutz der gebundenen RNA wurden vorhandene RNasen durch chaotrope Salze inaktiviert. DNA wurde durch die Zugabe von DNaseI degradiert und dadurch von ihrer Bindung zum Filter gelöst. Waschzentrifugationen gemäß Protokoll entfernten die degradierte DNA, Verunreinigungen und alle Zellbestandteile außer RNA. Die nun isoliert vorliegende RNA wurde mittels 50 μ l Elutionspuffer vom Filter gelöst und bis zur cDNA-Synthese bei -80 °C gelagert.

Die Umschreibung von RNA in cDNA ermöglicht die Analyse ausschließlich kodierender Gensequenzen in der quantitativen real-time Polymerasekettenreaktion (2.3.7.3). Dafür wurde der qScript® cDNA Supermix entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Dieser enthält unter anderem Primer, Nukleotide und Reverse Transkriptase. Primer sind kurze Oligonukleotide. Die zur cDNA-Synthese verwendeten Primer binden an zufällige Stellen der einzelsträngigen RNA. Dadurch unterscheiden sie sich von den bei der qRT-PCR verwendeten Primern, die determinierte Bindungsstellen haben. Die Primer dienen dem Enzym Reverse Transkriptase als Ansatzpunkt. Reverse Transkriptase ist eine RNA-anhängige DNA-Polymerase. Sie ermöglicht die Bildung eines DNA-Strangs, der komplementär zur

vorliegenden RNA ist. Als Substrate zur Bildung des DNA-Strangs verwendet Reverse Transkriptase Nukleotide. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.7.2 Konzentrations- und Reinheitsmessung von cDNA und RNA

Nach der cDNA-Synthese wurden Konzentration und Reinheit der cDNA gemessen. Ebenso wurde mit der RNA direkt vor der cDNA-Synthese verfahren.

Die Konzentrations- und Reinheitsmessung erfolgte mittels NanodropOne™. Der NanodropOne™ ist ein Spektralphotometer, das die Extinktion in 1 µl einer Probe messen kann. Anhand der gemessenen Extinktion wird unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration von RNA und cDNA ermittelt. Zudem wird die Extinktion bei 260 nm (E_{260}) und 280 nm (E_{280}) gemessen. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm und das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm. Somit kann aus dem Quotienten $E_{260/280}$ die Reinheit der Probe ermittelt werden. Bei Verunreinigungen liegt der Wert unter 1,7. Werte zwischen 1,7 und 1,9 deuten auf das Vorliegen reiner DNA hin. Werte von circa 2,0 weisen auf das Vorliegen reiner RNA hin.

2.3.7.3 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Ziel der qRT-PCR ist die Bestimmung der Expressionsstärke spezifischer Gen-Sequenzen. Dafür wurden jeweils 10 µl ($\pm$ 50 ng) der synthetisierten cDNA, 5 µl TaqMan™ Multiplex Master Mix, 2 µl RNase-freies Wasser und 3 µl eines der beiden Sondenmixe (TaqMan™-Sonden) in ein Well einer 96-Well Platte gegeben. Es kamen zwei Sondenmixe zur Anwendung. Sondenmix A enthielt je 1 µl Primer für die Gene *TBX21*, *IL-8* und *TNF*; Sondenmix B enthielt je 1 µl Primer für die Gene *ACTB*, *GATA3* und *IL-17*. Jede Probe wurde in drei technischen Replikaten pro Sondenmix aufgetragen.

Die qRT-PCR wurde mittels 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) entsprechend den folgenden Bedingungen durchgeführt:

50 °C → 120 sec	(holding stage)
95 °C → 20 sec	(holding stage)
95 °C → 3 sec	(cycling stage)
60 °C → 30 sec	(cycling stage)

Während der Denaturierung wird die doppelsträngige cDNA in zwei zueinander komplementäre Einzelstränge aufgetrennt. An die Einzelstränge binden Primer und TaqMan™-Sonden. Primer begrenzen die zu amplifizierenden Gensequenz. TaqMan™-Sonden bestehen aus einer Oligonukleotidsequenz, an die ein Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und ein Quencher gekoppelt sind. Der Quencher unterdrückt aufgrund der räumlichen Nähe die vom Reporter-Fluoreszenzfarbstoff emittierten Signale. Während die Taq-DNA-Polymerase die von den

Primern begrenzte Gensequenz amplifiziert, baut sie gleichzeitig aufgrund ihrer Exonuklease-Aktivität die TaqManTM-Sonden ab. Folglich entfernen sich Quencher und Reporter-Fluoreszenzfarbstoff räumlich voneinander und ein Fluoreszenzsignal wird messbar. Anhand der Stärke des Fluoreszenzsignal bezogen auf die Anzahl der abgelaufenen Zyklen lässt sich der Ct-Wert ermitteln. Der Ct-Wert beschreibt den Zeitpunkt, ab dem die Stärke des Fluoreszenzsignal exponentiell zunimmt. Die Expressionsstärke eines Gens in Pleurapunktatproben im Verhältnis zu Blutproben wurde wie folgt berechnet:

- (1) $\Delta Ct (\text{Blutprobe}) = Ct (\text{Target-Gen}) - Ct (\text{Referenz-Gen})$
 - (2) $\Delta Ct (\text{Pleurapunktatprobe}) = Ct (\text{Target-Gen}) - Ct (\text{Referenz-Gen})$
 - (3) $\Delta\Delta Ct (\text{Pleurapunktatprobe}) = \Delta Ct (\text{Pleurapunktatprobe}) - \Delta Ct (\text{Blutprobe})$
 - (4) $\text{Expressionsstärke Target-Gen [\%]} = 2^{-\Delta\Delta Ct (\text{Pleurapunktatprobe})}$
-
- (1) Normalisierung der Ct-Werte der Target-Gene der Blutprobe auf das Referenzgen
 - (2) Normalisierung der Ct-Werte der Target-Gene der Pleurapunktatprobe auf das Referenzgen
 - (3) Normalisierung der Ct-Werte der Pleurapunktatprobe auf die als Kontrollprobe dienende Blutprobe
 - (4) Berechnung der relativen Expressionsstärke

Referenz-Gen = *ACTB*; Target-Gene = *IL-8*, *TBX21*, *GATA3*, *IL-17*, *TNF*

2.3.8 Statistische Methoden

Die Software Graphpad Prism (V10.1.1) diente der statistischen Auswertung. Die auszuwertenden Datensätze wurden mit dem D'Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung geprüft und sind als Median, IQR und Einzelwerte dargestellt. Durchflusszytometrische Daten sind als relative Werte in Relation zu entsprechenden Elternpopulationen dargestellt. Daten der Multiplex-Immunoassays sind als absolute Werte angegeben.

Die Korrelation zwischen verbundenen Stichproben wurde mittels des Korrelationskoeffizienten nach Spearman ermittelt. Die Signifikanz eines Unterschieds zwischen verbundenen Stichproben wurde mittels Wilcoxon-Test geprüft. Die Signifikanz eines Unterschieds zwischen unverbundenen Stichproben wurde mittels Mann-Whitney-U-Test geprüft. Das Signifikanzniveau lag bei 5 %.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Charakterisierung des Patientenkollektivs

31 Patienten wurden im Zeitraum von Juni 2021 bis September 2022 in die Studie eingeschlossen. 30 Patienten befanden sich in kinder-kardiologischer Behandlung, eine Patientin in kinderonkologischer Behandlung. Die onkologische Patientin (1,5 Jahre) hatte ein Neuroblastom und befand sich bei Auftreten des Pleuraergusses in präoperativem Zustand. Im Patientenkollektiv der n=30 kardiologische Patienten lag das Geschlechterverhältnis mit 21:9 auf Seiten der männlichen Patienten. Das mediane Alter betrug 22 Monate mit einem tendenziell niedrigeren medianen Alter der weiblichen gegenüber den männlichen Patienten (weiblich: 7 Monate vs. männlich 50 Monate). Alle kardiologische Patienten hatten angeborene Herzfehler, von denen die häufigsten Ventrikelseptumdefekt (VSD), Atriumseptumdefekt (ASD) und Persistierender Ductus arteriosus (PDA) waren. Es ist zu beachten, dass Kombinationen von Herzfehlern vorlagen und entsprechend kombinierte Operationen durchgeführt wurden. Die mediane Operationsdauer betrug 127 Minuten und es wurde in n=16 Fällen eine Herz-Lungen-Maschine (HLM) eingesetzt. Auch hier lag das Geschlechterverhältnis auf Seiten der männlichen Patienten mit n=11 Einsätzen der HLM und n=5 Einsätzen der HLM bei weiblichen Patienten. Die mediane Dauer von Operation bis zur simultanen Entnahme einer Blut- und Pleurapunktatprobe betrug 2 Tage. Klinisch relevante Eigenschaften der kinder-kardiologischen Patienten sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Klinische Daten der kinder-kardiologischen Patienten

Alter, operationsindizierender Herzfehler, durchgeführte Operation, Operationsdauer, Einsatz und Dauer des Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine sowie Dauer von OP-Ende bis Probenentnahme sind in absoluten Zahlen aufgetragen. Das Geschlecht wird in jeder vorgenannten Kategorie unterschieden. IQR = Interquartile Range, VSD = Ventrikelseptumdefekt, PDA = Persistierender Ductus arteriosus, PFO = Persistierendes Foramen ovale, CoA = Coarctation der Aorta (Aortenisthmusstenose). * = Mitralklappeninsuffizienz (n=1), Trikuspidalklappeninsuffizienz (n=1), Aortenklappenstenose (n=1), Pulmonalstenose (n=1), Hypoplastisches Linksherzsyndrom (n=2), Fallot-Tetralogie (n=1), Hypoplastischer Aortenbogen (n=1) und/oder Koronararterienanomalie (n=1). ** = Mitralklappenrekonstruktion (n=1), Trikuspidalklappenrekonstruktion (n=1), Ross-OP (n=1), Korrektur der Pulmonalstenose (n=1), Glenn-OP Pulmonalstenose (n=2), Fontan-OP, Korrektur der Fallot-Tetralogie Pulmonalstenose (n=1), Aortenbogenrekonstruktion mit Patch-Augmentation (n=1) oder Reimplantation des Ramus interventricularis anterior (n=1).

		Gesamt	weiblich	männlich
Patienten [n]		30	9	21
Alter [Monate]	Median	22	7	50
	IQR	3,8 – 101,8	3,0 – 54,0	3,5 – 125,5
	Range	0,0 – 225,0	0,0 – 120,0	0,0 – 225,0
Herzfehler mit OP-Indikation [n]	VSD	10	4	6
	PDA	6	1	5
	ASD Typ 2	4	2	2

Tabelle 12 (Fortsetzung): Klinische Daten der kinderkardiologischen Patienten

		Gesamt	weiblich	männlich
Herzfehler mit OP-Indikation [n]	Aortenklappenstenose	4	0	4
	CoA	3	1	2
	Weitere *	9	3	6
Operation [n]	VSD Verschluss	5	1	4
	Pulmonalarterielltes Banding	5	2	3
	PDA Verschluss	6	1	5
	ASD Verschluss	4	2	2
	Aortenklappenrekonstruktion	4	0	4
	CoA Rekonstruktion	3	1	2
	Weitere **	9	3	6
Operationsdauer [Minuten]	Median	127,0	173,5	125,0
	IQR	98 - 167	98,25 – 204,5	98,0 – 165,0
	Range	21,0 – 220,0	34,0 – 220,0	21,0 – 213,0
Herz-Lungen-Maschine [n]		16	5	11
Dauer des Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine [Minuten]	Median	71,0	105,0	60,0
	IQR	53,3 – 107,3	62,0 – 110,5	53,0 – 87,0
	Range	40,0 – 139,0	47,0 – 113,0	40,0 – 139,0
Dauer OP-Ende bis Probenentnahme [Tage]	Median	2,0	4,0	2,0
	IQR	1,0 – 3,5	2,0 – 5,0	1,0 – 3,0
	Range	1,0 – 8,0	2,0 – 8,0	1,0 – 4,0

3.2 Pseudonymisierung

Die Bearbeitung und Auswertung der Proben und Patientendaten erfolgte mittels eines Pseudonymisierungsschemas, das die folgenden Kriterien einschloss: Patient (Nummerierung), Probenart (Pleurapunktat oder Blut) und Aufarbeitungsart (Gewinnung von PBMC bzw. PEC oder Gewinnung von Blutplasma bzw. Pleurapunktatüberstand).

3.3 Probenauswahl für immunologische Analysen

Die Blut- und Pleurapunktatproben der kinderkardiologischen Patienten (n=30) wurden getrennt von denen der kinderonkologischen Patientin (n=1) analysiert. Dies diente der Homogenisierung des Patientenkollektivs hinsichtlich der Ätiologie des Pleuraergusses.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie (3.6), des Immunoassays (3.7), des Einflusses klinischer Faktoren (3.11) und die Methodenetablierung (3.4) beziehen sich allesamt auf die 30 kinderkardiologischen Patienten.

Die Ergebnisse der onkologischen Patientin wurden gesondert in Kapitel 3.10 dargestellt.

3.4 Etablierung einer Methode zur Aufarbeitung von Pleurapunktatproben

Während die Aufarbeitung von Blutproben zur Gewinnung von PBMC und Blutplasma eine im Forschungslabor der Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes etablierte Methode ist, existierten keine standardisierten Vorgehensweisen bezüglich der Aufarbeitung von Pleurapunktatproben. Ziel der neu zu etablierenden Methode war sowohl die Gewinnung von Immunzellen aus Pleurapunktatproben für zellbiologische und molekularbiologische Analysen als auch die Gewinnung von zellfreiem Pleurapunktatüberstand für proteinbiochemische Analysen.

3.4.1 Aufarbeitung der Pleurapunktatproben

Jede Pleurapunktatprobe wurde in Aliquots à 1,5 ml aufgeteilt und zentrifugiert (15 min, 16.100 g). Da Pleurapunktate Flüssigkeiten mit heterogenen Bestandteilen unterschiedlicher Dichte sind, ordneten sich diese Bestandteile durch die Zentrifugation in voneinander abgrenzbaren Schichten an. Am Boden des Reaktionsgefäßes bildet sich ein unter anderem Zellen enthaltender Bodensatz (Zellschicht). Darüber lag ein makroskopisch klarer Überstand (Pleurapunktatüberstand) (Abbildung 11).

In einem Vorversuch wurden weitere Zentrifugationsbedingungen (15 min, 300 g bzw. 15 min, 1.000 g bzw. 15 min, 10.000 g) getestet. Im Vergleich zur gewählten Einstellung lag bei gleicher Viabilität der Immunzellen eine makroskopisch unschärfere Trennung von Zellschicht und Pleurapunktatüberstand vor.

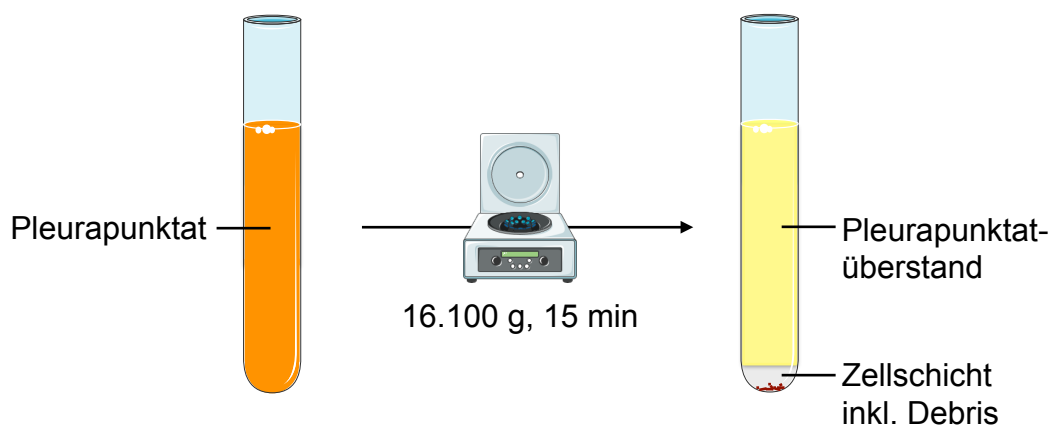


Abbildung 11: Methode zur Aufarbeitung von PE-Proben

Durch die Zentrifugation werden die Bestandteile der Pleurapunktate entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Immunzellen, weitere Zellen (z.B. Thrombozyten und Erythrozyten) und Debris sammeln sich am Boden des Reaktionsgefäßes. Darüber befindet sich zellfreier Pleurapunktatüberstand. Abbildung erstellt mit BioRender.com

Der Pleurapunktatüberstand wurde bis auf wenige Millimeter über der Zellschicht abpipettiert. Zur Überprüfung der Zellfreiheit des Pleurapunktatüberstandes wurden 10 µl desselben für eine Bild-basierte automatische Zellzählung (2.3.5.1) genutzt. Der Pleurapunktatüberstand wurde bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

Die Zellschicht wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit 1ml PBS gewaschen (10 min, 200g). Der entstehende Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde eine Bild-basierte automatische Zellzählung durchgeführt und der Waschschrift wiederholt. Die Zellen wurden in einem Einfriermedium aus 100 µl Dimethylsulfoxid und 900 µl Fetalem Kälberserum resuspendiert und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die aus Pleurapunktaten gewonnenen Zellen werden in dieser Arbeit als PEC (pleural effusion cells) bezeichnet.

3.4.2 Qualität der Aufarbeitung von Pleurapunktatproben

Die Aufarbeitung von Pleurapunktatproben war im Gegensatz zur beschriebenen Aufarbeitung von Blutproben eine neuartige Methode. Sie bildete die Grundlage für in dieser Arbeit durchgeführte zellbiologische, proteinbiochemische und molekularbiologische Analysen von Pleurapunktaten. Ziel war zum einen die Gewinnung einer möglichst hohen Anzahl lebender mononukleärer Zellen und zum anderen die Gewinnung eines zellfreien, aber proteinhaltigen Pleurapunktatüberstandes. Die Aufarbeitung der Pleurapunktatproben wurde anhand folgender Qualitätskriterien evaluiert:

- (1) Viabilität mononukleärer Zellen (PEC) in der Zellschicht
- (2) Zellfreiheit des Pleurapunktatüberstandes
- (3) Nachweis von Protein im Pleurapunktatüberstand

(1) Viabilität und Gesamtzahl mononukleärer Zellen in der Zellschicht von Pleurapunktatproben (PEC) wurden mittels Bild-basierter Automatischer Zellzählung erfasst (2.3.5.1). Die mediane Viabilität der PEC lag bei 89 % (Range: 56-99 %; n=21 kardiologische Patienten). Im Vergleich wiesen PBMC eine mediane Viabilität von 97 % auf (Range: 82-99 %; n=21 kardiologische Patienten). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Viabilität von PEC und PBMC ($p>0.05$). Eine vergleichende Darstellung der Viabilität von PEC und korrespondierenden PBMC ist in Abbildung 12 zu finden.

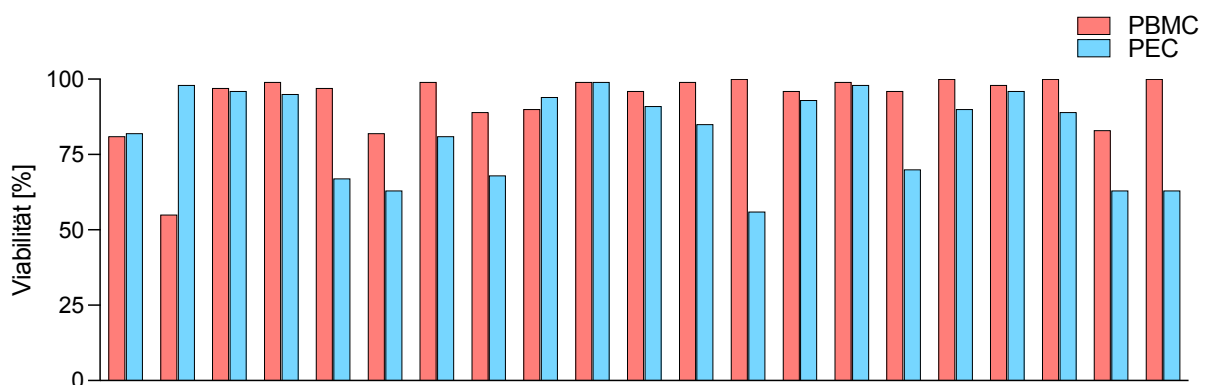


Abbildung 12: Darstellung der Viabilität von PBMC und PEC

Paarweise Darstellung der Viabilität korrespondierender PBMC und PEC pro Patient (n=21 kardiologische Patienten).

(2) Die Zellfreiheit des Pleurapunktatüberstandes wurde durch Bild-basierte Automatische Zellzählung (2.3.5.1) in den ersten 10 Pleurapunktatüberständen nachgewiesen. Die Zellzahl lag konsistent bei 0 Zellen pro ml.

(3) Der Nachweis von Proteinen im Pleurapunktatüberstand wurde mittels BCA-Assay durchgeführt (2.3.6.1). In allen gemessenen Pleurapunktatüberständen (n=27) waren Proteine nachweisbar. Das mediane Proteingehalt lag bei 47,7 g/l (Range 31,5 – 73,6 g/l).

3.5 Einteilung der Pleuraergüsse in Exsudate und Transsudate

Die Einteilung von Pleuraergüssen in Exsudate und Transsudate ist von pathophysiologischer und klinisch-diagnostischer Bedeutung. Es existieren verschiedene Kriterien und Grenzwerte zur Differenzierung.

Ein Kriterium ist die Proteinkonzentration des Pleuraergusses, welche bei Werten >30 g/l für ein Exsudat spricht. Alle untersuchten Pleuraergüsse (n=27) lagen oberhalb von 30 g/l (Median 47,7 g/l; Range 31,5 – 73,6 g/l) und können als Exsudate betrachtet werden.

Die Light-Kriterien sind der Goldstandard zur Differenzierung von Transsudaten und Exsudaten (1.1.5). Sie umfassen drei Kriterien, wobei die Erfüllung mindestens eines (≥ 1) Kriteriums das Vorliegen eines Exsudat anzeigt. Im Folgenden wird der Quotient aus der Proteinkonzentration in PE und der Proteinkonzentration im Plasma verwendet. Er zeigt bei Werten $>0,5$ ein Exsudat an. 16 der 18 ermittelten Quotienten lagen im Bereich $>0,5$ und waren demnach Exsudate (Median 0,75; Range 0,37 – 1,49) (Abbildung 13).

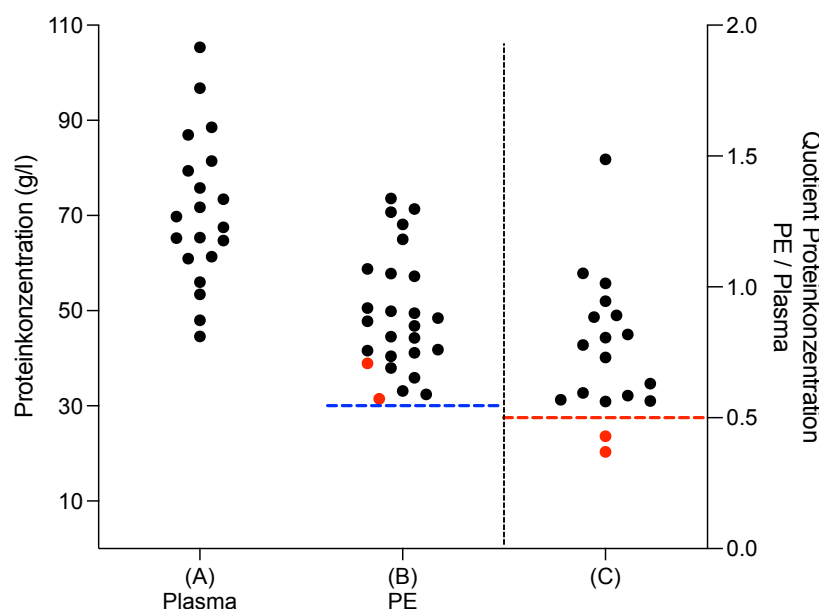


Abbildung 13: Proteinkonzentration in Plasma und Pleurapunktatüberstand und Quotient der Proteinkonzentration von Pleurapunktat und Plasma

Dargestellt sind die Einzelwerte der Proteinkonzentrationen von Plasma (A) und Pleurapunktatüberstand (B). Der jeweiligen Quotienten der Proteinkonzentrationen von Pleurapunktatüberstand und Plasma sind in (C) dargestellt. Oberhalb der blauen Linie gelegene Werte in (B) werden als Exsudate klassifiziert (Gesamtproteingehalt in PE > 30 g/l). Oberhalb der roten Linie gelegenen Werte in (C) werden entsprechend der Light-Kriterien als Exsudate klassifiziert (Quotient der Proteinkonzentration von Pleurapunktat und Plasma $> 0,5$). Die n=2 in (C) als Transsudate klassifizierten Pleuraergüsse sind in (B) und (C) rot markiert.

3.6 Leukozytensubpopulationen in Blut und Pleuraerguss

3.6.1 T-Zellen in Blut und Pleuraerguss

3.6.1.1 Nachweisbare T-Zell-Populationen in Blut und Pleuraerguss

Die Kombination der verwendeten Detektionsantikörper ermöglichte die Differenzierung von 16 T-Zell-Populationen (Tabelle 13). Es gelang der Nachweis aller 16 aufgeführten Populationen sowohl in Blut als auch in Pleuraergüssen. Die Konzentrationen der Zell-Populationen sind als Anteil an entsprechenden Elternpopulationen dargestellt. Konzentrationen der T-Zellen (CD3+) sind als Anteil an allen lebenden Zellen (FVS780-) angegeben. T-Helferzellen (TH, CD3+CD4+), Zytotoxische T-Zellen (CTL, CD3+CD8+) und doppelt-negative T-Zellen (DN T-Zellen, CD3+CD4-CD8-) haben als Elternpopulation T-Zellen (CD3+). Alle weiteren Subpopulationen von T-Helferzellen (n=7 Subpopulationen) und Zytotoxischen T-Zellen (n=4 Subpopulationen) beziehen sich auf T-Helferzellen (CD3+CD4+) bzw. Zytotoxische T-Zellen (CD3+CD8+) als Elternpopulation. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden an n=23 Blutproben und n=17 Pleurapunktaten durchgeführt.

Tabelle 13: Auflistung der analysierten T-Zell-Populationen und entsprechende Kombinationen von Oberflächenmarkern

TH = T-Helferzellen, CTL = Zytotoxische T-Zellen, EMRA = *Effector memory re-expressing CD45RA*, Treg = Regulatorische T-Zellen

Population	Oberflächenmarker
T-Zellen	CD3+
T-Helferzellen (TH)	CD3+CD4+
Zytotoxische T-Zellen (CTL)	CD3+CD8+
TH EMRA	CD3+CD4+CD62L-CD45RO-
Naive TH	CD3+CD4+CD62L+CD45RO-
Gedächtnis Zentrale TH	CD3+CD4+CD62L+CD45RO+
Gedächtnis Effektor TH	CD3+CD4+CD62L-CD45RO+
TH EMRA	CD3+CD8+CD62L-CD45RO-
Naive TH	CD3+CD8+CD62L+CD45RO-
Gedächtnis Zentrale CTL	CD3+CD8+CD62L+CD45RO+
Gedächtnis Effektor CTL	CD3+CD8+CD62L-CD45RO+
TH1	CD3+CD4+CD183+CD196-
TH2	CD3+CD4+CD194+CD294+
TH17	CD3+CD4+CD183-CD196+
Regulatorische T-Zellen (Treg)	CD3+CD4+CD25+CD127-
Doppelt-negative T-Zellen (DN T-Zellen)	CD3+CD4-CD8-

3.6.1.2 Vergleich von T-Zell-Populationen in Blut und Pleuraerguss

Die durchflusszytometrische Analyse korrespondierender Proben von Blut und Pleuraerguss (PE) zeigte keinen signifikanten Unterschied im relativen Anteil von T-Zellen (CD3+) an lebenden Zellen, auch wenn T-Zellen im PE eine tendenzielle quantitative Erniedrigung aufwiesen (Blut 17,0 % vs. PE 11,1 %, Abb. 14(A)). Das Gleiche galt für T-Helferzellen (TH, CD3+CD4+, Blut 53,8 % vs. PE 47,8 %, Abb. 14 (B)) und T-Killerzellen (CTL, CD3+CD8+, Blut 30,7 % vs. PE 24,5 %, Abb. 14 (C)). Das Ratio von TH zu CTL lag sowohl in Blut als auch PE auf Seiten der TH (Blut 1,5 vs. PE 2,0 , $p=0,6014$, Abb. 14 (J)). Doppelt-negative T-Zellen lagen in PE mit 18,7 % vor, in Blut mit 10,1 % (DN T-Zellen, CD3+CD4+CD8+, $p=0,1085$, Abb. 14 (D)).

Entsprechend der Gesamtheit an T-Helferzellen waren T-Helferzellen Typ 2 (TH2, CD3+CD4+CD194+CD294+) in Pleurapunktaten und Blut nicht signifikant unterschiedlich (Blut 4,8 % vs. PE 5,4 %, Abb. 14 (G)). Hingegen zeigten sowohl T-Helferzellen Typ 1 (TH1, CD3+CD4+CD183+196-) als auch T-Helferzellen Typ 17 (TH17, CD3+CD4+CD183-196+) eine signifikante Erhöhung in PE gegenüber Blut (TH1: Blut 1,3 % vs. PE 6,9 %, $p=0,0023$, Abb. 14 (F) bzw. TH17: Blut 0,6 % vs. PE 1,5 %, $p=0,0334$, Abb. 14 (H)). Regulatorische T-Zellen (Treg, CD3+CD4+CD25+127-) wiesen Tendenzen der Erhöhung in PE gegenüber Blut auf (Blut 10,2 % vs. PE 15,9 %, $p=0,14$, Abb. 14 (F)).

Die Ratio von TH1 zu TH2 war in Blut zugunsten der TH2 verschoben, in jedoch PE zugunsten der TH1 (Blut 0,3 vs. PE 1,2 , Abb. 14 (I)). Dabei war die Ratio von TH1 zu TH2 signifikant größer in PE als in Blut ($p=0,0004$).

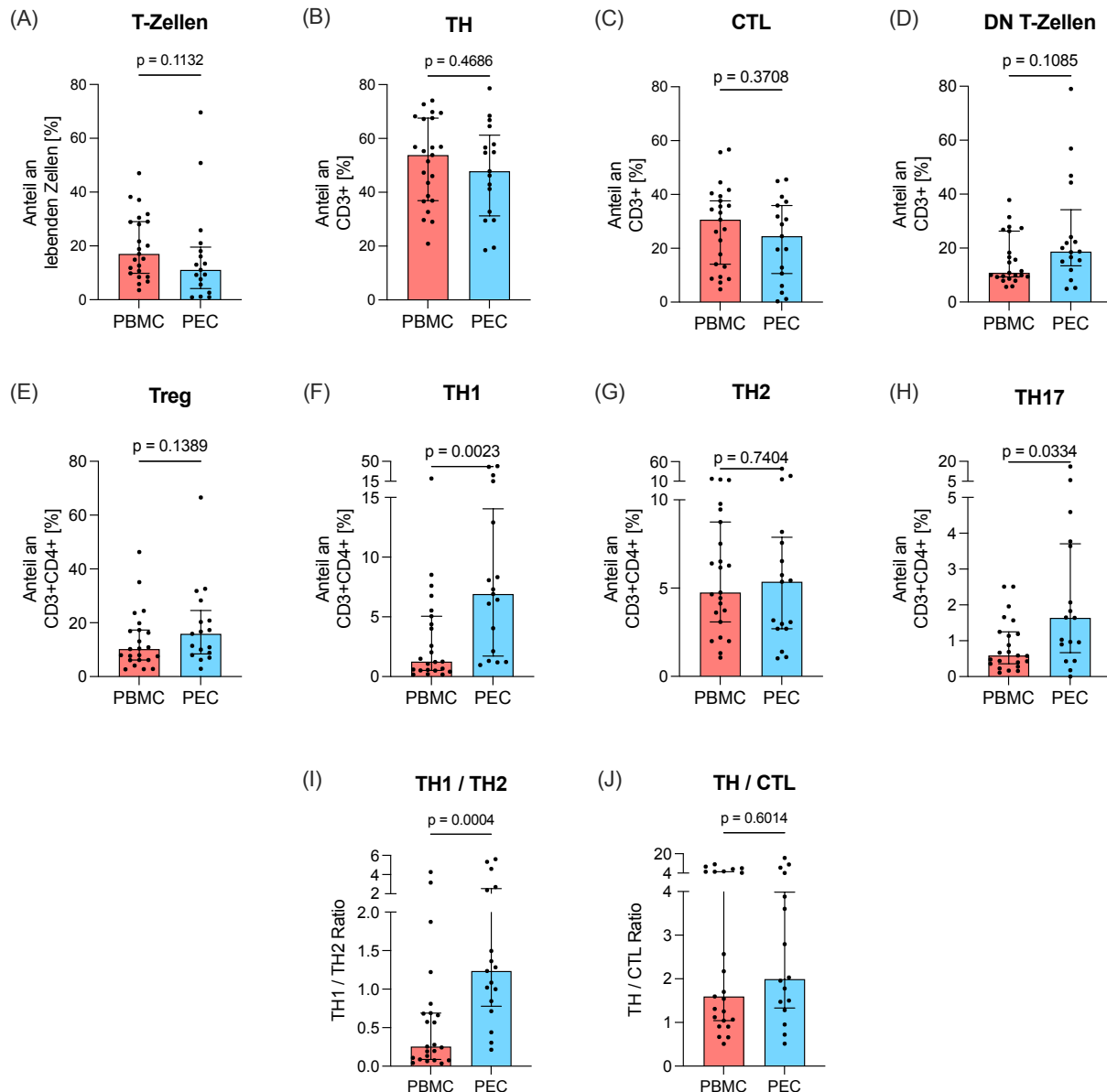


Abbildung 14: Vergleich von T-Zell-Populationen in Blut und Pleuraerguss

Dargestellt sind die Anteile von (A) T-Zellen, (B) T-Helferzellen (TH), (C) Zytotoxischen T-Zellen (CTL), (D) doppelt-negativen T-Zellen (DN T-Zellen), (E) Regulatorischen T-Zellen (Treg), (F) T-Helferzellen Typ 1 (TH1), (G) T-Helferzellen Typ 2 (TH2) und (H) T-Helferzellen Typ 17 (TH17) in Relation zu ihren jeweiligen Elternpopulationen in Blut (rot, PBMC) und Pleuraergüssen (blau, PEC). (I) zeigt den Quotienten von TH1 zu TH2 in Blut und Pleuraerguss. (J) zeigt den Quotienten von TH zu CTL in Blut und Pleuraerguss. Die Balken stellen den Median dar, Fehlerbalken den IQR und die Punkte sind die individuellen Datenpunkte in Blut (n=23) und Pleuraergüssen (n=17). Unterschiede wurden mittels zweiseitigem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. (Daten dieser Abbildung wurden veröffentlicht in Flögel et al., 2024, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt).

Die Messung der Oberflächenmarker CD45RO und CD62L ermöglichte die Analyse jeweils 4 weiterer Subpopulationen von T-Helferzellen bzw. Zytotoxischen T-Zellen.

Sowohl Gedächtnis Zentrale TH (Blut 8,1 % vs. PE 7,2 %, Abb. 15 (B)) als auch Gedächtnis Zentrale CTL (Blut 2,7 % vs. PE 2,3 %, Abb. 15 (F)) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Blut und PE. Das Gleiche galt für TH EMRA (Blut 49,4 % vs. PE 38,5 %, Abb. 15 (C)) und CTL EMRA (Blut 63,0 % vs. PE 61,0 %, Abb. 15 (G)).

Ergebnisse

Im Gegensatz dazu war in PE im Vergleich zu Blut ein signifikanter, quantitativer Anstieg von Gedächtnis Effektor CTL (Blut 17,6 % vs. PE 25,8 %, $p=0,0449$, Abb. 15 (E)) und eine starke Tendenz zur Erhöhung von Gedächtnis Effektor TH-Zellen (Blut 19,9 % vs. PE 33,3 %, $p=0,0633$, Abb. 15 (A)) zu beobachten. Ein kontrastierendes Muster wurde bei Naiven TH (Blut 4,2 % vs. PE 2,2 %, $p=0,0966$, Abb. 12 (D)) und Naiven CTL (Blut 6,0 % vs. PE 3,0 % $p=0,0848$, Abb. 15 (H)) beobachtet, mit jeweils tendenziell reduzierter Anzahl an Zellen in PE versus Blut.

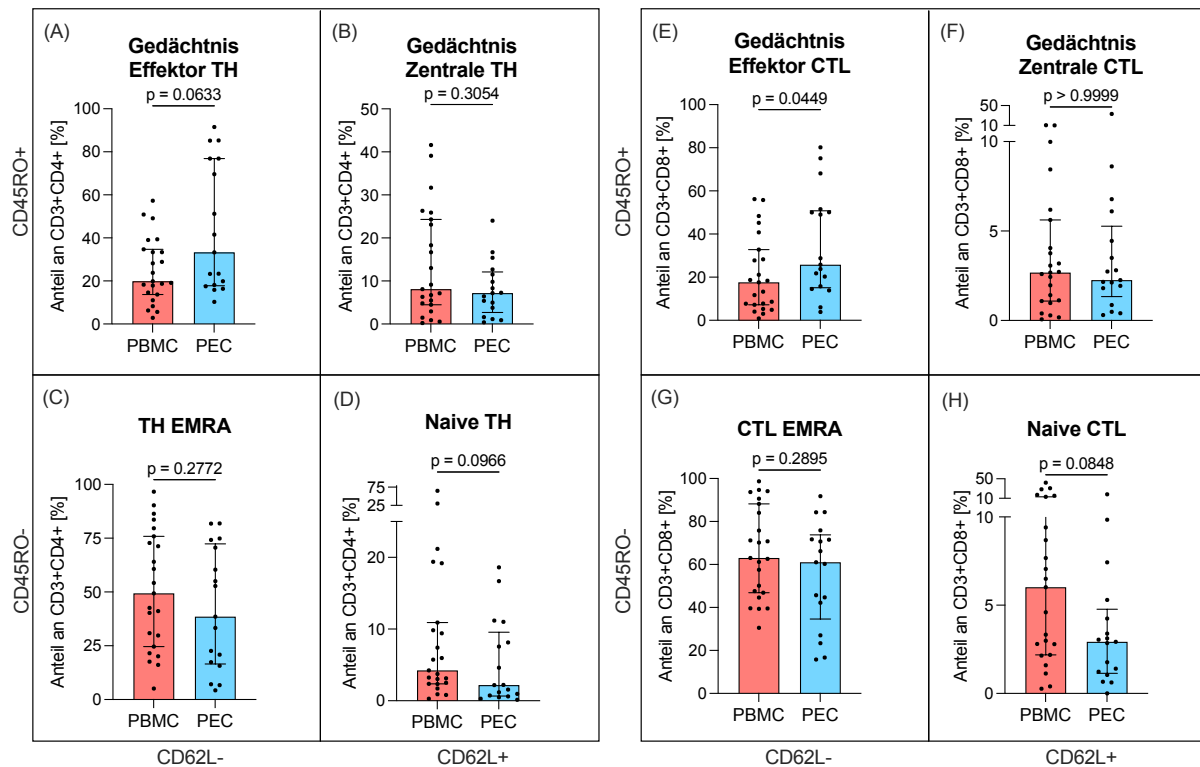


Abbildung 15: Vergleich von TH- bzw. CTL-Subpopulationen in Blut und Pleuraerguss

Dargestellt sind die Anteile der folgenden TH-Subpopulationen in Relation zu TH-Zellen (=Elternpopulation, $CD3+CD4+$) in Blut (rot, PBMC) und Pleuraergüssen (blau, PEC): (A) Gedächtnis Effektor TH ($CD45RO+CD62L-$), (B) Gedächtnis Zentrale TH, (C) TH EMRA und (D) Naive TH. Entsprechend sind die Anteile der folgenden CTL-Subpopulationen in Relation zu CTL (=Elternpopulation, $CD3+CD8+$) dargestellt: (E) Gedächtnis Effektor CTL, (F) Gedächtnis Zentrale CTL, (G) CTL EMRA, (H) Naive CTL. Die Balken stellen Median dar, Fehlerbalken den IQR und die Punkte sind die individuellen Datenpunkte in Blut ($n=23$) und Pleuraergüssen ($n=17$). Unterschiede wurden mittels dem zweiseitigen Mann Whitney U Test ermittelt. (Daten dieser Abbildung wurden veröffentlicht in Flögel et al., 2024, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt).

3.6.1.3 Korrelation von T-Zell-Populationen zwischen Blut und Pleuraerguss

Zusammenhänge zwischen Leukozytensubpopulationen in Blut und PE wurden mittels Spearmans-Korrelationskoeffizient (r) bestimmt (Tabelle 14). Der Anteil an T-Helferzellen, Zytotoxische T-Zellen, Regulatorische T-Zellen und Naiven Zytotoxische T-Zellen wies jeweils eine signifikante, positive Korrelation zwischen Blut und PE auf. Bei diesen Subpopulationen war die Korrelation jeweils positiv und der Korrelationskoeffizient lag zwischen 0,56 und 0,78. Die einzige negative Korrelation lag mit $p=-0,16$ bei TH2 vor.

Tabelle 14: Korrelation von T-Zell-Populationen zwischen Blut und Pleurapunktat

Dargestellt sind der jeweilige Spearman-Korrelationskoeffizient und p-Wert der gepaarten Korrelationsanalyse. Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind dickgedruckt.

Population	Korrelationskoeffizient r	p-Wert
T-Zellen	0,47	0,07
T-Helferzellen (TH)	0,61	0,01
Zytotoxische T-Zellen (CTL)	0,78	0,0007
TH EMRA	0,10	0,71
Naive TH	0,42	0,10
Gedächtnis Zentrale TH	0,01	0,97
Gedächtnis Effektor TH	0,30	0,26
TH EMRA	0,00	0,99
Naive TH	0,56	0,02
Gedächtnis Zentrale CTL	0,16	0,55
Gedächtnis Effektor CTL	0,31	0,24
TH1	0,27	0,31
TH2	-0,16	0,56
TH17	0,43	0,09
Regulatorische T-Zellen (Treg)	0,74	0,001
Doppelt-negative T-Zellen (DN T-Zellen)	0,06	0,82

3.6.2 B-Zellen in Blut und Pleuraerguss

3.6.2.1 Nachweisbare B-Zell-Populationen in Blut und Pleuraerguss

Die Kombination der verwendeten Detektionsantikörper ermöglichte die Differenzierung von 13 B-Zellpopulationen (Tabelle 15). Es gelang der Nachweis aller aufgeführten Populationen sowohl in Blut als auch in Pleuraergüssen.

Die Konzentrationen der Zell-Populationen sind als Anteil an entsprechenden Elternpopulationen dargestellt. Konzentrationen der B-Zellen (CD19+) sind als Anteil an allen lebenden Zellen (FVS780-) angegeben. Die Konzentrationen der B-Zell-Subpopulationen beziehen sich auf B-Zellen (CD19+) als Elternpopulation.

Tabelle 15: Auflistung der analysierten B-Zell-Populationen und entsprechende Kombinationen von Oberflächenmarkern

Population	Oberflächenmarker
B-Zellen	CD19+
Unreife B-Zellen	CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁻ IgM ⁻
Naive B-Zellen	CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺ IgM ⁺
B1-Zellen	CD20 ⁺ CD27 ⁺ CD43 ⁺

Tabelle 15 (Fortsetzung): Auflistung der analysierten B-Zell-Populationen und entsprechende Kombinationen von Oberflächenmarkern

Population	Oberflächenmarker
B2-Zellen	CD20 ⁺ CD27 ⁺ CD43 ⁻
Gedächtnis B1-Zellen	CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁻
Gedächtnis B2-Zellen	CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺
Marginalzonen-ähnliche Gedächtnis B-Zellen	CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ IgM ⁺
IgM Gedächtnis B-Zellen	CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁻ IgM ⁺
Klassengewechselte Gedächtnis B-Zellen	CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁻ IgM ⁻
Späte Gedächtnis B-Zellen	CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ⁺ IgM ⁺
Plasmablasten	CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ⁺ IgM ⁻
Transitionale B-Zellen	CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺ CD38 ⁺

3.6.2.2 Vergleich von B-Zell-Populationen in Blut und Pleuraerguss

Eine Vergleich analysierter B-Zell-Populationen in Blut und Pleuraerguss (PE) wurde durchgeführt (Abbildung 16 und Abbildung 17).

B-Zellen hatten einen Anteil von 17,0 % an allen lebenden Zellen in Blut, während der entsprechende Anteil in PE bei 7,2 % lag ($p=0,11$). Unreife B-Zellen (CD19⁺CD27⁻IgD⁻IgM⁻) waren die einzige B-Zell-Subpopulation mit einem höheren medianen Anteil in PE (Blut 4,5 % vs. PE 8,9 %, $p=0,23$, Abb. 16 (A)). Alle weiteren B-Zell-Subpopulation zeigten einen höheren Anteil in Blutproben (jeweils $p>0,05$, Abb. 16 (B) - (L)).

Der Vergleich von B1- bzw. B2-Zellen und deren entsprechenden Gedächtnis-Zellen weist keine signifikanten Unterschiede zwischen Blut und PE auf (jeweils $p>0,05$, Abb. 17 (A)-(D)). Tendenziell waren die Anteile von B1-Zellen, aber ausgeglichener zwischen Blut und PE als die der B2-Zellen. Anteile von Gedächtnis B1- und Gedächtnis B2-Zellen waren tendenziell (ns, $p>0,05$, Abb.17 (C)-(D)) in Blut ausgeprägter als in PE. Darin glichen sie den anderen analysierten Gedächtnis-B-Zell-Subpopulationen (Marginalzonen Gedächtnis B-Zellen, IgM Gedächtnis B-Zellen, Klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen, Späte Gedächtnis B-Zellen; Abb. 16 (F)-(I)).

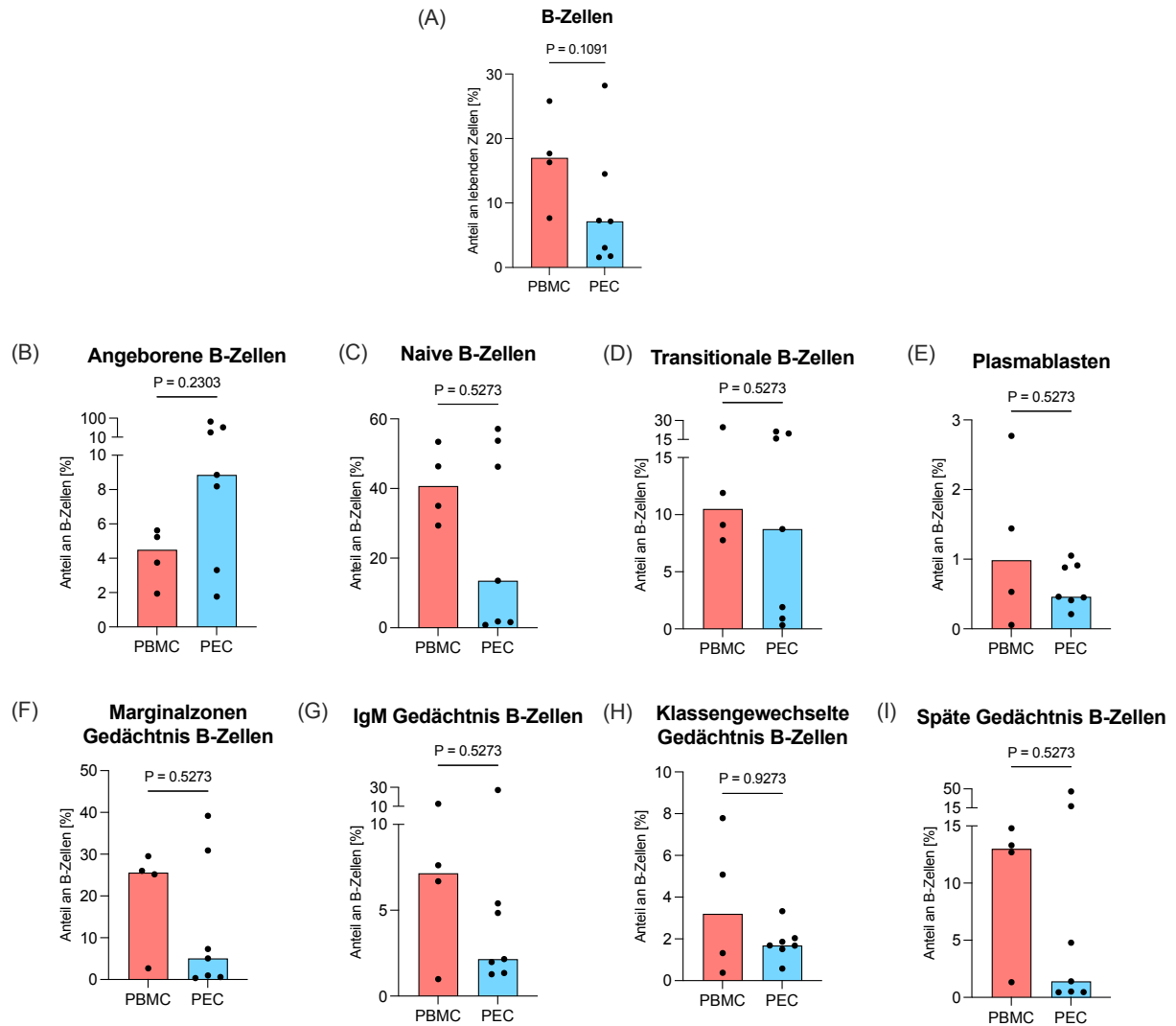


Abbildung 16: Vergleich von B-Zell-Populationen in Blut und Pleuraerguss

Dargestellt sind die Anteile von (A) B-Zellen in Relation zu allen lebenden Zellen in Blut (rot, PBMC) und Pleuraerguss (blau, PEC). Weiterhin (B) Angeborene B-Zellen, (C) Naive B-Zellen, (D) Transitionale B-Zellen, (E) Plasmablasten, (F) Marginalzonen Gedächtnis B-Zellen, (G) IgM Gedächtnis B-Zellen, (H) Klassengewechselte Gedächtnis B-Zellen und (I) Späte Gedächtnis B-Zellen in Relation zu allen B-Zellen ebenfalls in Blut (rot, PBMC) und Pleuraerguss (blau, PEC). Die Balken stellen Median dar, Fehlerbalken den IQR und die Punkte sind die individuellen Datenpunkte in Blut (n=4) und Pleuraergüssen (n=7). Unterschiede wurden mittels dem zweiseitigen Mann Whitney U Test ermittelt. (Daten dieser Abbildung wurden veröffentlicht in Flögel et al., 2024, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt).

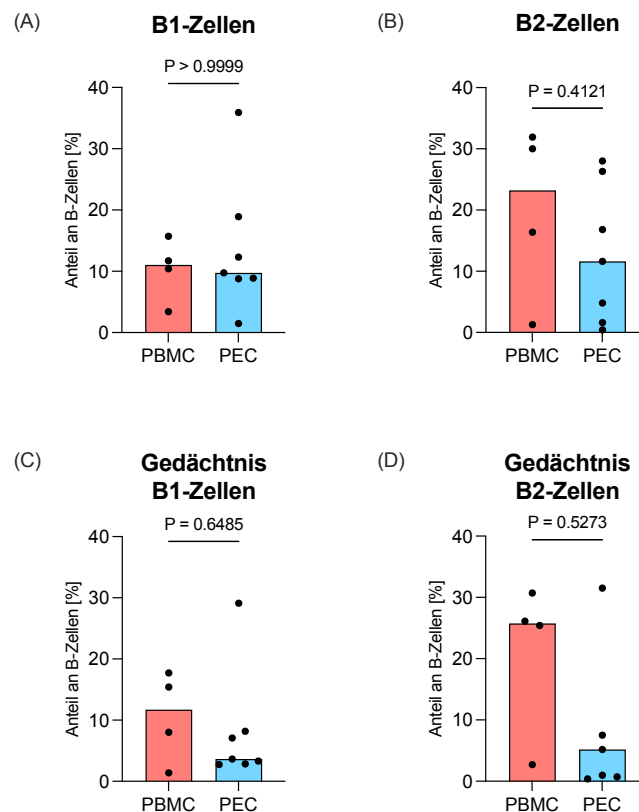


Abbildung 17: Vergleich von B1- und B2-Zellen inklusive B1- und B2-Gedächtniszellen in Blut und Pleuraerguss

Dargestellt sind die Anteile von (A) B1-Zellen, (B) B2-Zellen, (C) Gedächtnis B1-Zellen und Gedächtnis B2-Zellen in Relation zur Gesamtheit der B-Zellen in Blut (rot, PBMC) und Pleuraerguss (blau, PEC). Die Balken stellen Median dar, Fehlerbalken den IQR und die Punkte sind die individuellen Datenpunkte in Blut (n=4) und Pleuraergüssen (n=7). Unterschiede wurden mittels dem zweiseitigen Mann Whitney U Test ermittelt. (Daten dieser Abbildung wurden veröffentlicht in Flögel et al., 2024, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt).

3.6.3 Monozyten in Blut und Pleuraerguss

3.6.3.1 Nachweisbare Monozyten-Populationen in Blut und Pleuraerguss

Die Kombination der verwendeten Detektionsantikörper ermöglichte die Differenzierung von 4 Monozyten-Populationen (Tabelle 16). Es gelang der Nachweis aller aufgeführten Populationen sowohl in Blut als auch in Pleuraergüssen.

Die Konzentrationen der Monozyten-Populationen sind als Anteil an entsprechenden Elternpopulationen dargestellt. Konzentrationen der Monozyten (CD14⁺) und der n=3 Monozyten-Subpopulationen sind als Anteil an allen lebenden Zellen (FVS780⁻) angegeben.

Tabelle 16: Auflistung der analysierten Monozyten-Populationen und entsprechende Kombinationen von Oberflächenmarkern

Population	Oberflächenmarker
Monozyten	CD14 ⁺
Klassische Monozyten	CD14 ⁺ CD16 ⁻
Intermediäre Monozyten	CD14 ⁺ CD16 ⁺
Nicht-Klassische Monozyten	CD14 ^{dim} CD16 ⁺

3.6.3.2 Vergleich von Monozyten-Populationen in Blut und Pleuraerguss

Eine Vergleich analysierter Zellpopulationen in Blut und Pleuraerguss (PE) wurde durchgeführt (Abbildung 18). Der mediane Anteil von Monozyten an lebenden Zellen lag in PE mit 16,8 % leicht über dem in Blut mit 12,5 % ($p=0,53$; Abb. 18 (A)). Ebenfalls nicht-signifikant erhöhte Anteile von Monozyten-Subpopulationen in PE wurden sowohl bei klassischen Monozyten (Blut 9,1 % vs. PE 10,0%, $p=0,65$, Abb. 18 (D)) als auch Intermediären Monozyten (Blut 3,1 % vs. PE 6,8 %, $p=0,41$, Abb. 18 (B)) festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigten nicht-klassische Monozyten marginal erhöhte Anteile in Blut (Blut 0,97 % vs. PE 0,71 %, $p=0,30$, Abb. 18 (C)).

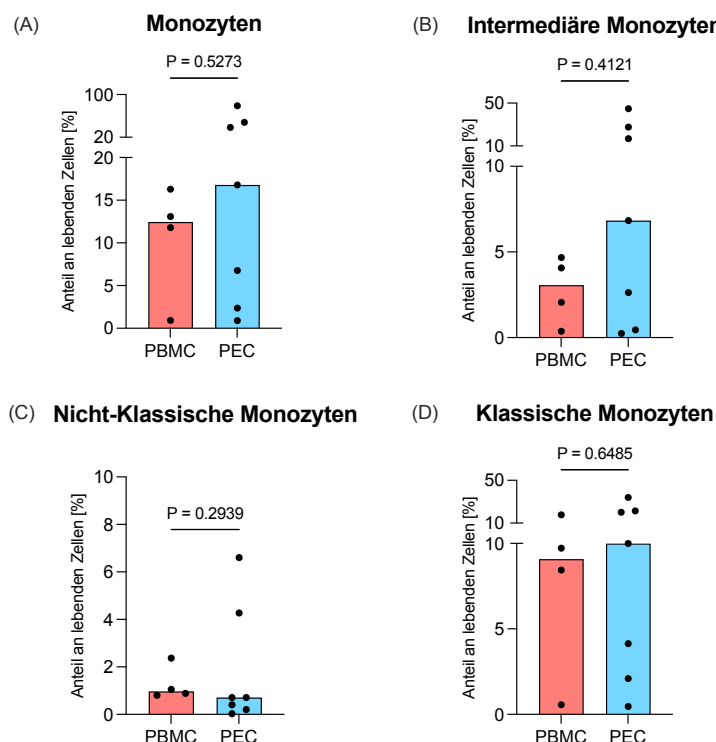


Abbildung 18: Vergleich von Monozyten-Populationen in Blut und Pleuraerguss

Dargestellt sind die Anteile von (A) Monozyten, (B) B2-Zellen, (C) Gedächtnis B1-Zellen und Gedächtnis B2-Zellen in Relation zur Gesamtheit der B-Zellen in Blut (rot, PBMC) und Pleuraerguss (blau, PEC). Die Balken stellen Median dar, Fehlerbalken den IQR und die Punkte sind die individuellen Datenpunkte in Blut ($n=4$) und Pleuraergüssen ($n=7$). Unterschiede wurden mittels dem zweiseitigen Mann Whitney U Test ermittelt. (Daten dieser Abbildung wurden veröffentlicht in Flögel et al., 2024, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt).

3.6.4 Natürliche Killerzellen in Blut und Pleuraerguss

3.6.4.1 Nachweisbare NK-Populationen in Blut und Pleuraerguss

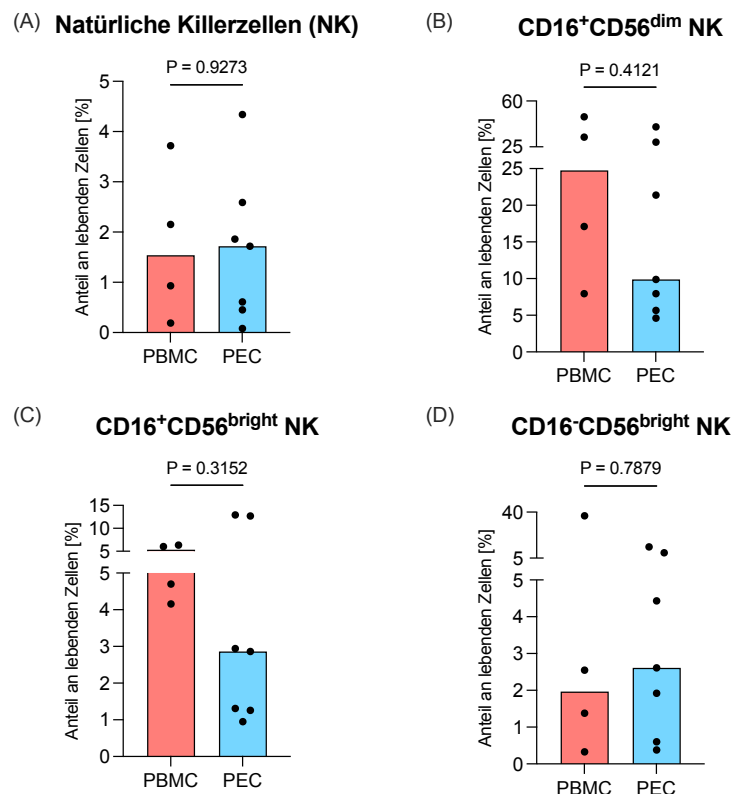
Die Kombination der verwendeten Detektionsantikörper ermöglichte die Differenzierung von 4 NK-Populationen (Tabelle 17). Es gelang der Nachweis aller aufgeführten Populationen sowohl in Blut als auch in Pleuraergüssen. Die Konzentrationen der NK-Populationen sind als Anteil an entsprechenden Elternpopulationen dargestellt. Konzentrationen der Natürlichen Killerzellen ($CD16+CD56+$) und der $n=3$ NK-Subpopulationen sind als Anteil an allen lebenden Zellen ($FVS780-$) angegeben.

Tabelle 17: Auflistung der analysierten Monozyten-Populationen und entsprechende Kombinationen von Oberflächenmarkern

Population	Oberflächenmarker
Natürliche Killerzellen (NK)	CD3 ⁺ CD14 ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ^{bright} und CD3 ⁺ CD14 ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ^{bright} und CD3 ⁺ CD14 ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ^{dim}
CD16 ⁺ CD56 ^{bright} NK	CD3 ⁺ CD14 ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ^{bright}
CD16 ⁺ CD56 ^{dim} NK	CD3 ⁺ CD14 ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ^{dim}

3.6.4.2 Vergleich von NK-Populationen in Blut und Pleuraerguss

Ein deskriptiver Vergleich analysierter Zellpopulationen in Blut und Pleuraerguss (PE) wurde durchgeführt (Abbildung 19). Natürliche Killerzellen unterschieden sich in Blut und PE nicht signifikant (Blut 1,5 % vs. PE 1,7 %, $p=0,93$, Abb. 19 (A)). Auch unter den NK-Subpopulationen waren die Unterschiede in den jeweiligen Konzentrationen in Blut und PE nicht signifikant verschieden: CD16⁺CD56^{bright} NK hatten annähernd gleiche Anteile in Blut und PE (Blut 2,0 % vs. PE 2,6 %, $p=0,79$, Abb. 19 (D)), während die Anteile von CD16⁺CD56^{dim} und CD16⁺CD56^{bright} NK im Blut höher waren (Blut 24,8 % vs. PE 9,9 %, $p=0,41$, Abb. 19 (B) bzw. Blut 5,4 % vs. PE 2,9 %, $p=0,32$, Abb. 19 (C)).

**Abbildung 19: Anteil von NK-Populationen in Blut und Pleuraerguss**

Dargestellt sind die Anteile von (A) Natürlichen Killerzellen (NK), (B) CD16⁺CD56^{dim} NK, (C) CD16⁺CD56^{bright} NK und (D) CD16⁻CD56^{bright} NK in Relation zur Gesamtheit lebender Zellen in Blut (rot, PBMC) und Pleuraerguss (blau, PEC). Die Balken stellen Median dar, Fehlerbalken den IQR und die Punkte sind die individuellen Datenpunkte in Blut (n=4) und Pleuraergüssen (n=7). Unterschiede wurden mittels dem zweiseitigen Mann Whitney U Test ermittelt. (Daten dieser Abbildung wurden veröffentlicht in Flögel et al., 2024, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt).

3.7 Zytokine in Blut und Pleuraerguss

3.7.1 Grenzen der Quantifizierbarkeit von Zytokinen in Pleurapunktatproben

Zur Quantifizierung unbekannter Zytokin-Konzentrationen von Proben wurden Standards mit bekannten Konzentrationswerten verwendet. Anhand der Standards ließ sich für jedes gemessene Zytokin mittels 5PL-Regression eine Standardkurve erstellen, welche der Quantifizierung unbekannter Zytokinkonzentrationen diene. Werte außerhalb der durch die jeweiligen Standards definierten Bereiche entziehen sich einer exakten Quantifizierung.

12 Zytokine wurden in 30 Blut- bzw. 30 Pleurapunktatproben gemessen. Demnach wurden jeweils 360 einzelne Zytokinkonzentrationen in Blut- bzw. Pleurapunktatproben ermittelt. Von den 360 ermittelten Zytokinkonzentrationen in Pleuraergüssen lagen 66 außerhalb des quantifizierbaren Bereichs, während dies bei den 360 ermittelten Zytokinkonzentrationen in Blut 17 mal der Fall war. Tabelle 18 bietet eine Übersicht über die Anzahl der Proben pro Zytokin, die außerhalb des quantifizierbaren Bereichs der jeweiligen Messung lagen.

Tabelle 18: Anzahl der Blut- und Pleurapunktatproben außerhalb des quantifizierbaren Bereichs des jeweiligen Zytokins im Multiplex-Immunoassay

* = IL-7 weist n=4 Werte unterhalb des quantifizierbaren Bereichs auf, die in einer erniedrigten Bead-Anzahl begründet sind. # = IL-6 weist n=30 oberhalb des quantifizierbaren Bereichs auf. Deshalb wurde die Messung von IL-6 in einem separaten Singleplex-Ansatz wiederholt.

Zytokin	Anzahl Werte unterhalb des quantifizierbaren Bereichs (n)		Anzahl Werte oberhalb des quantifizierbaren Bereichs (n)	
	Blut	PE	Blut	PE
TNF	0	0	0	0
INF- γ	5	2	0	0
GM-CSF	0	0	0	0
IL-4	3	8	0	0
IL-5	1	0	0	0
IL-6	0	0	1	30 [#]
IL-7	0	4 [*]	0	0
IL-8	0	0	0	12
IL-10	0	0	0	0
IL-12p70	0	2	0	0
IL-13	7	8	0	0
IL-17A	0	0	0	0

Werte, die unterhalb des quantifizierbaren Bereichs lagen, wurden angepasst an $1/2 \times \text{LoD}$ (=Hälfte des *Lower limit of detection*). Dies betraf INF- γ , IL-4, IL-5, IL-12p70 und IL-13.

Werte, die oberhalb des quantifizierbaren Bereichs lagen, wurden angepasst an den Wert des höchsten Standards. Dieses Vorgehen wurde bei IL-8 angewandt.

Die Messung zweier Zytokine in Pleurapunktatproben sind hervorzuheben, da sie ein gesondertes Vorgehen bezüglich der Auswertung verlangten:

Im IL-6-Multiplex-Ansatz waren alle $n=30$ gemessenen Werte oberhalb des quantifizierbaren Bereichs (Quantifizierbarer Bereich IL-6: 0,18 – 750 pg/ml). Aus diesem Grund wurde IL-6 sekundär in einem Singleplex-Ansatz bestimmt. Der quantifizierbare Bereich des Singleplex-Ansatzes lag bei 0,64- 10.000 pg/ml. Im IL-6 Singleplex-Ansatz lagen $n=17$ Werte oberhalb des quantifizierbaren Bereichs und wurden an den Wert des höchsten Standards (10.000 pg/ml) angepasst. Während die IL-6 Messung des Multiplexansatz $n=0$ Proben adäquat quantifizieren konnte, war dies im IL-6-Singleplex bei $n=13$ Werten möglich.

IL-7 wies in Pleurapunktatproben $n=4$ Werte auf die unterhalb des quantifizierbaren Bereichs lagen. Dies war in nicht in einer tatsächlich zu niedrigen IL-7 Zytokinkonzentrationen begründet, sondern in einer erniedrigten Bead-Anzahl, die eine adäquate Quantifizierung verunmöglichte.

3.7.2 Quotient der Zytokinkonzentrationen in Blut und Pleuraerguss

In Anlehnung an die Light-Kriterien (1.1.5), die unter anderem den Quotienten aus der Proteinkonzentration in Pleuraerguss (PE) und der Proteinkonzentration im Blutplasma umfassen, wurden Quotienten aus Zytokinkonzentrationen in PE und Zytokinkonzentrationen in Plasma für alle 12 Zytokine bestimmt. Für jeden Patienten wurde dieser Quotient pro Zytokin bestimmt und der entsprechende Median der Quotienten pro Zytokin ermittelt (Abbildung 20). Die folgenden $n=5$ Zytokine zeigten eine bis zu 10-fache Erhöhung zugunsten des Blutes: GM-CSF (Quotient (Q) =0,325), IFN- γ (Q=0,360), IL-4 (Q=0,630), IL-12p70 (Q=0,355) und IL-17A (Q=0,290). Bis zu 10-fach höhere Konzentrationen in PE als in Blut zeigten die Zytokine TNF (Q=2,415), IL-5 (Q=1,355), IL-7 (Q=2,370), IL-10 (Q=5,415) und IL-13 (Q=1,33). IL-8 und IL-6 zeigten eine 16-fache bzw. 242-fache Erhöhung in PE im Vergleich zu Blut.

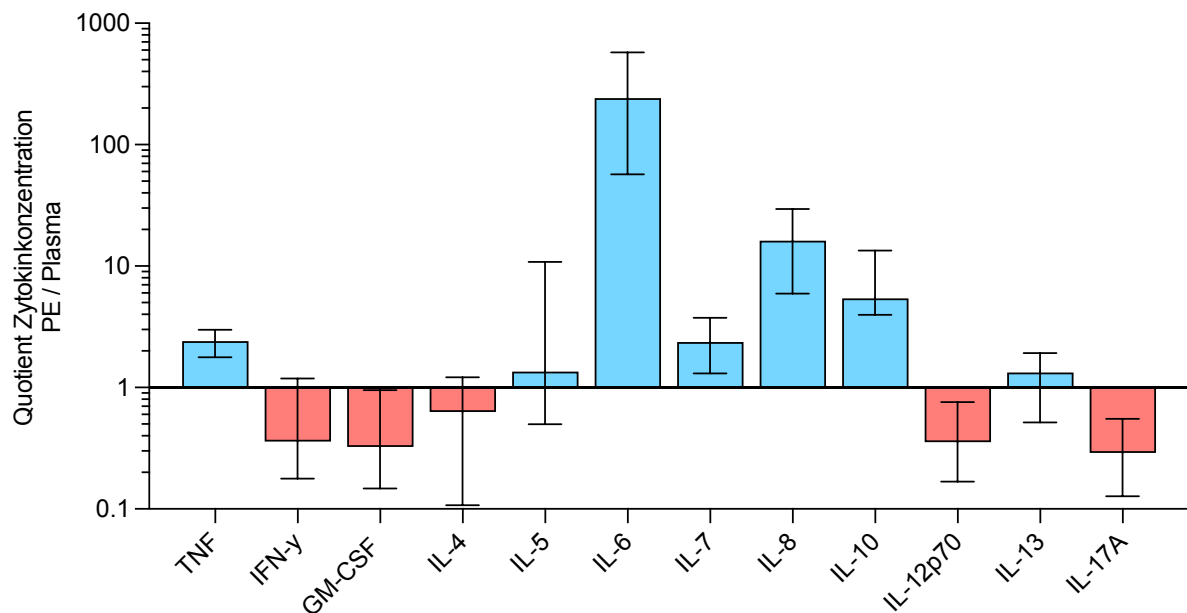


Abbildung 20: Quotienten der Zytokinkonzentrationen in Pleuraerguss / Plasma

Dargestellt sind die Mediane mit IQR der Quotient der $n=12$ Zytokinkonzentrationen in PE und Blut. Blaue Balken entsprechen Quotienten > 1 , rote Balken vice versa. (Daten dieser Abbildung wurden veröffentlicht in Flögel et al., 2024, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt).

3.7.3 Vergleich der Zytokinkonzentrationen in Blut und Pleuraerguss

Ein gepaarter Vergleich korrespondierender Proben des Blutes und Pleuraergusses (PE) wurde bezüglich aller 12 analysierten Zytokine durchgeführt (Abbildung 21).

Signifikant höhere Zytokinkonzentrationen im PE zeigten sich bei den folgenden sechs Zytokinen: TNF (Blut 14,55 pg/ml vs. PE 37,89 pg/ml, $p<0.0001$), IL-5 (Blut 7,705 pg/ml vs. PE 8,680 pg/ml, $p=0.293$), IL-6 (Blut 28,33 pg/ml vs. PE 1000 pg/ml, $p<0.0001$), IL-7 (Blut 9,935 pg/ml vs. PE 20,33 pg/ml, $p<0.0001$), IL-8 (Blut 31,88 pg/ml vs. PE 843,9 pg/ml, $p<0.0001$), IL-10 (Blut 27,72 pg/ml vs. PE 227,7 pg/ml, $p<0.0001$).

Signifikant niedrigere Zytokinkonzentrationen im PE im Vergleich zu Blut zeigten sich bei vier Zytokinen: INF-γ (Blut 39,73 pg/ml vs. PE 18,51 pg/ml, $p=0.0005$), GM-CSF (Blut 42,22 pg/ml vs. PE 12,10 pg/ml, $p=0.0003$), IL-12p70 (Blut 43,55 pg/ml vs. PE 11,95 pg/ml, $p<0.0001$), IL17A (Blut 26,09 pg/ml vs. PE 5,17 pg/ml, $p<0.0001$).

Kein signifikanter Unterschied zwischen Blut und PE lag bei IL-4 (Blut 51,13 pg/ml vs. PE 14,59 pg/ml, $p=0.1624$) und IL-13 (Blut 3,055 pg/ml vs. PE 4,585 pg/ml, $p=0.2472$) vor.

Ergebnisse

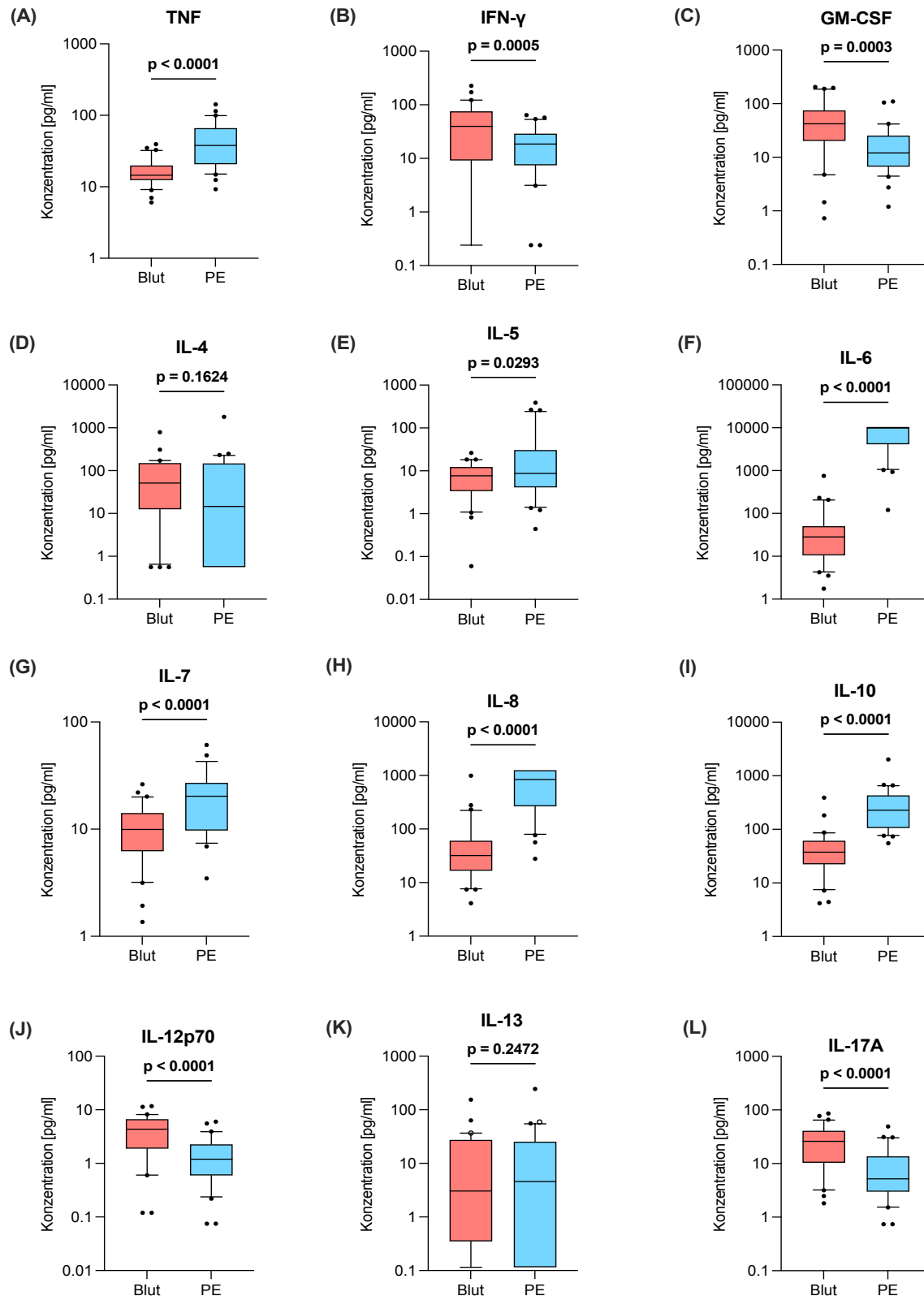


Abbildung 21: Zytokinkonzentrationen in Blut und Pleuraergüssen

Die Konzentrationen von (A) TNF, (B) IFN- γ (C) GM-CSF, (D) IL-4, (E) IL-5, (F) IL-6, (G) IL-7, (H) IL-8, (I) IL-10, (J) IL-12p70, (K) IL-13, (L) IL-17A wurden mittels Multiplex Immunoassay in Blut (rot, n=30) und Pleuraergüssen (PE, blau, n=30) bestimmt. Die Box-Plots zeigen die 25., 50. und 75. Perzentile an; Whiskers die 10. bis 90. Perzentile. Daten außerhalb der Whiskers sind als Punkte dargestellt. Unterschiede der Zytokinkonzentrationen zwischen Blut und Pleuraerguss wurden mittels Wilcoxon-Test für gepaarte Daten ermittelt. (Daten dieser Abbildung wurden veröffentlicht in Flögel et al., 2024, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt).

3.7.4 Korrelation von Zytokinen zwischen Blut und Pleuraergüssen

Um mögliche Zusammenhänge zwischen Zytokinkonzentrationen in Blut und PE herstellen zu können, wurde pro Zytokin der Spearmans-Korrelationskoeffizient von korrespondierenden Blut- und Pleurapunktatproben bestimmt. 50 % der untersuchten Zytokine (TNF, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A) wiesen eine signifikante, positive Korrelation zwischen Blut und Pleuraerguss auf (Tabelle 19).

Tabelle 19: Korrelationsanalyse von Zytokinen zwischen Blut und Pleuraerguss

Dargestellt sind der jeweilige Spearman-Korrelationskoeffizient und p-Wert der gepaarten Korrelationsanalyse. Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind dickgedruckt.

Zytokin	Korrelationskoeffizient	p-Wert
TNF	0,59	0,0006
INF- γ	0,33	0,07
GM-CSF	0,21	0,26
IL-4	0,86	<0,0001
IL-5	0,16	0,41
IL-6	0,52	0,003
IL-7	0,32	0,11
IL-8	0,49	0,006
IL-10	0,46	0,01
IL-12p70	0,39	0,03
IL-13	0,79	<0,0001
IL-17A	0,46	0,01

3.8 Korrelation zwischen Immunzellen und Zytokinen

In den vorausgegangenen Kapitel wurden Immunzellen (PBMC und PEC) und Zytokine isoliert betrachtet. Im Folgenden werden mittels des Spearman-Korrelationskoeffizienten Zusammenhänge zwischen Immunzellen und Zytokinen ermittelt. Die Analysen wurde jeweils in den Kompartimenten Blut (Abbildung 22 A) und Pleuraerguss (Abbildung 22 B) durchgeführt. In Blut wiesen insbesondere Gedächtnis T-Zellen signifikant positive Korrelationen mit verschiedenen Zytokinen auf. Sowohl Gedächtnis Effektor TH (CD3+CD4+CD45RO+CD62L-) als auch Gedächtnis Zentrale TH (CD3+CD4+CD45RO+CD62L+) zeigten ein signifikant positive Korrelation bezüglich IL-12p70, IFN- γ und GM-CSF ($r = 0,4$, $r = 0,5$, $r = 0,4$ und $r = 0,4$, $r = 0,4$, $r = 0,4$; und jeweils $p < 0,05$). Zudem korrelierten Gedächtnis Effektor TH positiv mit IL-17A in Blut ($r = 0,4$, $p < 0,05$). Gedächtnis Effektor CTL korrelierten in Blut positiv mit sieben Zytokinen, unter anderem GM-CSF, IFN- γ und IL-12p70 ($r = 0,6$, $r = 0,4$ und $r = 0,5$ und jeweils $p < 0,05$).

In Pleuraergüssen (PE) wiesen ausschließlich DN T-Zellen (CD3+CD4-CD8-) einen signifikant positiven Korrelationskoeffizienten auf. DN T-Zellen korrelierten positiv mit IL-7, IL17A und IFN- γ ($r = 0,6$, $r = 0,6$ and $r = 0,7$, und jeweils $p < 0,05$). Signifikant negative Korrelationen wurden zwischen sechs T-Zell-Subpopulationen und korrespondierenden Zytokinen gemessen. Auffällig wäre dabei insbesondere TH17, die in PE stark negativ korrelierten mit IL-5, IL-6 und IL-8 ($r = -0,6$, $r = -0,7$ and $r = -0,7$, und jeweils $p < 0,05$).

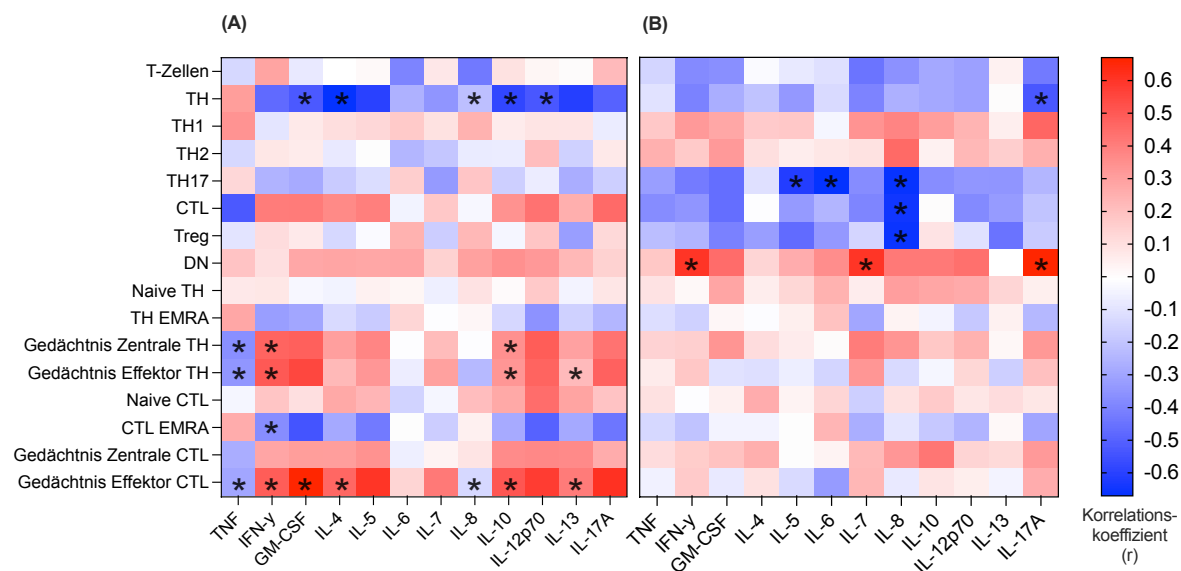


Abbildung 22: Korrelation zwischen Immunzellen und Zytokinen in Blut und Pleuraerguss

Mittels Spearman-Korrelationskoeffizienten wurden Zusammenhänge zwischen 16 Immunzellen und 12 Zytokinen ermittelt. Die Analysen sind nach Blut (A) und Pleuraerguss (B) aufgeteilt. Der Farbcode stellt den Korrelationskoeffizienten r dar. Blau ist eine negative Korrelation, rot eine positive. Weiße Felder weisen keine Korrelation auf ($r=0$). Felder mit * weisen eine signifikante ($p < 0,05$) Korrelation auf. (Daten dieser Abbildung wurden veröffentlicht in Flögel et al., 2024, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt).

3.9 Genexpression von Immunzellen in Blut und Pleuraerguss

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Analyse der Genexpression von *TNF*, *TBX21*, *GATA3*, *IL-8* und *IL-17* in PBMC und PEC angestrebt. Dazu wurden folgende Schritte durchgeführt: 1. RNA-Isolation aus PBMC und PEC (2.3.7.1), 2. cDNA-Synthese (2.3.7.1) und 3. quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) (2.3.7.3).

An die RNA-Isolation und cDNA-Synthese schloss sich jeweils eine Konzentrations- und Reinheitsmessung von RNA bzw. cDNA an (2.3.7.2). Dies diente der Validierung der korrekten Durchführung der jeweiligen Methode. Aus den Quotienten der Extinktion bei 260 nm und 280 nm ($E_{260/280}$) wurde die Reinheit von RNA und cDNA bestimmt. $E_{260/280}$ von 2,0 wies auf das Vorliegen reiner RNA hin. $E_{260/280}$ zwischen 1,7 und 1,9 deutete auf das Vorliegen reiner DNA hin.

Die aus PBMC und PEC gewonnene RNA wies starke Schwankungen in entsprechenden Konzentrations- und Reinheitsmessung auf. In n=24 aus PEC isolierten RNA-Proben lag die mediane Konzentration bei 2,9 ng/μl (Range: 0 – 354 ng/μl) und der $E_{260/280}$ bei 1,1 (Range: 0,5 – 1,9). Die mediane Konzentration in n=16 RNA-Proben lag bei PBMC bei 2,2 ng/μl (Range: 0 – 37 ng/μl) und $E_{260/280}$ bei 0,9 (Range: 0,4 – 1,9).

Die daraufhin gewonnene cDNA hatte eine mediane Konzentration von 1454 ng/μl (Range: 1375 – 3301 ng/μl) in cDNA aus PEC und 1423 ng/μl (Range: 1186 – 1545 ng/μl) in cDNA aus PBMC. Die jeweiligen Reinheitswerte ($E_{260/280}$) lagen bei 1,8 (Range: 1,83 – 1,86) (cDNA aus PEC) und 1,83 (Range: 1,27 – 1,85) (cDNA aus PBMC).

Bei der Auswertung der Daten der durchgeführten qRT-PCR zeigten sich in allen Experimenten zu niedrige Signalintensitäten. Dies verunmöglichte eine Auswertung der Genexpression von *TNF*, *TBX21*, *GATA3*, *IL-8* und *IL-17* in PBMC und PEC.

3.10 Einordnung des malignen Pleuraergusses

Der Pleuraerguss (PE) der onkologischen Patientin wurde hinsichtlich immunologischer Eigenschaften separat ausgewertet, um die Homogenität des kardiologischen Patientenkollektivs sicherzustellen. Um eine Einordnung des einzelnen, onkologischen PE vorzunehmen, wurde dieser mit der Grundgesamtheit der kardiologischen PE (n=30) hinsichtlich Zytokinkonzentrationen verglichen. Die kardiologischen PE dienten als Referenz und definierten den Bereich der 0. bis 100. Perzentile. In diesem Perzentil-Bereich ordneten sich pro Zytokin die jeweilige Messung von PE bzw. Blut der onkologischen Patientin ein (Abbildung 23).

83 % der Zytokine (10 von 12) der onkologischen Patienten die in Blut gemessen wurden lagen innerhalb der 25. bis 75. Perzentile. Bei Zytokinen des PE war dies nur in 50 % der Zytokine (6 von 10) der Fall. IL-12p70 lag sowohl in PE als auch in Blut gleich bzw. oberhalb der 90. Perzentile. Insgesamt 4 der im PE gemessenen Zytokine (IL-6, IL-7, IL-8, IL-10) lagen auf bzw. unterhalb der 10. Perzentile, während dies bei keinem Zytokin in Blut der Fall war.

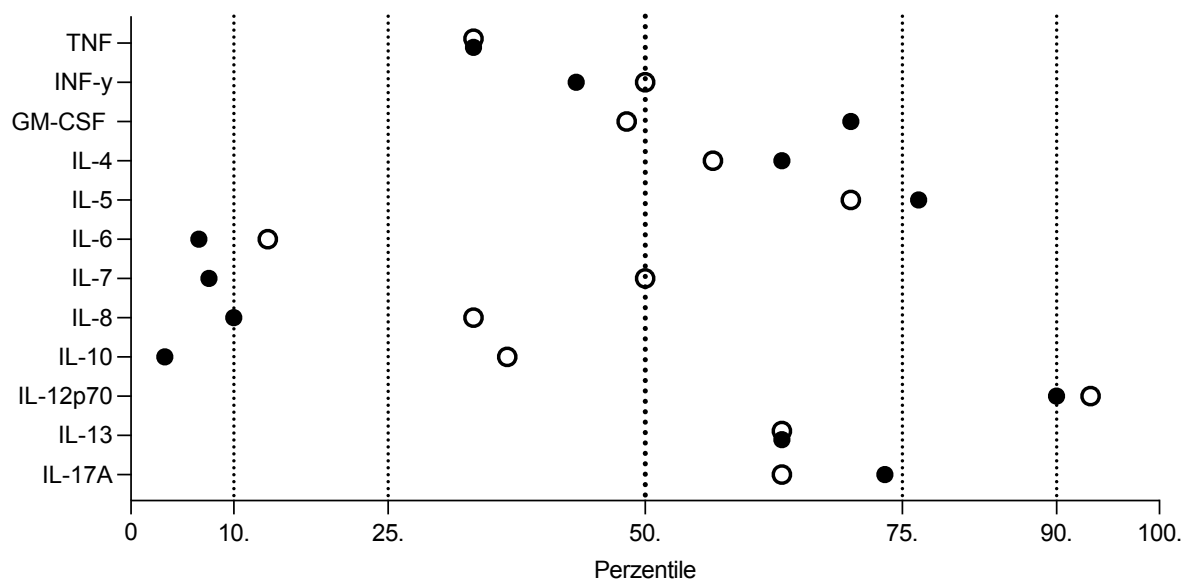


Abbildung 23: Einordnung von Zytokinen in Blut und Pleuraerguss der onkologischen Patienten in Bezug auf das kardiologische Patientenkollektiv

Das kardiologische Patientenkollektiv (n=30) definiert den Perzentil-Bereich. Senkrechte, gestrichelte Linien markieren die 10., 25., 50., 75., und 90. Perzentile. Punkte stellen die Einzelwerte der onkologischen Patientin dar (schwarze Punkte = Pleuraerguss; offene Punkte = Blut; jeweils n=1 pro Zytokin und Probenart).

3.11 Einfluss demographischer und klinischer Parameter auf immunologische Charakteristika von Pleuraergüssen

Der Einfluss von demographischer und klinischer Parameter auf immunologische Eigenschaften von Pleuraergüssen (PE) kinderkardiologischer Patienten (n=30) wurde untersucht. Folgende drei Parameter wurden betrachtet: Geschlecht (männlich n=21 vs. weiblich n=9), Alter (<1 Jahr = Säugling n=13 vs. >1 Jahr = Nicht-Säugling n=17) und Verwendungen einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) (HLM n=16 vs. keine HLM n=14). Für jedes Zytokin wurden die folgenden drei Ratios in Blut und PE ermittelt: männlich / weiblich; Säugling / Nicht-Säugling; HLM / keine HLM. Zudem wurden in Blut und PE für jeden der drei Parameter (Alter, HLM, Geschlecht) Unterschiede zwischen den jeweils zwei Optionen (z.B. männlich versus weiblich, etc.) mittels Mann-Whitney -U Test ermittelt (Abbildung 24).

In PE von Nicht-Säuglingen zeigten sich im Vergleich zu Säuglingen signifikant erhöhte Werte von IL-8 (Nicht-Säugling 1250 pg/ml vs. Säugling 352 pg/ml; $p=0,016$). TNF wies bei Nicht-Säuglingen sowohl in PE als auch in Blut signifikant höhere Werte als bei Säuglingen auf (Nicht-Säugling 55 pg/ml vs. Säugling 30 pg/ml; $p=0,006$ in PE bzw. Nicht-Säugling 19 pg/ml vs. Säugling 14 pg/ml; $p=0,03$ in Blut). Ein umgekehrtes Bild zeigte IL-4 mit signifikant erhöhten Zytokinwerten bei Säuglingen sowohl in PE als auch in Blut (Nicht-Säugling 6 pg/ml vs. Säugling 120 pg/ml; $p=0,001$ in Blut bzw. Nicht-Säugling 0,6 pg/ml vs. Säugling 30 pg/ml; $p=0,013$ in PE). Die Ratio von IL-4 (Säugling / Nicht-Säugling) lag damit bei einer 20-fachen bzw. 54-fachen Erhöhung zugunsten von Säuglingen in Blut bzw. PE. Die Konzentrationen n=7 weiterer Zytokine waren in Blut von Säuglingen im Gegensatz zu Nicht-Säuglingen signifikant erhöht. Dies umfasst IL-5, IL-7, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN- γ und GM-CSF. Die ausgeprägteste Ratio (Säugling / Nicht-Säugling) stellte dabei IL-13 mit einer circa 160-fachen Erhöhung in Blut dar.

Der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM) führte im Gegensatz zu kardiochirurgischen Operationen ohne HLM zu signifikant erhöhten Werten von IL-4 und IL-13 in PE (HLM 103 pg/ml vs. keine HLM 2 pg/ml; $p=0,017$ bzw. HLM 12 pg/ml vs. keine HLM 0,4 pg/ml; $p=0,002$). Die entsprechenden Ratios (HLM / keine HLM) zeigten 46-fach bzw. 35-fach höhere Werte für IL-4 und IL-13 in PE bei Kindern, die mit HLM operiert wurden. Zudem zeigten Blutproben von Patienten mit HLM signifikant höhere IL-13 Werte (HLM 20 pg/ml vs. keine HLM 0,4 pg/ml; $p=0,001$) und tendenziell erhöhte Werte von IL-4 und IL-5 (HLM 102 pg/ml vs. keine HLM 16 pg/ml; $p=0,07$ bzw. HLM 9 pg/ml vs. keine HLM 3 pg/ml; $p=0,07$).

Zwischen männlichen und weiblichen Patienten gab es hinsichtlich Zytokinkonzentrationen sowohl in PE als auch in Blut keine signifikanten Unterschiede. Die Geschlechts-Ratio (männlich / weiblich) der untersuchten Zytokine lag in PE mehrheitlich auf Seiten der männlichen Patienten, während sie in Blut mehrheitlich auf Seiten der weiblichen Patienten lag.

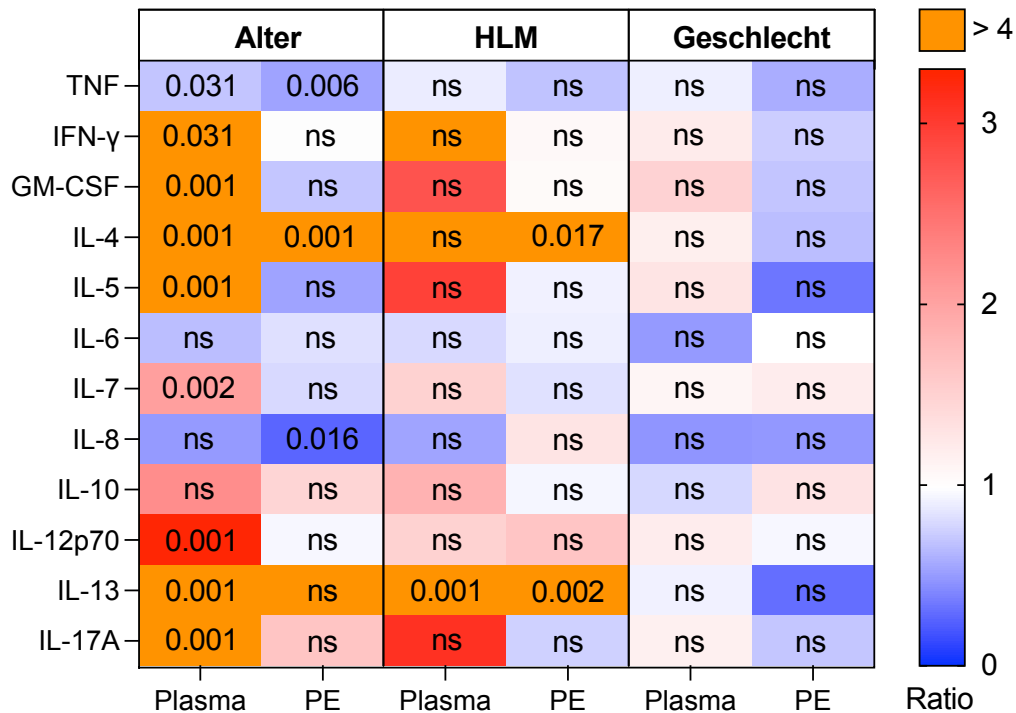


Abbildung 24: Analyse von Zytokinen in Plasma und Pleuraerguss hinsichtlich Unterschieden in klinischen Parametern

Die klinischen Parameter umfassten Alter (< 1 Jahr = Säugling vs. > 1 Jahr = Nicht-Säugling), Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM) (HLM vs. keine HLM) und Geschlecht (männlich vs. weiblich). Für jedes der n=12 Zytokine wurden die folgenden drei Ratios ermittelt: Säugling / Nicht-Säugling; HLM / keine HLM; männlich / weiblich. Die Ratios entsprechen dem Farbcode: Blau: Ratio < 1; Weiß: Ratio = 1; Rot: Ratio > 1; Orange: Ratio > 4). Zudem wurden für jeden der drei Parameter (Alter, HLM, Geschlecht) Unterschiede zwischen den jeweils zwei Optionen (z.B. Säugling versus Nicht-Säugling, etc.) mittels Mann-Whitney-U Test ermittelt. Nicht-signifikante p-Werte sind mit ns abgekürzt, signifikante p-Werte ($p < 0,05$) sind als Zahlenwerte in der jeweilige Zelle aufgeführt. (Daten dieser Abbildung wurden veröffentlicht in Flögel et al., 2024, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt).

4 Diskussion

4.1 Exsudate wurden mittels der Light-Kriterien diagnostiziert

In der Entstehung von Pleuraergüssen (PE) wird grundlegend zwischen Exsudaten und Transsudaten unterschieden. Ein Transsudat entsteht durch Druckveränderungen in den Kapillaren der Pleura und führt zum Austritt protein- und zellarmer Flüssigkeit aus intakten Kapillaren. Im Gegensatz dazu entstehen Exsudate durch eine Schädigung pleuraler Strukturen, beispielsweise im Rahmen inflammatorischer Prozesse. Dadurch erhöht sich die Permeabilität des Endothels der Kapillaren und der Mesothelzellschicht. Dies führt zum Austritt protein- und zellreicher Flüssigkeit (105,106,111).

Die Differenzierung von Exsudaten und Transsudaten hat eine hohe klinische Relevanz und beeinflusst das weitere diagnostische und therapeutische Prozedere (69,102,158). In vorliegender Arbeit wurden die Light-Kriterien verwendet, die den Goldstandard in jener Differenzierung darstellen (87,132). Die Light-Kriterien umfassen drei Kriterien, welche in Kapitel 1.1.5 aufgeführt sind. Bei Vorliegen bereits eines Light-Kriteriums ist ein PE als Exsudat zu werten. Im Rahmen vorliegender Arbeit wurde nur der Quotient des Pleura- / Serum-Gesamtproteins bestimmt, welcher jedoch für die Diagnose eines Exsudats ausreichend ist. Anstelle von Serum wurde Blutplasma verwendet. Da die Proteinkonzentration in Blutplasma nur 2-3 g/l höher ist als in Serum (134), ist der Unterschied für die Gesamtauswertung vernachlässigbar klein. Eine Messung von LDH zur Bestimmung der beiden anderen Light-Kriterien wurde nicht durchgeführt. Nichtsdestotrotz wurden anhand des einen Light-Kriteriums circa 90 Prozent der analysierten PE als Exsudate gewertet. Möglicherweise hätten sich auch die übrigen 10 Prozent auf Grundlage der Analyse von LDH als Exsudate herausgestellt.

Für den exsudativen Charakter aller analysierten PE spricht weiterhin deren absolute Proteinkonzentration. Die absolute Proteinkonzentration von PE ist kein Bestandteil der Light-Kriterien, deutet aber ab einem Wert > 30 g/l auf das Vorliegen eines Exsudats hin (151). Die Konzentration aller analysierten PE überschritt diesen Grenzwert.

Der hier aufgezeigte exsudative Charakter von Pleuraergüssen pädiatrischer Patienten nach kardiochirurgischer Operation lässt somit auf eine Schädigung pleuraler Strukturen mit Permeabilitätssteigerung und konsekutivem Einstrom von Zellen und Proteinen aus dem Blut schließen.

4.2 Ursprung von Leukozyten und Zytokinen in Pleuraergüssen

Im physiologischen Zustand ist der Austausch von Stoffen zwischen dem systemischen Blutkreislauf und der Pleurahöhle gering. Wasser, Elektrolyte und Proteine, aber keine Zellen, können aus Blutgefäßen durch die intakte Endothelzellschicht in das umgebende Interstitium

gelangen. Von dort gelangen sie vor allem transzytotisch durch die Mesothelzellschicht in die Pleurahöhle und bilden die physiologische Pleuraflüssigkeit (111).

Inflammatorische Prozesse führen zu Störungen der Barrieren zwischen Blutkreislauf und Pleurahöhle. Dies induziert einen verstärkten exsudativen Einstrom von Flüssigkeit im Rahmen dessen es zur Akkumulation von Leukozyten und Zytokinen in der Pleurahöhle kommt (81,195).

4.2.1 Leukozyten in Pleuraergüssen sind systemischen Ursprungs

Nur wenige spezialisierte Zellpopulationen wie *pleural innate response activator B cells* und *pleural resident macrophages* sind im physiologischen Zustand in der Pleurahöhle resident (13). Die im Blut lokalisierten Leukozyten sind normalerweise nicht in der Lage pleurale Strukturen zu überwinden und in die Pleurahöhle zu gelangen (111,195). Somit sind die im PE nachgewiesenen PEC auf die Permeabilitätserhöhung von Endothel und Mesothel im Rahmen der inflammationsbedingten Exsudation zurückzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 37 Leukozytensubpopulationen korrespondierend in Blut und PE bestimmt. Dabei zeigte sich, dass einige Leukozytensubpopulationen tendenziell eher im Blut verbleiben, während andere bevorzugt in Pleuraergüsse (PE) einwandern.

Hierbei ist ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von Leukozytensubpopulationen in Blut und den entsprechenden Konzentrationen in PE zu vermuten. So zeigten Kalomenidis et al., dass die Anzahl von Eosinophilen in Blut positiv mit der Anzahl von Eosinophilen in PE korreliert (71). In vorliegender Arbeit konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen Blut und PE bezüglich Treg, TH, CTL und naiven CTL festgestellt werden. Hierbei ist die Migration in periphere Gewebe beziehungsweise die Persistenz in der Blutbahn unter anderem abhängig von der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothel und Leukozyten. Sowohl Orange et al. als auch Prelog et al. wiesen bei Kindern eine postoperative Akkumulation naiver T-Zellen in PE nach und schlossen aufgrund dessen auf eine präferentielle Migration naiver T-Zellen aus dem Blut in die Pleurahöhle. Komplementär zeigte sich eine Persistenz von Gedächtnis T-Zellen in Blut. Diese Persistenz führten die genannten Autoren auf eine höhere Expression von Adhäsionsmarkern wie CD2 und LFA-1 in Gedächtnis T-Zellen verglichen mit naiven T-Zellen zurück (116,133). Interessanterweise zeigt sich in vorliegender Studie ein gegenteiliges Ergebnis. Gedächtnis Effektor CTL bzw. Gedächtnis Effektor TH zeigten signifikant bzw. tendenziell höhere Konzentrationen in PE verglichen mit Blut. Umgekehrt zeigten sowohl naive TH als auch naive CTL tendenziell höhere Konzentrationen in Blut.

Auch eine Beteiligung des Oberflächenmarker CD62L an der Migration von Leukozyten aus Blutgefäßen in die Pleurahöhle wurde bisher postuliert (133). CD62L ist als *homing factor* bekannt und vermittelt normalerweise die Migration von Leukozyten durch hochendotheliale Venolen in sekundär lymphatische Organe (53,67). In PE konnte eine Erhöhung von CD62L positiven T-Zellen gegenüber Blut festgestellt werden (133). Es ist jedoch zu beachten, dass dies nur auf CD62L positive CTL zutraf, während CD62L positive TH keine Erhöhung in PE

aufwiesen. Somit scheint das Kriterium der Expression von CD62L kein allgemein gültiges zu sein. Tatsächlich konnte im Rahmen vorliegender Studie eine Erhöhung von CD62L positiver Zellen in PE weder bei TH noch bei CTL nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich keine Korrelation bezüglich aller CD62L positiven Zellpopulationen zwischen Blut und PE. Folglich können die Ergebnisse der vorliegenden Studie keine obligat-bedeutsame Beteiligung von CD62L an der Migration von Leukozyten aus Blutgefäßen in die Pleurahöhle aufzeigen. Dabei ist zu beachten, dass CD62L nicht isoliert fungiert, sondern nur in Interaktion mit weiteren Molekülen auf Leukozyten und Endothel agiert (67,193).

Prelog et al. formulierten weiterhin die Alternativhypothese, dass Leukozyten ungerichtet in PE gelangen, aber nur spezifische Leukozytensubpopulationen überleben, während andere Leukozytensubpopulationen durch Apoptose zugrunde gehen (133). Dies würde einer gerichteten Migration, die von Oberflächenmarkern abhängt, widersprechen. Weder Prelog et al. selbst, noch die in vorliegender Arbeit allgemein hohe Zellviabilität kann die Hypothese der spezifischen Apoptose einzelner Leukozytensubpopulationen überprüfen.

Bei der Auswertung von Immunzellen in PE ist die lokale Zytokinumgebung zu berücksichtigen. Zum einen können Zytokine chemotaktische Eigenschaften aufweisen und somit die Migration von Immunzellen aus dem systemischen Blutkreislauf in die Pleurahöhle fördern (64). Antony et al. konnten zeigen, dass IL-8 und MCP-1 an der Direktion von Neutrophilen und Monozyten in die Pleurahöhle beteiligt sind (7). Des Weiteren führen Zytokine zur Ausdifferenzierung von Immunzellen (91,101). Somit könnten Immunzellen nach Einwanderung in die Pleurahöhle unter der lokalen Immuneinwirkung ihr Expressionsmuster potentiell noch verändern. So liegt IL-7, das die Entwicklung von naiven zu Gedächtnis T-Helferzellen fördert (31), im Rahmen dieser Arbeit in hohen Konzentrationen in PE vor (4.3.10). Weiterhin differenzieren sich naive T-Zellen unter dem Einfluss von IFN- γ zu TH1 (4.3.2), via IL-4 und IL-5 zu TH2-Zellen (4.3.3), und IL-6 und IL-23 induzieren die Entstehung von TH17 (4.3.4) (1,15,76).

Der Durchtritt von Zellen aus Blutgefäßen in die Pleurahöhle kann zudem durch Zytokine beeinflusst werden. Sowohl lokal als auch systemisch konnten in vorliegender Arbeit hohe Konzentrationen von TNF gemessen werden. Von TNF aktivierte Endothelzellen exprimieren vermehrt luminale Oberflächenproteine wie E-Selektin und ICAM-1, die eine Voraussetzung für die Bindung und anschließende Diapedese von Leukozyten sind (94,131).

Die parietale Pleura besitzt sogenannte Stomata, die den blinden Anfang von Lymphgefäßen darstellen. Darüber erfolgt die körpereigene Drainage der Pleuraflüssigkeit in das Lymphgefäßsystem, welches schließlich im venösen Blutsystem mündet. Die Stomata weisen einen Durchmesser von bis zu 40 μm auf (111,175). Folglich ist eine Drainage von PEC in das Lymphgefäßsystem grundsätzlich möglich. Jedoch lag bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten eine Pleuradrainage vor. Somit wurden PEC größtenteils nach extern drainiert und der Rückführung in den systemischen Kreislauf entzogen.

4.2.2 Zytokine in Pleuraergüssen sind systemischen und lokalen Ursprungs

In Pleuraergüssen lokalisierte Zytokine können verschiedene Ursprünge haben. Grundlegend kann man systemische (4.2.2.1) von lokalen (4.2.2.2) Ursprüngen unterscheiden.

4.2.2.1 Zytokine in Pleuraergüssen sind systemischen Ursprungs

Im Rahmen der Exsudation gelangen durch Permeabilitätserhöhung des Endothels und des Mesothels Proteine aus dem Blut in die Pleurahöhle (106). Wenn aufgrund einer Inflammation Zytokine im Blut vorliegen, werden auch diese in die Pleurahöhle gelangen, da sie sich in Struktur und Größe nicht grundlegend von anderen Proteinen unterscheiden (157). Das erhöhte Vorkommen von Zytokinen in PE scheint ein Charakteristikum von Exsudaten zu sein. Studien zeigten, dass Zytokine wie IL-1b, IL-2, IL-6, IL-8, TNF, VEGF, MIF und MIP3a in Exsudaten in signifikant höheren Konzentrationen vorliegen als in Transsudaten und teilweise in Transsudaten sogar gar nicht nachweisbar waren (2,107,115,185). Ergänzend zu den in vorgenannten Studien untersuchten Zytokinen konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Vorkommen von IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN- γ und GM-CSF in Exsudaten nachgewiesen werden. Jedoch muss beachtet werden, dass das Ziel der vorliegenden Arbeit nicht der immunologische Vergleich von Exsudaten und Transsudaten war und auch nur ein Transsudat vorlag, weshalb hier nur auf das gemeinsame Auftreten von Exsudaten und immunologischen Faktoren in PE hingewiesen werden kann.

Zusammenhänge zwischen Zytokinlevels in Blut und PE konnten in vorliegender Arbeit mittels Korrelationsanalysen festgestellt werden. 75 Prozent der Zytokine zeigten eine signifikant positive Korrelation. Obwohl daraus keine Kausalzusammenhänge ableitbar sind, kommen grundsätzlich drei Möglichkeiten des Zusammenhangs zwischen Zytokinlevels in Blut und PE in Betracht: 1. Zytokinerhöhung in Blut führt zu Zytokinerhöhung in PE, 2. Zytokinerhöhung in PE führt zu Zytokinerhöhung in Blut oder 3. andere Faktoren, wie z.B. die schwere des operativen Schadens, wirken als Mediatoren gleichsam auf Zytokinerhöhung in Blut und PE. Aufgrund theoretischer Überlegungen erscheint jedoch die 2. Möglichkeit als unwahrscheinlich. Grundsätzlich wird ein PE mit entsprechend enthaltenen Stoffen über Stomata in der parietalen Pleura teilweise drainiert und über Lymphgefäße dem systemischen, venösen Kreislauf zugeführt (175). In unserer Studie lag jedoch bei allen Kindern eine Pleuradrainage vor, womit ein Großteil des PE inklusive enthaltener Zytokine nach extern abgeleitet wurde und somit nicht mehr in den systemischen Kreislauf gelangen kann.

Mehrere im Rahmen der vorliegenden Arbeit in PE nachgewiesenen Zytokine sind an der Erhöhung der Gefäßpermeabilität beteiligt, die zur Ausbildung von PE führen kann. TNF, welches in PE erhöht war, führt als pro-inflammatorisches Zytokin zu einer gesteigerten Permeabilität von Endothelzellen der Blutgefäße (95). Auch die mit der TH2-Immunantwort assoziierten Zytokine IL-4 und IL-5, welche in Blut und PE nachweisbar waren, erhöhen die Permeabilität von Endothelzellen der Blutgefäße (153,176). Das Phänomen von

Flüssigkeitsverlust aus dem Gefäßsystem nach peripher qua TH2 assoziierter Zytokine ist von allergischen Erkrankungen bekannt (83). Jedoch konnte auch bei Kindern nach kardiochirurgischer Operation ein Zusammenhang der TH2-Immunantwort in Blut mit postoperativen PE festgestellt werden (17).

4.2.2.2 Zytokine in Pleuraergüssen sind lokalen Ursprungs

Im Folgenden werden zwei mögliche Ursprünge lokaler Zytokinproduktion in der Pleurahöhle diskutiert. Zum einen könnten die im Rahmen dieser Arbeit nachweisbaren PEC in der Lage sein Zytokine zu produzieren. So zeigte sich, dass circa 90 Prozent der PEC lebendig war. Zudem waren circa ein Drittel der TH und CTL in PE Effektorzellen und somit funktionell in der Lage Zytokine zu produzieren (174). Weiterhin konnten Prelog et al. eine Erhöhung von Aktivitätsmarkern wie HLA-DR auf Leukozyten in PE feststellen (133). Huang et al. zeigten, dass T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen in PE maligner Genese eine höhere genetische Transkriptionsaktivität haben als in Blut (62). Analysen der mRNA-Expression in *pleural effusion cells* (PEC) von Kindern nach kardiochirurgischer Operation könnten weitere Klarheit über die Aktivität und Fähigkeit der Zytokinproduktion von PEC schaffen und sollten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Die Ausschüttung spezifischer Zytokin kann im Sinne einer positiven Rückkopplung die Ausschüttung weiterer Zytokine derselben Art vermitteln. Eine signifikant positive Korrelation zwischen PEC und Zytokinen in Pleuraergüssen konnte bei doppelt-negativen T-Zellen nachgewiesen werden, deren Konzentration mit IFN- γ , IL-7 und IL-17A korrelierte.

Zum anderen haben neben PEC auch Mesothelzellen immunologische Eigenschaften. Sie bilden die der Pleurahöhle zugewandte Zellschicht der Pleura und sind somit in direktem Kontakt zum PE. Mesothelzellen besitzen die Fähigkeit zur Antigenpräsentation (58,152,165), Phagozytose (152,170) und Zytokinproduktion mit nachfolgender T-Zell-Aktivierung bspw. via IL-15 (58). Bei exsudativen PE nicht-maligner Genese konnten Fujino et al. Mesothelzellen als einen Ursprungsort von IL-6 identifizieren. Dabei wirkte IL-6 unter anderem als autokriner Wachstumsfaktor. Zudem wurde eine erhöhte mRNA-Expression des *IL-6* Gens in Mesothelzellen der Pleura nachgewiesen (50). Insbesondere die im Rahmen vorliegender Arbeit ermittelten IL-6 Werte weisen auf eine lokale Produktion von IL-6 hin. Während die systemischen IL-6 Werte in Blut größtenteils im Normbereich lagen (144), waren die in PE gemessenen IL-6 Werte um mehr als das 200-Fache höher und haben somit möglicherweise eine lokale Quelle; entweder in Form von Mesothelzellen oder IL-6 produzierenden PEC.

Die meisten Zytokine wirken para- oder autokrin und liegen am Produktionsort in lokal hoher Konzentration vor. Messungen von Zytokinen in Blut zeigen häufig nur den systemischen Überschuss einer lokalen Immunantwort an (157). So ist bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Erhöhung von TNF im Blut messbar, obwohl die Entzündung primär den Darm betrifft (125). Somit sind in Blut gemessene Zytokine häufig nur Surrogate für lokale

Inflammationen. In vorliegender Arbeit lagen die in der Pädiatrie gebräuchlichen Sepismarker IL-6 und IL-8 beim Großteil der Patienten in altersadaptierten Normbereichen (190). Erst die lokale Messung in PE offenbarte somit die lokale Inflammation. Vorteilhaft ist dabei zudem, dass bei ohnehin einliegender Pleuradrainage die Diagnose einer lokalen Inflammation ohne zusätzliche Blutentnahme getroffen werden kann.

4.3 Immunantwort in Pleuraergüssen pädiatrischer Patienten nach kardiochirurgischer Operation

In vorliegender Arbeit wurden immunologische Charakteristika von Pleuraergüssen (PE) in Form von Leukozyten und Zytokinen ermittelt. Die Immunreaktion in den untersuchten PE ist hierbei nicht auf Pathogene zurückzuführen und unterscheidet sich in diesem Aspekt von infektiologischen PE im Rahmen von Tuberkulose oder Pneumonien. Auslöser der nicht-infektiologischen Immunreaktion von PE nach kardiochirurgischen Operationen ist die Schädigung körpereigener Zellen im Rahmen der Operation und die Reaktion auf körperfremde Stoffe (19,20,122).

4.3.1 Die Anteile von Leukozytensubpopulationen unterscheiden sich zwischen Blut und Pleuraergüssen

In vorliegender Arbeit wurden T-Zellen, B-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK), Monozyten und deren jeweilige Subpopulationen in Blut und Pleuraergüssen (PE) analysiert. Während das Vorkommen ebendieser Leukozytensubpopulationen in Blut erwartbar war, konnten auch alle 37 Leukozytensubpopulationen in PE nachgewiesen werden. Genau wie Leukozyten im Blut in unterschiedlichen Konzentrationen auftreten, lagen die analysierten Leukozytensubpopulationen in PE in unterschiedlichen Konzentrationen vor.

Der Zellgehalt von Blut und physiologischer Pleuraflüssigkeit unterscheidet sich. Blut gesunder Patienten enthält 4-6 Millionen Erythrozyten, 150.000 - 400.000 Thrombozyten und 4.000 - 10.000 Leukozyten pro Mikroliter (163). Hingegen enthält die Pleuraflüssigkeit im physiologischen Zustand nur Lymphozyten und Monozyten mit einer gemeinsamen Konzentration von 1500 - 4000 Zellen pro Mikroliter und abgeschilferte Mesothelzellen (113). In vorliegender Arbeit wurden Konzentrationen von *pleural effusion cells* (PEC) in Höhe von bis zu 10.000 Zellen pro Mikroliter ermittelt, was auf einen zusätzlichen Einstrom von Zellen im Rahmen der Exsudation hinweist.

Bisherige Studien konnten vor allem eine Akkumulation von T-Zellen in PE gegenüber Blut nachweisen; jedoch wurden diese Studien an nur einer einstelligen Anzahl von Kindern durchgeführt und es wurden nur wenige weitere T-Zell-Subpopulationen untersucht (116,133). Im Gegensatz dazu wurde in vorliegender Studie eine detaillierte Analyse von T-Zell-

Subpopulationen durchgeführt und insbesondere bezüglich CD4 positiver T-Zellen wurde eine Akkumulation in PE nachgewiesen. So war der Anteil von TH1 und TH17 signifikant höher in PE verglichen mit Blut und ein gleichgerichteter Trend lag bei Treg vor. Auch DN T-Zellen waren mit circa doppelt so hohen Konzentrationen in PE verglichen mit Blut vorhanden.

Insgesamt stellten Monozyten, gefolgt von T-Zellen, die größte Leukozytensubpopulation in PE pädiatrischer Patienten nach kardiochirurgischer Operation dar. In weiterhin abnehmender Reihenfolge waren B-Zellen und NK messbar. Dabei ist zu beachten, dass die Analyse von Monozyten, B-Zellen und NK nur an jeweils 7 Pleurapunktatproben erfolgte, während Analysen von T-Zellen an einem größeren Probenkollektiv mit 17 Pleurapunktatproben durchgeführt wurden. Das Vorkommen von beispielsweise Granulozyten und dendritischen Zellen in PE war kein Forschungsgegenstand. Zukünftige Analysen sollten dies vervollständigen.

4.3.2 TH1 sind in Pleuraergüssen quantitativ dominierend, jedoch ist die TH1-Immunantwort funktionell eingeschränkt

Die klassische Funktion der TH1-Immunantwort besteht in der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene, wie Viren oder dem Mykobakterium tuberculosis, jedoch tritt sie auch im Rahmen nicht-infektiologischer Zuständen wie Autoimmunerkrankungen auf (1,25,124). Analysen von PE nicht-pädiatrischer Patienten weisen darauf hin, dass die TH1-Immunantwort ein Charakteristikum tuberkulöser PE ist (191). Auch in vorliegender Arbeit war die Konzentration von TH1-Zellen in PE signifikant höher als in Blut. Insgesamt waren TH1 die quantitativ dominierende TH-Population in PE. Dies spiegelte sich auch in der TH1 / TH2 Ratio wider: Während diese im Blut zugunsten der TH2 verschoben war, lag die TH1 / TH2 Ratio in PE auf Seiten der TH1.

Ein gegensätzliches Bild zeigten die mit der TH1-Immunantwort assoziierten Zytokine IFN- γ und IL-12. Beide wiesen signifikant höhere Zytokinwerten in Blut verglichen mit PE auf. Die PE / Blut Ratios von IFN- γ bzw. IL-12 zeigten interessanterweise gleichartige Werte auf. Die trotz quantitativ in PE erhöhter TH1 niedrige Konzentration TH1-assoziiierter Zytokinen in PE deutet auf eine niedrige Aktivität der TH1 in PE hin. Genexpressionsanalysen von *TBX-21* könnten dieses Mismatch in zukünftigen Analysen weiter aufklären.

4.3.3 Die TH2-Immunantwort ist ausgeglichen zwischen Pleuraergüssen und Blut

Die TH2-Immunantwort wird klassischerweise durch Infektionen mit extrazellulären Parasiten, insbesondere Helminthen ausgelöst. Zudem ist sie Bestandteil allergischer Reaktionen und führt im Rahmen dessen zu Vasodilatation und Permeabilitätserhöhung von Gefäßen mit konsekutivem Flüssigkeitsaustritt ins Interstitium (83,173). Auch der Pathophysiologie von Pleuraergüssen (PE) liegt ein erhöhter Durchtritt von Flüssigkeit durch Zellbarrieren zugrunde (111). Dabei sind zwei Formen von PE in ihrer Entstehung mit der TH2-Immunantwort assoziiert. Zum einen zeigten Zeng et al. in einer Metaanalyse, dass maligne PE mit einem

Zytokin-Milieu bestehend aus IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 assoziiert sind, welche allesamt mit der TH2-Immunantwort assoziiert sind (191). Des Weiteren liegt auch ein Zusammenhang mit PE nach kinderkardiologischer Operation vor. Bocsi et al. konnten nachweisen, dass bereits im präoperativen Stadium eine Verschiebung der TH1 / TH2 Ratio zugunsten der TH2-Immunantwort das Risiko für die Entstehung postoperativer PE nach kinderkardiologischer Operation erhöht (17). Dabei wurden Zytokine und Antikörper jedoch nur in Blut analysiert. Im Rahmen vorliegender Arbeit wurden sowohl Zytokine als auch Zellen der TH2-Immunantwort in korrespondierenden Blut- und Pleurapunktatproben analysiert. Die durchgeführte Genexpressionsanalyse des TH2-assoziierten GATA3 wies methodische Mängel auf und sollte in zukünftigen Untersuchungen wiederholt werden.

Die Konzentrationen von TH2-Zellen waren in PE und in Blut beinahe identisch. Eine Ausgeglichenheit zwischen Blut und PE lag auch bezüglich der TH2 spezifischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 vor. Sowohl IL-4 als auch IL-13 unterschieden sich nicht signifikant zwischen Blut und PE. Bei IL-5 lag ein signifikanter Unterschied zugunsten der PE vor. Auch Kalomenidis et al. fanden nach kardiologischen Operationen signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-5 in PE gegenüber Blut und eine positive Korrelation zwischen IL-5 in Blut und PE (71). Letzteres konnte in vorliegender Arbeit nicht bestätigt werden und es muss auch beachtet werden, dass der gemessene Unterschied bezüglich IL-5 zwar ein statistisch signifikanter, aber klinisch wahrscheinlich vernachlässigbarer war.

Nichtsdestotrotz wäre eine Ausweitung der Analyse TH2-assoziiierter immunologischer Faktoren bezüglich Eosinophilen und IgE-Antikörper auch bei pädiatrischen Patienten hilfreich, um das Verständnis der TH2-Immunantwort in PE zu komplettieren.

4.3.4 Die TH17-Immunantwort ist in Pleuraergüssen nur marginal ausgeprägt

Die TH17-Immunantwort wird meist mit der Bekämpfung extrazellulärer Bakterien und Pilze assoziiert (39). Jedoch ist sie auch bei nicht-infektiologischen Zuständen wie Adipositas aktiv (147) und in die Pathophysiologie maligner PE involviert (187). Im Gegensatz zu malignen PE scheint die TH17-Immunantwort in PE nach kinderkardiologischer Operation keine zentrale Rolle einzunehmen. Unter den analysierten TH-Populationen waren TH17 in PE quantitativ am geringsten ausgeprägt. Obwohl ihr Anteil in PE signifikant höher war als in Blut, wurden sie quantitativ von TH1 und TH2 um mehr als das Vierfache übertroffen. Auch das von TH17 produzierte IL-17A war in PE nur in geringen Konzentrationen vorhanden und im Vergleich zu Blut erniedrigt.

Die Entwicklung naiver T-Zellen zu TH17 wird u.a. durch IL-6 gefördert. Dabei zeigte sich in vorliegender Arbeit eine Diskrepanz zwischen extrem hohen IL-6 Werten und niedrigen TH17 Werten in PE. Dies deutet darauf hin, dass andere Zytokine, die die TH17-Entwicklung induzieren in PE nicht oder nur wenig vorhanden sind. Dazu gehören z. B. IL-23 und TGF- β , welche zukünftig zur Stützung ebendieser Hypothese in PE untersucht werden sollten (56).

4.3.5 Regulatorische T-Zellen und IL-10 wirken antiinflammatorisch in Pleuraergüssen

Regulatorische T-Zellen (Treg) wirken via Sezernierung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β supprimierend auf die Aktivierung des Immunsystems und regulieren nach erfolgter Immunantwort das Ende derselben (54,167). Der Anteil von Treg an allen CD4+ Zellen im Blut wird in der Literatur mit 5-10 Prozent angegeben (9). Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Treg wiesen in Blut einen Anteil von 10 Prozent an allen CD4+ Zellen auf und waren somit normwertig. Hingegen zeigte die Konzentration von Treg in Pleuraergüssen (PE) mit circa 16 Prozent einen tendenziell höheren Anteil. Die Konzentration von IL-10 war in PE signifikant größer als im Blut und zeigte in PE fünfmal höhere Werte als in Blut.

IL-10 hemmt die Produktion von IL-12 und IL-23 durch Monozyten und vermindert damit indirekt die Ausdifferenzierung naiver T-Zellen zu Effektorzellen der TH1- und TH17-Immunantwort (56,57). Dabei ist jedoch zu beachten, dass IL-10 nicht spezifisch für Treg ist, sondern unter bestimmten Bedingungen wie chronischer Reaktion auf persistierende Antigene auch von TH2, TH17 und B-Zellen produziert werden kann (28). Die Bedeutung von Treg und IL-10 wird durch Zustände ihrer quantitativen Verminderung deutlich, die zu Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel chronisch entzündlichen Darmerkrankungen führen können (84).

Treg und IL-10 könnten in PE ein wichtiger Gegenspieler zu den bereits beschriebenen proinflammatorischen Prozessen sein und die lokal in der Pleurahöhle ablaufende Immunreaktion terminieren, um langfristige Schädigungen durch hohe lokale Einwirkung von bspw. IL-6 oder TNF zu vermeiden. Ein ebensolcher Effekt konnte in Aszites nachgewiesen werden, in dem Treg die Aktivität von T-Zellen vermindern (120). Während im Rahmen der vorliegenden Arbeit Analysen nur zu einem Zeitpunkt durchgeführt wurden, welcher einen medianen Zeitabstand von nur 2 Tagen zur Operation hatte, wären Verlaufsanalysen mit mehreren zeitlich versetzten Abnahmen von Pleurapunktaten interessant. Möglicherweise wäre im Verlauf eine steigende antiinflammatorische Immunantwort, repräsentiert durch Treg und IL-10, und ein Abfall proinflammatorischer Komponenten zu beobachten. Nähere Untersuchungen der antiinflammatorischen Immunreaktion in PE scheinen zudem hinsichtlich therapeutischer Einflussmöglichkeiten sinnvoll. So ist bekannt, dass die medikamentöse Gabe von Kortison die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 erhöht (47,65). Umgekehrt führt IL-10 zur Ausschüttung von Kortisol und ist mit einer organprotektiven Wirkung während kardiochirurgische Operationen assoziiert (150).

In zukünftigen Studien könnte die Analyse des von Treg produzierten TGF- β das Verständnis antiinflammatorischer Prozessen in PE weiter komplettieren. Auch die Untersuchung von Treg-Subpopulationen wie *natural* Treg (nTreg) und *induced* Treg (iTreg) in PE wäre interessant, da sich iTreg in Anwesenheit von IL-6 nicht ausdifferenzieren (72,189). Hypothetisch dürften in PE mit extrem hohen lokalen IL-6 Konzentrationen, wie sie in vorliegender Arbeit zu finden

waren, also vornehmlich nTreg vorhanden sein. Auch die Frage, ob eine zu starke Reaktion von IL-10 und Treg zu negativen Effekten im Sinne eines erhöhten postoperativen Infektionsrisikos führt, sollte zukünftig zur Diskussion stehen.

4.3.6 Doppelt-negative T-Zellen in Pleuraergüssen überschreiten klassische Modelle der Zytokinantwort

Doppelt-negative T-Zellen (DN T-Zellen) sind CD3 positiv, aber exprimieren weder CD4 noch CD8. Sie sind sowohl in pro- als auch antiinflammatorische Immunantworten involviert und repräsentieren in Blut circa 3-5 Prozent aller T-Zellen (48,184). Interessanterweise lag die Konzentration von DN T-Zellen in Blut in vorliegender Arbeit verglichen mit den in der Literatur angegebenen Normwerten bei doppelt bis dreifach höheren Werten. In PE war die Konzentration von DN T-Zellen sogar noch einmal doppelt so hoch wie in korrespondierenden Blutproben. Die erhöhten Werte von DN T-Zellen in PE können begründet sein im hohen Migrationspotential von DN T-Zellen in periphere Gewebe.

Es existieren verschiedene Subtypen von DN T-Zellen, wie Zytotoxische oder T-Helferzell-artige DN T-Zellen. Letztere sind unter anderem in der Lage IFN- γ , IL-4 und IL-17 zu produzieren (184). Damit überschreiten sie die Grenzen konventioneller TH-Zellen, die je nach Subtyp ein klassisches Repertoire produzierter Zytokine aufweisen (1). Tatsächlich konnte im Rahmen der Korrelationsanalyse zwischen Immunzellen und Zytokinen in hiesiger Arbeit ein positiver Zusammenhang zwischen DN T-Zellen und IFN- γ bzw. IL-17A nachgewiesen werden. In klassischen Modellen wird IFN- γ der TH1-Immunantwort und TH17 der TH17-Immunantwort zugerechnet (1).

Im Gegensatz zu TH und CTL, die größtenteils einen $\alpha\beta$ -positiven T-Zellrezeptor (TCR $\alpha\beta$ ⁺) besitzen, exprimieren DN T-Zellen entweder einen $\alpha\beta$ -positiven T-Zellrezeptor oder $\gamma\delta$ -positiven T-Zellrezeptor (TCR $\gamma\delta$). Zellen mit TCR $\gamma\delta$ fördern Wundheilungsprozesse und sind in der Lage Chemokine, wie IP10, RANTES und MIP zu produzieren, die an der Rekrutierung von Monozyten, NK, T- und B-Zellen in PE beteiligt sein könnten (140,166). Eine durchflusszytometrische Differenzierung von DN T-Zelle mit TCR $\alpha\beta$ oder TCR $\gamma\delta$ wurde in vorliegender Arbeit nicht vorgenommen, könnte zukünftig jedoch weitere Einblicke in Funktionen von DN T-Zellen in PE geben.

4.3.7 Zytotoxische Immunreaktionen in Form Zytotoxischer T-Zellen und Natürlicher Killerzellen sind in Pleuraergüssen gering ausgeprägt

NK können virusinfizierte oder tumoröse Zellen abtöten (93,180). IL-12 aktiviert NK und verstärkt ihre Zytotoxizität. Gleichzeitig sind NK auch selbst in der Lage IL-12 zu produzieren (164). Die Beteiligung von NK an der Immunantwort in PE scheint marginal zu sein. Dies zeigte sich bereits in einer Studie von Orange et al., die niedrigere Konzentrationen von NK in PE verglichen mit Blut aufzeigte (116). In vorliegender Arbeit machten NK nur circa 1,5 Prozent

der lebenden Zellen in PE aus. Innerhalb von NK-Subpopulationen lassen sich funktionell CD56^{dim} und CD56^{bright} NK unterscheiden. CD56^{bright} NK produzieren eher Zytokine wie IFN- γ und IL-12, während CD56^{dim} NK zytotoxisch wirken (35,192). Der Anteil beider untersuchten CD56^{bright} NK-Subpopulationen lag in PE jeweils unter 3 Prozent. Die geringe Konzentration von NK assoziierten Zytokinen in PE stimmen mit der geringen Menge an CD56^{bright} NK überein. CD16⁺CD56^{dim} hingegen sind eine reifere Form von NK und die häufigste NK-Subpopulation in Blut. Tatsächlich stellten sie auch in PE die häufigste NK-Subpopulation dar. Jedoch ist zu beachten, dass ihr Anteil PE nichtsdestotrotz geringer als in Blut war, was auf eine niedrigere Relevanz in PE hindeutet.

Im Unterschied zu NK sind Zytotoxische T-Zellen (CTL) der adaptiven Immunantwort zuzuordnen. CTL können ebenso wie NK bei Zielzellen die Apoptose einleiten und sind mit der TH1-Immunantwort assoziiert (11,30,136). Die Ratio von CD4-positiven TH zu CD8-positiven CTL (CD4 / CD8 Ratio) war mit 1,7 in Blut zugunsten der TH verschoben und lag damit im Normbereich (>1). Für PE liegen keine diesbezüglichen Normwerte vor. Die CD4 / CD8 Ratio lag in PE bei 2,0. Im vorliegenden Fall war dies auf eine prozentuale Erniedrigung von CTL zurückzuführen, was ebenfalls auf eine geringere Ausprägung zytotoxischer Immunreaktionen in PE hinweist.

4.3.8 Frühe Entwicklungsstufen von B-Zellen sind in Pleuraergüssen dominierend

Die präsentierten Ergebnisse zeigen, dass B-Zellen und alle 12 analysierten B-Zell-Subpopulationen sowohl in Blut als auch in Pleuraergüssen (PE) pädiatrischer Patienten nach kardiochirurgischer Operation zu finden sind. Während diese Erkenntnis hinsichtlich der Analyse von Blut nicht überrascht, ist dies bis dato der erste Nachweis detaillierter B-Zell-Subpopulationen in PE des beschriebenen Patientenkollektivs.

Kovacikova et al. zeigten, dass B-Zellen in Blut kinderkardiochirurgischer Patienten mit PE erniedrigt waren, was potentiell auf einen Verlust von B-Zellen durch den PE hinweist (79). Jedoch analysierten diese Studie keine PE, die den Verlust weiter verifiziert hätte. Bénard et al. wiesen im Mausmodell bei infektiösen PE angeborene B-Zellen in PE nach (13). Auch in vorliegender Arbeit wurden angeborene B-Zellen in PE analysiert und mit den entsprechenden Anteilen in Blut verglichen. Angeborene B-Zellen waren dabei die einzige der analysierten B-Zell-Subpopulationen, deren Anteil in PE höher war als in Blut.

Zusätzlich zu den angeborenen B-Zellen stellen die in vorliegender Arbeit analysierten B-Zell-Subpopulationen verschiedene Entwicklungsstufen von B-Zellen dar. Dabei fiel auf, dass in PE frühe Entwicklungsstufen wie naive B-Zellen und Transitionale B-Zellen am häufigsten vorkamen. Hingegen waren die Anteile von Plasmablasten und aller analysierten B-Gedächtniszellen (Marginalzonen-ähnliche Gedächtnis B-Zellen, IgM Gedächtnis B-Zellen, Klassengewechselte Gedächtnis B-Zellen, Späte Gedächtnis B-Zellen, Gedächtnis B1- und B2-Zellen) in PE niedrig. Die niedrigen Anteile von Gedächtnis B-Zellen in PE könnten darin

begründet sein, dass die Proben bereits nach einer medianen Zeitdauer von 2 Tagen postoperativ abgenommen wurde und sich somit noch kein immunologisches Gedächtnis in PE ausbilden konnte. Interessanterweise zeigte sich in korrespondierenden Blutproben ein von der B-Zell-Immunologie in PE abweichendes Bild. In Blut war der Anteil von Gedächtnis B-Zellen bis zu fünfmal stärker ausgeprägt. Die hohen Anteile von Gedächtnis B-Zellen in Blut, die sich nicht in PE widerspiegeln, verstärken die Vermutung, dass kein unspezifischer, sondern ein gerichteter Einfluss von Zellpopulationen aus dem Blut in PE vorliegt.

B-Zellen benötigen unter anderem spezifische Zytokine zur Entwicklung. IL-7 spielt dabei eine Schlüsselrolle (31) und war in PE signifikant höher als in Blut. Das Verhältnis von B-Zellen in frühem versus spätem Stadium könnte sich somit unter Einfluss von IL-7 noch ändern. Eine zu multiplen Zeitpunkten erfolgende Probenentnahme könnte die Entwicklung von B-Zellen in PE nachverfolgen.

Während in vorliegender Arbeit der Fokus auf der T-Zell-Immunantwort in PE lag, sollte in zukünftigen Untersuchungen eine spezifischere Analyse der B-Zell-Immunantwort angestrebt werden. Dafür ist eine größere Anzahl von Proben für B-Zell-assoziierte Analysen notwendig. Zudem könnten neben der durchflusszytometrischen Analyse von B-Zell-Subpopulationen auch Analysen von Antikörpern in PE durchgeführt werden.

4.3.9 B1- und B2-Zellen sind in Pleuraergüssen präsent

B-Zellen lassen sich in B1- und B2-Zellen unterteilen. Die Unterscheidung ist für das Verständnis der B-Zell-Immunantwort in Pleuraergüssen (PE) von großer Bedeutung, da sich B1-Zellen bereits im physiologischen Zustand in der Pleurahöhle aufhalten, während B2-Zellen vor allem in Blut und Lymphorganen lokalisiert sind (12,86,109).

Studien bei Erwachsenen zeigen, dass das Verhältnis von B1- / B2-Zellen in Blut bei 1:3 liegt (57,89). Das in vorliegender Arbeit analysierte Patientenkollektiv umfasste Kinder und Jugendliche, wobei der Anteil von Kindern unter einem Jahr stark ausgeprägt ist. Da B1-Zellen ein Teil des angeborenen Immunsystems sind und bereits im Fetus produziert werden, stellen sie bei Neugeborenen den Großteil aller B-Zellen dar (108,109). Auch in unserer Studie konnte der altersbedingte Einfluss auf das Verhältnis von B1- / B2-Zellen dargestellt werden. Das Verhältnis von B1- / B2-Zellen lag in Blut bei 1:2 und befand sich damit zwischen der Dominanz von B1-Zellen bei Neugeborenen und der Dominanz der B2-Zellen bei Erwachsenen.

Während der Anteil von B1-Zellen zwischen Blut und PE ausgeglichen war, war derjenige von B2-Zellen in Blut doppelt so hoch wie in PE. Die in PE nachgewiesenen B2-Zellen stellen keinen physiologischen Zustand dar und sind auf die Exsudation im Rahmen der lokalen inflammatorischen Prozesse zurückzuführen. Dass B2-Zellen in der für sie unphysiologischen Umgebung überleben, könnte in der im Ergebnisteil dargestellten hohen Konzentration von IL-7 begründet sein, welches auf B-Zellen antiapoptotisch wirkt (145).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der Anteil von B1- und B2-Gedächtnis-Zellen in PE niedrig ist. Dies könnte darin begründet sein, dass die vorliegende Analyse einen Zeitpunkt beschreibt, zu dem sich Gedächtnis-Zellen noch nicht in größerer Zahl entwickelt haben. Dies stimmt mit dem in Kapitel 4.4.9 beschriebenen Trend überein, dass frühe Entwicklungsstufen von B-Zellen in PE am häufigsten sind. Auch bezüglich B1- und B2-Zellen wäre in zukünftigen Studien die Analyse von Gedächtnis-Zellen in PE zu mehreren Zeitpunkten interessant. Denn insbesondere für die Entwicklung von B2-Zellen erfüllten die in vorliegender Arbeit präsentierten PE wichtige Voraussetzungen. Zum einen lag eine hohe Konzentration von IL-7 vor, dass die Entwicklung von B2-Gedächtniszellen fördert. Zum anderen ist für die Aktivierung von B2-Zellen die Interaktion mit T-Zellen obligat, deren Vorkommen in PE in vorliegender Arbeit nachgewiesen wurden (36,121). B1-Zellen sind nur in der Lage IgM-Antikörper zu produzieren, während B2-Zellen nach dem Klassenwechsel auch hochspezifische IgG-Antikörper produzieren können (159). Zukünftige Analysen von Antikörper in PE würden auch zur exakteren Differenzierung der B1- und B2-Zell-Immunantwort beitragen.

Eine Untergruppe von B1-Zellen sind die von Bénard et al. bei infektiösen PE im Mausmodell nachgewiesenen *pleural innate response activator B cells*. Diese sind in der Lage IL-3 und GM-CSF zu produzieren (13). Das im Rahmen vorliegender Arbeit in PE nachgewiesene GM-CSF könnte folglich unter anderem von *pleural innate response activator B cells* stammen.

4.3.10 IL-7 fördert die Entwicklung von T-Zellen und B-Zellen

IL-7 ist an der Entwicklung und Aufrechterhaltung ausgereifter Formen von T- und B- Zellen beteiligt. Es wird von nicht-hämatopoetischen Stromazellen und Epithelzellen sezerniert. Lymphozyten sind nicht in der Lage IL-7 zu produzieren (10,31,179). Die Konzentration von IL-7 war in vorliegender Arbeit mit mehr als doppelt so hohen Werten in PE signifikant größer als in Blut. IL-7 fördert die Transition von naiven zu Gedächtnis TH-Zellen (10,179). Ein ebensolcher Effekt stellte sich im Vergleich von Gedächtnis Effektor T-Zellen (CD45RO+CD62L-) in PE und Blut dar. Gedächtnis Effektor Zytotoxische T-Zellen (CTL) waren in PE signifikant erhöht und Gedächtnis Effektor T-Helferzellen waren in PE tendenziell erhöht und entsprachen somit dem Verteilungsmuster von IL-7.

Während die Konzentration von naiven TH an allen TH sowohl in Blut als auch PE unter 5 Prozent lag, waren die entsprechenden Konzentrationen der drei Gedächtnis TH-Populationen (Gedächtnis Effektor TH, Gedächtnis Zentrale TH und TH EMRA) mindestens doppelt und bis zu zehnmal so hoch in PE. Mit Ausnahme von Gedächtnis Zentralen CTL, traf dies auch auf CTL-Subpopulationen zu.

Zusätzlich zur Differenzierung naiver T-Zellen zu Gedächtnis T-Zellen fördert IL-7 auch gemeinsam mit IL-15 das Überleben von T-Gedächtniszellen durch Reduktion proapoptotischer Faktoren (77). Beide Prozesse könnten die Erhöhung von Gedächtnis T-Zellen in PE bedingen. Auch an der Entwicklung von B-Zellen ist IL-7 beteiligt.

4.3.11 Monozyten könnten proinflammatorische Prozesse in Pleuraergüssen induzieren

Monozyten zirkulieren im Blut und differenzieren sich nach Auswanderung in Gewebe zu Makrophagen. Neben ihrer Funktion als wichtige Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort durch Antigenpräsentation sind sie maßgeblich an der Initiierung der Entzündungsreaktion beteiligt (41,68).

In vorliegender Studie wurden Monozyten und die Subpopulationen Klassische, Intermediäre und Nicht-Klassische Monozyten sowohl in Blut als auch Pleuraergüssen (PE) nachgewiesen. Bereits im physiologischen Zustand existieren in der Pleurahöhle zwei resident ansässige Makrophagen-Subpopulationen: Die eine ist bereits in der Embryonalentwicklung in der Pleurahöhle vorhanden, die andere entwickelt sich aus einwandernden Monozyten des systemischen Blutkreislaufs (13,74).

Makrophagen sezernieren unter anderem die proinflammatorischen Zytokine IL-1b, IL-6, IL-8 und TNF, die an der akuten Entzündungsreaktion beteiligt sind (41). Die Konzentration der drei letztgenannten Zytokine war in vorliegender Arbeit in PE signifikant höher als in Blut und sie stammen potentiell von Monozyten. Von Monozyten produziertes IL-1 β und TNF induziert über die Aktivierung von Endothelzellen einen unspezifischen Austritt von Flüssigkeit, Proteinen und Zellen aus Blutgefäßen in umliegende Gewebe (14,137), was zur Entstehung von PE führen könnte. Neben diesem eher unspezifischen Effekt wirken Monozyten via IL-8 chemotaktisch auf den Einstrom von Neutrophilen (98). Dieser Effekt wurde bereits in Bezug auf residente Makrophagen postuliert (26), kann aber durch aus dem Blut eingewanderte Monozyten zusätzlich verstärkt werden und könnte sich in den mehr als 10-fach höheren IL-8 Werten in PE verglichen mit Blut widerspiegeln.

Eine bereits bekannte Funktion der in der Pleurahöhle dauerhaft residenten Makrophagen ist die Beseitigung toter Zellen (142). Auch wenn circa 90 Prozent der PEC, die im Rahmen vorliegender Arbeit analysiert wurde, als lebende Zellen identifiziert wurden, lagen bis zu 10 Prozent tote Zellen im PE vor, die möglicherweise durch inflammatorische Prozesse irreversibel geschädigt wurden. Eine Aufgabe der Monozyten, die zusätzlich via Exsudation eingewandert sind, könnte die Mithilfe bei der Beseitigung ebendieser toten Zellen sein.

In der Literatur wird der Anteil Klassischer Monozyten (CD14+CD16-) an allen Monozyten in Blut mit 90 Prozent angegeben (41). Innerhalb vorliegender Arbeit betrug der Anteil Klassischer Monozyten in Blut circa 70 Prozent. Diese Erniedrigung kann mehrere Gründe haben. Einerseits kann ein Verlust Klassischer Monozyten aus dem Blut in PE im Rahmen der Exsudation vorliegen. Zudem können chemotaktische Faktoren einen Gradienten zugunsten der PE aufbauen. Für Letzteres spricht die Erkenntnis, dass sowohl Klassische als auch Intermediäre Monozyten in PE sogar in höheren Konzentrationen vorlagen als in Blut. Da Klassische Monozyten den Großteil aller Monozyten darstellen, zeigt sich auch bei der

Gesamtheit der Monozyten eine Erhöhung in PE gegenüber Blut. Im Gegensatz dazu waren Nicht-Klassische Monozyten die einzige analysierte Subpopulation mit höheren Konzentrationen in Blut gegenüber PE. Nicht-Klassische Monozyten rollen auf dem Endothel der Blutgefäße entlang und sind in der Lage, Schäden des Endothels ausfindig zu machen, wandern jedoch nicht in periphere Gewebe aus (23,33). Dies könnte begründen, warum Nicht-Klassische Monozyten die einzige Monozyten-Subpopulation war, deren Konzentration im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Blut höher war als in PE.

4.3.12 IL-8 könnte chemotaktische und regenerative Funktionen in Pleuraergüssen haben

IL-8 ist ein chemotaktisch wirkendes Zytokin und an der Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere Neutrophilen beteiligt. IL-8 wird nicht nur von Immunzellen wie Monozyten, Neutrophilen und Basophilen sondern auch von Nicht-Immunzellen wie Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen freigesetzt (98,181).

Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF fördern über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren des *IL-8* Gens dessen Synthese, während IL-10 und IL-4 hemmend auf die Synthese von IL-8 wirken (98,118). In den hier untersuchten Pleuraergüssen (PE) konnten sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine festgestellt werden. Insgesamt scheint zum Zeitpunkt der Probenabnahme jedoch die proinflammatorische Komponente zu dominieren, beispielsweise repräsentiert durch über 240-fach erhöhte IL-6 Werte in PE im Vergleich zu Blut, während IL-10 als das dominierende antiinflammatorische Zytokin gerade einmal 5-fach höher in PE als in Blut war. Auch die Auswirkungen auf IL-8 scheinen proinflammatorisch geprägt zu sein. So konnte in vorliegender Arbeit eine signifikante, 16-fach höhere IL-8 Konzentration in PE verglichen mit Blut nachgewiesen werden.

Da sich Immunzellen entlang des Konzentrationsgradienten von IL-8 bewegen, könnte IL-8 ein wichtiger Mediator bezüglich der Einwanderung von Leukozyten, insbesondere Neutrophilen, in PE sein. Antony et al. konnten auch einen chemotaktischen Effekt von IL-8 in PE aufzeigen, jedoch waren die untersuchten PE Empyeme oder parapneumonische Ergüsse und es lag somit eine infektiöse Situation vor (7).

Neben der chemotaktischen Funktion hat IL-8 pro-angiogenetische Effekte. Es wirkt anti-apoptotisch auf Endothelzellen und fördert deren Proliferation (21,85,135). Die hohen lokalen Konzentrationen von IL-8 in PE könnten somit der Schädigung des Endothels im Rahmen der Inflammation und Exsudation entgegenwirken. Zudem beschleunigt es Wundheilungsprozesse und könnte dadurch Schäden, die durch die Entzündung entstanden sind, beheben (138).

4.4 Einordnung des malignen Pleuraergusses

Dreißig der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Pleuraergüsse (PE) waren kardiogen-operativer Genese und nur ein PE war maligner Genese. Da die ungleiche Stichprobenanzahl keinen inferenzstatistischen Vergleich der kardiogen-operativen mit dem malignen PE zulässt, wurde lediglich eine deskriptive Einordnung des malignen PE vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass die Hälfte der im malignen PE analysierten Zytokine innerhalb der 25. bis 50. Perzentile der Werte der kardiogen-operativen PE lagen und somit eine bedingte Ähnlichkeit zu Letzteren aufwiesen. Demgegenüber befanden sich die Zytokine IL-6, IL-7, IL-8 und IL-10 in malignen PE unterhalb der 10. Perzentile und IL-12p70 auf der 90. Perzentile der Werte der kardiogen-operativen PE. In Blutproben zeigte sich hingegen nur bei IL-12p70 ein Wert außerhalb der 10. bis 90. Perzentile. Unterschiede in der Zytokinkonzentration zwischen der onkologischen und den kardiologischen Patienten stellten sich somit in PE deutlich dar als in Blut. Somit könnte die immunologische Analyse von PE zwei Vorteile mit sich bringen. Zum einen könnte sie in der Differenzierung verschiedener Arten von PE akkurater sein als die Analyse von Blutproben, zum anderen könnte im Falle einer bereits liegenden Pleuradrainage eine Blutentnahme obsolet werden, was insbesondere bei pädiatrischen Patienten von Vorteil ist.

Ein immunologischer Vergleich zwischen malignen und kinderkardiochirurgisch bedingten PE wurde in bisherigen Studien noch nie vorgenommen. Immunologische Untersuchungen von PE im Erwachsenenalter vergleichen meist maligne mit tuberkulösen Pleuraergüssen. Dabei stellte sich eine TH2-assoziierte Immunantwort als Charakteristikum maligner PE heraus (191). Im Gegensatz dazu lag in vorliegender Arbeit das mit der TH1-Immunantwort assoziierte IL-12p70 sowohl in Blut als auch PE der onkologischen Patientin oberhalb der 90. Perzentile, während keine Erhöhung TH2-assoziierte Zytokine festgestellt wurde. Interessanterweise befanden sich die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 in dem malignen PE unterhalb der 10. Perzentile der kardiologischen PE. Dies weist auf eine schwächere proinflammatorische Reaktion im malignen PE verglichen mit kardiogenen PE hin. Jedoch ist zu beachten, dass die Aussagekraft aufgrund der einzelnen Stichprobe maligner PE eingeschränkt ist.

4.5 Demographische und klinische Parameter beeinflussen immunologische Charakteristika von Pleuraergüssen

Demographische und klinische Parameter können das Immunsystem von Patienten beeinflussen. Jedoch wurde der Einfluss solcher Parameter auf das Immunsystem von Patienten nach kardiochirurgischer Operation bisher nur in Blut untersucht (18,24,46,75,177). Bis dato ist keine Studie bekannt, die den Einfluss demographischer und klinischer Parameter

auf immunologische Charakteristika von Pleuraergüssen (PE) untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der folgenden drei klinischen Parameter untersucht: Geschlecht des Patienten (weiblich vs. männlich), Alter des Patienten zum Operationszeitpunkt (< 1 Jahr vs. > 1 Jahr) und Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM vs. keine HLM). Diese drei Parameter wurden ausgewählt, weil sie eindeutig bestimmbar waren und in einer Vielzahl von Studien verwendet wurden, die jedoch immunologische Einflüsse ausschließlich in Blut untersuchten.

4.5.1 Das Geschlecht hat keine Auswirkungen auf immunologische Charakteristika von Pleuraergüssen

Geschlechtsunterschiede des Immunsystems lassen sich sowohl in gesunden als auch in pathologischen Zuständen finden. Bous et al. konnten zeigen, dass in T- und B-Zell-Subpopulationen aus Nabelschnurblut gesunder Neugeborener signifikante Unterschiede zwischen Mädchen und Jungen vorliegen (18). Trotter et al. konnten bei Kindern nach kardiochirurgischer Operation Unterschiede in der Konzentration von IL-10 zwischen Mädchen und Jungen feststellen. Die erhöhte IL-10 Konzentration im Blut weiblicher Patienten wurde dabei auf hormonelle Einflüsse von Progesteron zurückgeführt. Dabei ist zu beachten, dass sich das Geschlecht nicht auf alle Zytokine gleichermaßen auswirkt, da in selbiger Studie beispielsweise kein Unterschied der IL-8 Konzentration zwischen Mädchen und Jungen festgestellt werden konnte (162).

Die Geschlechtsunterschied-bestimmenden Analysen im Rahmen vorliegender Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Mädchen und Jungen bezüglich Zytokinkonzentrationen in PE identifizieren. Hinsichtlich Zytokinkonzentrationen in Blut wurden ebenfalls keine signifikanten Geschlechtsunterschiede festgestellt. Es ist zu beachten, dass das Geschlechterverhältnis in vorliegender Arbeit mehr als 2:1 zugunsten männlicher Patienten lag. Weitere Analysen mit einem größeren Patientenkollektiv und einem ausgeglichenerem Geschlechterverhältnis sollten angestrebt werden.

4.5.2 Säuglinge weisen eine ausgeprägte TH2-Immunantwort auf

Die hier vorliegende Analyse immunologischer Parameter in Blut und PE kinderkardiologischer Patienten steht vor der gleichen Herausforderung wie die Pädiatrie insgesamt: Gegenstand ist ein Patientenkollektiv mit einer Altersspanne von bis zu 18 Jahren, wobei sich die Patienten und deren Immunsystem in einem kontinuierlichen Entwicklungsprozess befinden, was zu einer Heterogenisierung des Patientenkollektivs führt (52).

Bisher durchgeführte Studien analysierten altersbedingte immunologische Veränderungen nur in Blut. In PE wurden solche Analysen bis dato nicht durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zwei Altersgruppen miteinander verglichen: Säuglinge (per definitionem Kinder mit einem Alter < 1 Jahr) und Nicht-Säuglinge (Kinder > 1 Jahr). Eine Aufschlüsselung in weitere

Altersgruppen ist zukünftig anzustreben (z.B. Neugeborene, Säuglinge, Kleinkinder, Kinder, Jugendliche). Dies hätte aufgrund des begrenzten Patientenkollektivs jedoch zu sehr kleinen Stichproben pro Gruppe geführt, was die statistische Auswertung erschwert hätte.

Alcaraz et al. stellten fest, dass die Konzentrationen von TNF und IL-8 bei Säuglingen höher waren als bei Nicht-Säuglingen und schlussfolgerten, dass Säuglinge und Nicht-Säuglinge jeweils charakteristische proinflammatorische Zytokinmuster nach kardiochirurgischer Operation aufweisen (5). Interessanterweise zeigte sich in vorliegender Arbeit bezüglich PE ein umgekehrtes Verteilungsmuster. Eine signifikante Erhöhung bei Nicht-Säuglingen gegenüber Säuglingen lag bei IL-8 in PE bzw. bei TNF sowohl in PE und als auch in Blut vor. Im Gegensatz dazu konnte in Blut bei folgenden Zytokinen erhöhte Konzentrationen bei Säuglingen gegenüber Nicht-Säuglingen festgestellt werden: IL-4, IL-5, IL-7, IL-12p70, IL-13, IL-17A, INF- γ und GM-CSF. Die Tatsache, dass sich diese Zytokine keinem spezifischen Muster einer Immunantwort zuordnen lassen, deutet auf eine möglicherweise allgemein ausgeprägtere Immunantwort bei Säuglingen aufgrund einer höheren Vulnerabilität hin. Insgesamt wiesen 75 Prozent der analysierten Zytokine altersabhängige Unterschiede in Blut auf, während dies in PE auf nur 25 Prozent der analysierten Zytokine zutraf. Altersabhängige Unterschiede spiegelten sich somit in Blut stärker als in PE wider.

Besonders hervorzuheben sind die Unterschiede zwischen Säuglingen und Nicht-Säuglingen bei den mit der TH-2 Immunantwort assoziierten Zytokinen IL-4 und IL-13. Während alle anderen Zytokine bei Säuglingen im Gegensatz zu Nicht-Säuglingen maximal um den Faktor 16 erhöht waren, zeigten IL-4 und IL-13 größere Unterschiede: So war IL-13 in Blut von Säuglingen mehr als 160-fach höher als bei Nicht-Säuglingen. IL-4 war in Blut circa 20-fach höher und in PE mehr als 50-fach höher bei Säuglingen versus Nicht-Säuglingen. IL-4 und IL-13 sind im Rahmen der TH2-Immunantwort unter anderem an der Erhöhung der Permeabilität von Gefäßendothel mit konsekutivem Flüssigkeitsaustritt beteiligt (83,153,173). Dieser Prozess kann an der Entstehung von PE beteiligt sein (17). Die signifikant höheren Konzentrationen von IL-4 und IL-13 bei Säuglingen zeigen möglicherweise ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von PE bei Säuglingen an. Auch Alcaraz et al. konnten eine nach kardiochirurgischer Operation verstärkte TH2-Immunantwort bei Säuglingen im Vergleich zu älteren Kindern feststellen (4).

4.5.3 Herz-Lungen-Maschinen verstärken die TH2-Immunantwort in Pleuraergüssen

Der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM) führt oftmals zu einer stärkeren Aktivierung inflammatorischer Prozesse als kardiochirurgische Operationen ohne HLM. Dies kann unter anderem durch den Kontakt mit dem körperfremden Material der HLM, die notwendige Durchführung einer Heparinisierung oder die meist komplexeren operativen Eingriffe bedingt sein (44,112,122).

Caputo et al. zeigten, dass die Konzentrationen von IL-6 und IL-8 in Blut bei Einsatz der HLM signifikant höher waren als bei Operationen ohne HLM (27). Matata et al. zeigten, dass sowohl die Konzentrationen von IL-8 und TNF als auch Komplementfaktoren und Adhäsionsmolekülen wie sE-Selektin bei Einsatz der HLM höher waren als bei Operationen ohne HLM (97). Nichtsdestotrotz ist zu beachten, dass auch Studien vorliegen, die keinen Einfluss der HLM auf die Immunantwort feststellen konnten. Tarnok et al. fanden keinen Unterschied in den Konzentrationen von IL-6, IL-8 und Adhäsionsmolekülen wie sE-Selektin und ICAM zwischen pädiatrischen Patienten, die mit oder ohne Einsatz der HLM operiert wurden (161). Im Tiermodell zeigte sich, dass bereits die Eröffnung des Thorax mittels Sternotomie zu einem massiven Anstieg der Zytokinkonzentration führen kann, der Unterschiede im darauf folgenden operativen Prozedere verschleiert (114).

Bei Kindern, die mit Einsatz der HLM operiert wurden, zeigte sich im Rahmen vorliegender Arbeit eine tendenzielle Erhöhung von IL-4 und IL-5 und eine signifikante Erhöhung von IL-13 in Blut. Diese Zytokine sind mit der TH-2 Immunantwort assoziiert (173). In PE von Kindern mit HLM waren die Konzentrationen von IL-4 und IL-13 sogar statistisch signifikant erhöht gegenüber PE von Kindern ohne HLM. Insgesamt weist dies auf eine durch den Einsatz von HLM getriggerte TH-2 Immunantwort hin. Diese scheint in PE ausgeprägter zu sein als in Blut. Da eine ausgeprägte TH-2 Immunantwort bereits im präoperativen Zustand das Risiko von PE nach kinder-kardi-chirurgischer Operation erhöht (17), könnte der Einsatz der HLM diesen Prozess noch verstärken.

4.6 Limitierungen

4.6.1 Limitierungen in Studiendesign und Patientenauswahl

Die Einschlusskriterien vorliegender Studie umfassten das Vorliegen eines Pleuraergusses (PE) sowie ein Alter zwischen 0 und 18 Jahren. Dies führte zu einer Inhomogenität bezüglich mehrerer Faktoren. Zum einen lag eine große Altersspanne der rekrutierten Patienten von circa 18 Jahren vor. Insbesondere bei Kindern unterliegt das Immunsystem starken Veränderungen (110,188). Dies erschwert die Vergleichbarkeit immunologischer Analysen. Möglicherweise ist die lokale Immunantwort in PE aber weniger altersabhängig als man aufgrund allgemeiner Studien über die Entwicklung des Immunsystems im Kindesalter vermuten könnte. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass im Vergleich von Säuglingen versus Nicht-Säuglingen signifikante Unterschiede bei 9 von 12 Zytokinen im Blut vorlagen, während dies in PE nur in 3 von 12 Zytokinen der Fall war.

Die Geschlechterverteilung in vorliegender Studie war nicht ausgeglichen. Der Anteil männlicher Patienten überlag mit 70 Prozent gegenüber weiblichen Patienten. Geschlechterspezifische Unterschiede im Immunsystem von Mädchen und Jungen sind

bekannt (18). Hingegen konnten in unserer Studie sowohl in Blutproben als auch PE keine geschlechterspezifischen Unterschiede in der Zytokinauswertung nachgewiesen werden.

Trotz der Gemeinsamkeit kardiochirurgischer Operationen bei den rekrutierten Patienten, ist zu beachten, dass eine Heterogenität bezüglich der vorliegenden Herzfehler und Operationen vorlag. Ein wichtiges Unterscheidungskriterium bei kardiochirurgischer Operation ist der Einsatz bzw. Nicht-Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM). Aufgrund bekannter Auswirkungen der HLM auf das Immunsystem (44,70), wurden dessen Auswirkungen auf PE untersucht.

Klinisch relevant ist zudem die diagnostische Abgrenzung des Chylothorax. Dieser stellt eine Sonderform des PE dar. Im Rahmen kinderchirurgischer Operationen kann er durch eine Schädigung des Ductus thoracicus entstehen. Die im Ductus thoracicus transportierte Lymphe akkumuliert infolgedessen in der Pleurahöhle. Chylothoraces werden über ihren hohen Gehalt an Triglyzeriden und die Präsenz von Chylomikronen in PE nachgewiesen (38,60). Auch wenn bei einigen Pleurapunktatproben im Rahmen der Aufarbeitung makroskopisch eine fettartige Schicht zu sehen war, konnte die eindeutige Diagnose eines Chylothorax aufgrund insuffizienter Labordaten bezüglich Chylomikronen und Triglyzeriden in PE nicht getroffen werden. Eine zukünftige gezielte Analyse von Chylothoraces könnte aufschlussreiche Erkenntnisse über das Immunsystem liefern, da sie über die Analyse von Lymphe einen Zugang zu dem sonst schwer erreichbaren Lymphsystem bieten.

4.6.2 Limitierungen der Probenaufarbeitung

Die Menge der gewonnenen Blutprobe wurde an das Körpergewicht der Patienten adaptiert. Bei Kindern mit einem Körpergewicht unter 2 kg wurden Blutproben mit einem Volumen von 0,5 ml entnommen. Die 0,5 ml Blutvolumen genügten für die Durchführung der Immunoassays und des BCA-Assay, jedoch nicht für alle durchflusszytometrischen Analysen, insbesondere hinsichtlich Monozyten, Natürlichen Killerzellen und B-Zellen.

Die Pleurapunktatprobe wurde aus einem Thoraxdrainagesystems entnommen. Nachdem ein Teil des drainierten Pleuraergusses für die klinische Routinediagnostik verwendet wurde, stand das restliche Volumen für vorliegende Arbeit zur Verfügung. Im Gegensatz zu Blutproben, die direkt bspw. über einen ZVK dem systemischen Kreislauf entnommen wurden, gelangten die Pleurapunktatproben zuerst in das Schlauchsystem der Thoraxdrainage und wurden aus diesem entnommen, was potentiell einen zeitverzögernden Zwischenschritt bedeutete. Die Zeitverzögerung hatte jedoch geringe Auswirkungen auf die Viabilität von PEC, welche bei circa 90 Prozent lag. Dies bestätigt auch eine Studie von Conner et al., welche zeigt, dass selbst eine verzögerte Aufarbeitung der Pleurapunktatproben 24 Stunden nach Entnahme im Vergleich zur Aufarbeitung nach 4 Stunden die Probenqualität der PEC nicht beeinflusste (34). Weiterhin war der Zeitpunkt der Probenentnahme inhomogen, da nicht alle Patienten im gleichen zeitlichen Abstand zur kardiochirurgischen Operation einen PE entwickelten. Jedoch

liegt der im Rahmen dieser Arbeit verfolgte Ansatz in der Simultanität der Entnahme von Blut- und Pleurapunktatprobe. Dieses Vorgehen wurde auch von Prelog et al. und Orange et al. gewählt (116,133).

Die Pleurapunktatproben wurden in einer Monovette ohne Antikoagulans gesammelt. Die Wahl der Monovette (mit Antikoagulans versus ohne Antikoagulans) kann einen Einfluss auf die Viabilität von PEC haben, mit einer höheren Viabilität in Monovetten mit Antikoagulans (34). Trotz der Verwendung von Monovetten ohne Antikoagulans hatten die im Rahmen dieser Arbeit analysierte PEC eine hohe Viabilität von circa 90 Prozent, die aber zukünftig durch die Verwendung von Monovetten mit Antikoagulans noch gesteigert werden könnte.

Mehrere Studien beschrieben eine Isolierung von Zellen aus Pleuraergüssen via Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll® (116,133). Dies ist möglich, da exsudative Pleuraergüsse eine ähnliche Dichte wie Blutplasma aufweisen (119,130). Die Dichte mononukleärer Zellen liegt zwischen Ficoll® und Blutplasma bzw. Pleurapunktatüberstand (143). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gesamte Pleurapunktatprobe ohne Verwendung von Ficoll® zentrifugiert. Zur Validierung einer qualitativ hochwertigen Aufarbeitung der Pleurapunktatproben und folglich Etablierung der neuen Methode wurden jeweils Pleurapunktatüberstand und Bodensatz analysiert. Korrespondierend zu Blutplasma sollte der Pleurapunktatüberstand zellfrei, aber proteinhaltig sein. Die Zellzahl der Pleurapunktatüberstände lag konsistent bei 0 und es war in allen Proben Protein nachweisbar. Während die Dichtegradientenzentrifugation der Blutproben mit Ficoll® eine direkte Isolierung mononukleärer Zellen erlaubte, sammelten sich Zellen aus dem Pleurapunktat im Bodensatz. Jedoch enthielt der Bodensatz nicht nur mononukleäre Zellen, sondern auch Granulozyten, Erythrozyten und Debris. In der durchflusszytometrischen Analyse sollten nur mononukleäre Zellen des Pleurapunktats analysiert werden. Deshalb wurden Erythrozyten lysiert und Debris durch wiederholte Waschschrte entfernt. Polynukleäre Zellen, wie Granulozyten, wurden durch entsprechendes Gating aus den durchflusszytometrischen Analysen ausgeschlossen.

4.6.3 Limitierungen immunologischer Analysen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Zell-, Zytokin- und Genexpressionsanalysen angestrebt. Die Auswahl der zu analysierenden Zellen, Zytokine und Gene wurde aufeinander abgestimmt. Jedoch ist zu beachten, dass eine exakte Zuordnung von Zytokin und produzierendem Zelltyp nicht immer möglich ist, da einzelne Zytokine von verschiedenen Zelltypen produziert werden. Beispielsweise kann IL-10 sowohl von TH2 als auch von Treg produziert werden (28). Weiterhin gibt es Zytokine, die nicht von Immunzellen produziert werden. So wird IL-7 von unter anderem mesenchymalen Zellen in Knochenmark und Epithelzellen produziert (31). Zytokinproduzierende Zellen, die nicht den Leukozyten zuzuordnen waren, wurden in vorliegender Arbeit nicht akquiriert.

Für die Zytokinanalysen wurde ein Multiplex-Immunoassay-Kit verwendet, das laut Herstellerangaben nur für Blutproben, aber nicht für Pleurapunktate validiert war. Der Multiplex-Ansatz bietet den Vorteil einer simultanen Bestimmung mehrerer Zytokine in einem kleinen Probenvolumen (139). Dies ist vor allem im pädiatrischen Setting hilfreich, da häufig nur die Abnahme kleiner Probenvolumina möglich ist. Gleichzeitig erschwerte der Multiplex-Ansatz die exakte Quantifizierung verschiedener Zytokine, für die unterschiedliche Verdünnungen notwendig wären. Insbesondere IL-6 befand sich in allen PE oberhalb des quantifizierbaren Bereichs. Aus diesem Grund wurde IL-6 in einem weiteren Experiment in einem Singleplex-Immunoassay mit 4-facher Verdünnung erneut gemessen.

Weiterhin sind bei der Analyse von Zytokinen in Körperflüssigkeiten die unterschiedlichen Halbwertszeiten (HWZ) von Zytokinen zu beachten. Während TNF, IL-4 und IL-8 mit jeweils 18, 20 und 24 Minuten ähnliche HWZ besitzen, unterscheidet sich die Abbaudynamik von IL-6 mit einer HWZ von 15,5 Stunden stark (91). Die verschiedenen Abbaudynamiken erschweren die Auswertung. Diesem Problem wurde durch die simultane Abnahme von Blut- und Pleurapunktatproben begegnet, sodass eine zeitliche Vereinheitlichung durch die gepaarte Auswertung erfolgte.

Zudem muss beachtet werden, dass Zytokine in verschiedenen Körperflüssigkeiten unterschiedliche Normwerte haben. Während IL-6 in Blut und Speichel von gesunden Erwachsenen Normwerte von <30 pg/ml aufweist, ist die IL-6 Konzentration in Tränenflüssigkeit bis zu 10-fach höher (91). Da Pleuraflüssigkeit von Menschen im physiologischen Zustand nicht gewonnen werden kann, ist eine Aussage über Normwerte von Zytokinen in Pleuraflüssigkeit gesunder Menschen unmöglich.

Für die quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurde RNA aus PBMC und PEC isoliert und in cDNA transkribiert. Die sowohl aus PBMC als auch aus PEC gewonnene RNA wies starke Schwankungen in entsprechenden Konzentrations- und Reinheitsmessung auf. Obwohl Konzentration und Reinheit der daraufhin generierten cDNA wiederum in einem methodisch geeigneten Bereich lagen, zeigten sich bei der Auswertung der Daten der durchgeführten qRT-PCR in allen Experimenten für die Auswertung zu niedrige Signalintensitäten. Entsprechende Analysen sollten in zukünftigen Untersuchungen wiederholt werden, um sich ergänzende Daten immunologischer Charakteristika von Pleuraergüssen auf Zell-, Protein-, und Genexpressionsebene zu erhalten.

4.7 Ausblick

Die in vorliegender Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bieten einen ersten grundlegenden Einblick in die Immunologie von Pleuraergüssen pädiatrischer Patienten nach kardiochirurgischer Operation. Um immunologische Prozesse in Pleuraergüssen noch genauer zu verstehen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

So wäre eine Ausweitung untersuchter Leukozytensubpopulationen in Pleuraergüssen anzustreben. Dabei sollte der Fokus auf T-Zell-Subpopulationen intensiviert werden und gleichzeitig die Analysen von B-Zellen, Natürlichen Killerzellen und Monozyten erweitert werden. Außerdem sollten auch Leukozytensubpopulationen wie Neutrophile oder Dendritische Zellen, die bis dato nicht in Pleuraergüssen untersucht wurden, in zukünftige Analysen inkludiert werden. Entsprechend gilt es, die Auswahl an Zytokinen zu erweitern. Zudem sollte eine Durchführung von Genexpressionsanalysen erneut angestrebt werden, um Zuordnungen von Zytokinen und entsprechend produzierender Zellpopulationen treffen zu können. Außerdem könnte eine Analyse von Antikörpern in Pleuraergüssen exaktere Aussagen hinsichtlich der B-Zell-Immunantwort in Pleuraergüssen ermöglichen.

Die simultane Abnahme von Blut- und Pleurapunktatprobe beleuchtet den immunologischen Status in Pleuraergüssen zu einem definierten Zeitpunkt. Temporäre Dynamiken der Immunologie von Pleuraergüssen könnten über eine Abnahme und Analyse von Blut- und Pleurapunktatprobe zu multiplen Zeitpunkten aufgeklärt werden.

Neben der quantitativen Erweiterung des kinderkardiologischen Patientenkollektivs wäre ein Vergleich immunologischer Charakteristika von Pleuraergüssen verschiedener Ätiologien erstrebenswert, um allgemeingültige und spezifische Merkmale verschiedener Arten von Pleuraergüssen differenzieren zu können. Dazu würden sich im pädiatrischen Setting vor allem Pleuraergüsse im Rahmen onkologischer, infektiologischer und kardiologischer Grunderkrankungen eignen.

Im Rahmen exsudativer Pleuraergüsse gelangen immunologische Faktoren wie Leukozyten und Zytokine aus dem systemischen Blutkreislauf in die Pleurahöhle und werden mittels Pleurapunktion und -drainage nach extern geleitet. Ob dieser quantitative Verlust immunologischer Faktoren zu einer qualitativ-funktionellen Einschränkung des Immunsystems führt, ist bisher noch nicht geklärt. Untersuchungen bezüglich erhöhter Infektanfälligkeit im Rahmen von Pleuraergüssen sollten daher zukünftig durchgeführt werden.

Immunmodulatorische Therapien könnten inflammatorische Prozesse in Pleuraergüssen reduzieren und wären gegebenenfalls sogar lokal applizierbar. Hierbei wäre jedoch primär zu klären, ob inflammatorische Prozesse in Pleuraergüssen ausschließlich schädliche oder auch protektive Effekte haben.

5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Light-Kriterien.....	5
Tabelle 2: Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software	16
Tabelle 3: Chemikalien	17
Tabelle 4: Detektionsantikörper für durchflusszytometrische Analysen.....	18
Tabelle 5: Isotyp-Antikörper für durchflusszytometrische Kontrollexperimente	18
Tabelle 6: Beads für Multiplex- und Singleplex-Immunoassays	19
Tabelle 7: Primer für die qRT-PCR	20
Tabelle 8: Volumen der Blutprobe in Abhängigkeit vom Körpergewicht des Patienten	21
Tabelle 9: Aufteilung von PBMC und PEC für die Durchflusszytometrie und qRT-PCR.....	24
Tabelle 10: Pipettierschema Antikörpermixe Durchflusszytometrie.....	24
Tabelle 11: Panels mit Charakteristika der jeweiligen Immunoassays	30
Tabelle 12: Klinische Daten der kinderkardiologischen Patienten.....	34
Tabelle 13: Auflistung der analysierten T-Zell-Populationen und entsprechende Kombinationen von Oberflächenmarkern.....	39
Tabelle 14: Korrelation von T-Zell-Populationen zwischen Blut und Pleurapunktat	43
Tabelle 15: Auflistung der analysierten B-Zell-Populationen und entsprechende Kombinationen von Oberflächenmarkern.....	43
Tabelle 16: Auflistung der analysierten Monozyten-Populationen und entsprechende Kombinationen von Oberflächenmarkern.....	46
Tabelle 17: Auflistung der analysierten Monozyten-Populationen und entsprechende Kombinationen von Oberflächenmarkern.....	48
Tabelle 18: Anzahl der Blut- und Pleurapunktatproben außerhalb des quantifizierbaren Bereichs des jeweiligen Zytokins im Multiplex-Immunoassay.....	49
Tabelle 19: Korrelationsanalyse von Zytokinen zwischen Blut und Pleuraerguss.....	53

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie pleuraler Strukturen.....	1
Abbildung 2: Physiologischer Flüssigkeitsumsatz pleuraler Strukturen	3
Abbildung 3: Pathophysiologie von Transsudaten und Exsudaten	4
Abbildung 4: Entwicklung von Blutzellen.....	7
Abbildung 5: Entwicklung von T-Helferzellen	9
Abbildung 6: Gegenseitige Regulation der Differenzierung von T-Helferzellen	10
Abbildung 7: Dichtegradientenzentrifugation von Blutproben	22
Abbildung 8: Gatingstrategie T-Zell-Populationen.....	25
Abbildung 9: Gatingstrategie B-Zell-Populationen	26
Abbildung 10: Gatingstrategie Monozyten bzw. Natürliche Killerzellen und jeweilige Subpopulationen	27
Abbildung 11: Methode zur Aufarbeitung von PE-Proben	36
Abbildung 12: Darstellung der Viabilität von PBMC und PEC.....	37
Abbildung 13: Proteinkonzentration in Plasma und Pleurapunktatüberstand und Quotient der Proteinkonzentration von Pleurapunktat und Plasma	38
Abbildung 14: Vergleich von T-Zell-Populationen in Blut und Pleuraerguss	41
Abbildung 15: Vergleich von TH- bzw. CTL-Subpopulationen in Blut und Pleuraerguss	42
Abbildung 16: Vergleich von B-Zell-Populationen in Blut und Pleuraerguss.....	45
Abbildung 17: Vergleich von B1- und B2-Zellen inklusive B1- und B2-Gedächtniszellen in Blut und Pleuraerguss	46
Abbildung 18: Vergleich von Monozyten-Populationen in Blut und Pleuraerguss.....	47
Abbildung 19: Anteil von NK-Populationen in Blut und Pleuraerguss	48
Abbildung 20: Quotienten der Zytokinkonzentrationen in Pleuraerguss / Plasma	51
Abbildung 21: Zytokinkonzentrationen in Blut und Pleuraergüssen.....	52
Abbildung 22: Korrelation zwischen Immunzellen und Zytokinen in Blut und Pleuraerguss	54
Abbildung 23: Einordnung von Zytokinen in Blut und Pleuraerguss der onkologischen Patienten in Bezug auf das kardiologische Patientenkollektiv	56
Abbildung 24: Analyse von Zytokinen in Plasma und Pleuraerguss hinsichtlich Unterschieden in klinischen Parametern.....	58

7 Abbildungsquellen

Abbildungsquelle 1 / Abbildung 1:

<https://next.amboss.com/de/article/e60xPS?q=pleurah%C3%B6hle&m=0KaeUl#wlchUd0> ;
Amboss GmbH; zuletzt aktualisiert am 01.01.2025

Abbildungsquelle 2 / Abbildung 2:

Modifiziert nach: Miserocchi G. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* (1997) 10:219–225. doi: 10.1183/09031936.97.10010219

Abbildungsquelle 3 / Abbildung 3:

<https://next.amboss.com/de/article/F50gNg?q=pleuraerguss&m=DVX19C> ;
Amboss GmbH; zuletzt aktualisiert am 01.01.2025

Abbildungsquelle 4 / Abbildung 4:

<https://next.amboss.com/de/search?q=entwicklung+blutzellen&v=overview&m=ulapeN> ;
Amboss GmbH; zuletzt aktualisiert am 01.01.2025

Abbildungsquelle 5 / Abbildung 5:

Modifiziert nach Murphy K, Weaver C. “Die T-Zell-vermittelte Immunität.” In: Murphy K, Weaver C, editors. Janeway Immunologie. Berlin, Heidelberg: Springer (2018). p. 473 doi: 10.1007/978-3-662-56004-4_9

Abbildungsquelle 6 / Abbildung 6:

Modifiziert nach Murphy K, Weaver C. “Die T-Zell-vermittelte Immunität.” In: Murphy K, Weaver C, editors. Janeway Immunologie. Berlin, Heidelberg: Springer (2018). p. 474 doi: 10.1007/978-3-662-56004-4_9

8 Literaturverzeichnis

1. Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787–793. doi: 10.1038/383787a0
2. Akarsu S, Kurt ANC, Dogan Y, Yilmaz E, Godekmerdan A, Aygun AD (2005) The differential diagnostic values of cytokine levels in pleural effusions. *Mediators Inflamm* 2005:2–8. doi: 10.1155/MI.2005.2
3. Akkaya M, Kwak K, Pierce SK (2020) B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat Rev Immunol* 20:229–238. doi: 10.1038/s41577-019-0244-2
4. Alcaraz AJ, Sancho L, Manzano L, Esquivel F, Carrillo A, Prieto A, Bernstein ED, Alvarez-Mon M (2002) Newborn patients exhibit an unusual pattern of interleukin 10 and interferon γ serum levels in response to cardiac surgery. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 123:451–458. doi: 10.1067/mtc.2002.120006
5. Alcaraz AJ, Manzano L, Sancho L, Vigil MD, Esquivel F, Maroto E, Reyes E, Alvarez-Mon M (2005) Different Proinflammatory Cytokine Serum Pattern in Neonate Patients Undergoing Open Heart Surgery. Relevance of IL-8. *J Clin Immunol* 25:238–245. doi: 10.1007/s10875-005-4081-7
6. Allen SJ, Crown SE, Handel TM (2007) Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25:787–820. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090529
7. Antony VB, Godbey SW, Kunkel SL, Hott JW, Hartman DL, Burdick MD, Strieter RM (1993) Recruitment of inflammatory cells to the pleural space. Chemotactic cytokines, IL-8, and monocyte chemotactic peptide-1 in human pleural fluids. *J Immunol* 151:7216–7223.
8. Aringer M, Smolen JS (2008) The role of tumor necrosis factor- α in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 10:202. doi: 10.1186/ar2341
9. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA (2004) Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol* 16:89–98. doi: 10.1016/j.smim.2003.12.005
10. Barata JT, Durum SK, Seddon B (2019) Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease. *Nat Immunol* 20:1584–1593. doi: 10.1038/s41590-019-0479-x
11. Barry M, Bleackley RC (2002) Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2:401–409. doi: 10.1038/nri819
12. Baumgarth N (2011) The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* 11:34–46. doi: 10.1038/nri2901
13. Bénard A, Podolska MJ, Czubyko F, Kutschick I, Klösch B, Jacobsen A, Naschberger E, Brunner M, Krautz C, Trufa DI, et al (2022) Pleural Resident Macrophages and Pleural IRA B Cells Promote Efficient Immunity Against Pneumonia by Inducing Early Pleural Space Inflammation. *Front Immunol* 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.821480
14. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA (1985) Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion. *Am J Pathol* 121:394–403.
15. Bhandoola A, Sambandam A (2006) From stem cell to T cell: one route or many? *Nat Rev Immunol* 6:117–126. doi: 10.1038/nri1778
16. Bocsi J, Hamsch J, Osmancik P, Schneider P, Valet G, Tárnok A (2002) Preoperative prediction of pediatric patients with effusions and edema following cardiopulmonary bypass surgery by serological and routine laboratory data. *Crit Care* 6:226–233. doi: 10.1186/cc1494
17. Bocsi J, Richter M, Hamsch J, Barten MJ, Dähnert I, Schneider P, Tárnok A (2006) Transient Th1/Th2 disbalance indicates postoperative effusions and edema after cardiopulmonary bypass in children. *Cytometry A* 69:165–168. doi: 10.1002/cyto.a.20213
18. Bous M, Schmitt C, Hans MC, Weber R, Nourkami-Tutdibi N, Tenbruck S, Haj Hamoud B, Wagenpfeil G, Kaiser E, Solomayer E-F, et al (2023) Sex Differences in the Frequencies of B and T Cell Subpopulations of Human Cord Blood. *Int J Mol Sci* 24:11511. doi: 10.3390/ijms241411511

19. Boyle EM, Pohlman TH, Cornejo CJ, Verrier ED (1996) Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion. *Ann Thorac Surg* 62:1868–1875. doi: 10.1016/s0003-4975(96)00950-2
20. Boyle EM, Pohlman TH, Johnson MC, Verrier ED (1997) Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 63:277–284. doi: 10.1016/s0003-4975(96)01061-2
21. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG (2005) The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol* 7:122–133. doi: 10.1215/S1152851704001061
22. Brusthöhle - AMBOSS.
<https://next.amboss.com/de/article/e60xPS?q=pleurah%C3%B6hle#wlchUd0> [Accessed January 4, 2025]
23. Buscher K, Marcovecchio P, Hedrick CC, Ley K (2017) Patrolling Mechanics of Non-Classical Monocytes in Vascular Inflammation. *Front Cardiovasc Med* 4: doi: 10.3389/fcvm.2017.00080
24. Busse PJ, Mathur SK (2010) Age-related Changes in Immune Function: Impact on Airway Inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 126:690–701. doi: 10.1016/j.jaci.2010.08.011
25. Butcher MJ, Zhu J (2021) Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. *Fac Rev* 10:30. doi: 10.12703/r/10-30
26. Cailhier JF, Sawatzky DA, Kipari T, Houlberg K, Walbaum D, Watson S, Lang RA, Clay S, Kluth D, Savill J, et al (2006) Resident Pleural Macrophages Are Key Orchestrators of Neutrophil Recruitment in Pleural Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 173:540–547. doi: 10.1164/rccm.200504-538OC
27. Caputo M, Yeatman M, Narayan P, Marchetto G, Ascione R, Reeves BC, Angelini GD (2002) Effect of off-pump coronary surgery with right ventricular assist device on organ function and inflammatory response: a randomized controlled trial. *Ann Thorac Surg* 74:2088–2095; discussion 2095-2096. doi: 10.1016/s0003-4975(02)04025-0
28. Carlini V, Noonan DM, Abdalalem E, Goletti D, Sansone C, Calabrone L, Albini A (2023) The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Front Immunol* 14: doi: 10.3389/fimmu.2023.1161067
29. Casha AR, Caruana-Gauci R, Manche A, Gauci M, Chetcuti S, Bertolaccini L, Scarci M (2017) Pleural pressure theory revisited: a role for capillary equilibrium. *J Thorac Dis* 9:979–989. doi: 10.21037/jtd.2017.03.112
30. Cassioli C, Baldari CT (2022) The Expanding Arsenal of Cytotoxic T Cells. *Front Immunol* 13: doi: 10.3389/fimmu.2022.883010
31. Chen D, Tang T-X, Deng H, Yang X-P, Tang Z-H (2021) Interleukin-7 Biology and Its Effects on Immune Cells: Mediator of Generation, Differentiation, Survival, and Homeostasis. *Front Immunol* 12: doi: 10.3389/fimmu.2021.747324
32. Chopp L, Redmond C, O'Shea JJ, Schwartz DM (2023) From thymus to tissues and tumors: A review of T-cell biology. *J Allergy Clin Immunol* 151:81–97. doi: 10.1016/j.jaci.2022.10.011
33. Collison JL, Carlin LM, Eichmann M, Geissmann F, Peakman M (2015) Heterogeneity in the Locomotory Behavior of Human Monocyte Subsets over Human Vascular Endothelium In Vitro. *J Immunol* 195:1162–1170. doi: 10.4049/jimmunol.1401806
34. Conner BD, Lee YCG, Branca P, Rogers JT, Rodriguez RM, Light RW (2003) Variations in Pleural Fluid WBC Count and Differential Counts With Different Sample Containers and Different Methods. *CHEST* 123:1181–1187. doi: 10.1378/chest.123.4.1181
35. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633–640. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02060-9
36. Corfe SA, Paige CJ (2012) The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation. *Semin Immunol* 24:198–208. doi: 10.1016/j.smim.2012.02.001
37. Cormican S, Griffin MD (2020) Human Monocyte Subset Distinctions and Function: Insights From Gene Expression Analysis. *Front Immunol* 11: doi: 10.3389/fimmu.2020.01070

38. Costa KM, Saxena AK (2018) Surgical chylothorax in neonates: management and outcomes. *World J Pediatr* 14:110–115. doi: 10.1007/s12519-018-0134-x
39. Curtis MM, Way SS (2009) Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126:177–185. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03017.x
40. Daëron M (2022) The immune system as a system of relations. *Front Immunol* 13:984678. doi: 10.3389/fimmu.2022.984678
41. Dash SP, Gupta S, Sarangi PP (2024) Monocytes and macrophages: Origin, homing, differentiation, and functionality during inflammation. *Heliyon* 10:e29686. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e29686
42. Dauba A, Näser E, Andrieux D, Cogné M, Denizot Y, Khamlichi AA (2024) The immunoglobulin heavy chain super enhancer controls class switch recombination in developing B cells. *Sci Rep* 14:7370. doi: 10.1038/s41598-024-57576-z
43. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR (2013) Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14:986–995. doi: 10.1038/ni.2705
44. Dieterlen M-T, Bittner HB, Tarnok A, Garbade J, Dhein S, Mohr FW, Barten MJ (2014) Flow cytometric evaluation of T cell activation markers after cardiopulmonary bypass. *Surg Res Pract* 2014:801643. doi: 10.1155/2014/801643
45. Dong C (2021) Defining the TH17 cell lineage. *Nat Rev Immunol* 21:618–618. doi: 10.1038/s41577-021-00596-x
46. Dunn SE, Perry WA, Klein SL (2024) Mechanisms and consequences of sex differences in immune responses. *Nat Rev Nephrol* 20:37–55. doi: 10.1038/s41581-023-00787-w
47. Elenkov IJ (2004) Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci* 1024:138–146. doi: 10.1196/annals.1321.010
48. Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, Kunz-Schughart L, Schmidt CA, Andreesen R, Mackensen A (2005) Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* 105:2828–2835. doi: 10.1182/blood-2004-07-2583
49. Franke A, Lante W, Fackeldey V, Becker HP, Thode C, Kuhlmann WD, Markewitz A (2002) Proinflammatory and antiinflammatory cytokines after cardiac operation: different cellular sources at different times. *The Annals of Thoracic Surgery* 74:363–370. doi: 10.1016/S0003-4975(02)03658-5
50. Fujino S, Yokoyama A, Kohno N, Hiwada K (1996) Interleukin 6 is an autocrine growth factor for normal human pleural mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14:508–515. doi: 10.1165/ajrcmb.14.6.8652179
51. Gao Y, Ou Q, Wu J, Zhang B, Shen L, Chen S, Weng X, Zhang Y, Zhang W, Shao L (2016) Potential diagnostic value of serum/pleural fluid IL-31 levels for tuberculous pleural effusion. *Sci Rep* 6:20607. doi: 10.1038/srep20607
52. Georgountzou A, Papadopoulos NG (2017) Postnatal Innate Immune Development: From Birth to Adulthood. *Front Immunol* 8: doi: 10.3389/fimmu.2017.00957
53. Grailer JJ, Kodera M, Steeber DA (2009) L-selectin: Role in Regulating Homeostasis and Cutaneous Inflammation. *J Dermatol Sci* 56:141–147. doi: 10.1016/j.jdermsci.2009.10.001
54. Grover P, Goel PN, Greene MI (2021) Regulatory T Cells: Regulation of Identity and Function. *Front Immunol* 12:750542. doi: 10.3389/fimmu.2021.750542
55. Guilliams M, Mildner A, Yona S (2018) Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* 49:595–613. doi: 10.1016/j.immuni.2018.10.005
56. Harbour SN, DiToro DF, Witte SJ, Zindl CL, Gao M, Schoeb TR, Jones GW, Jones SA, Hatton RD, Weaver CT (2020) Th17 Cells Require Ongoing Classic IL-6 Receptor Signaling to Retain Transcriptional and Functional Identity. *Sci Immunol* 5:eaaw2262. doi: 10.1126/sciimmunol.aaw2262
57. Hardy RR, Hayakawa K (2001) B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 19:595–621. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.595
58. Hausmann MJ, Rogachev B, Weiler M, Chaimovitz C, Douvdevani A (2000) Accessory role of human peritoneal mesothelial cells in antigen presentation and T-cell growth. *Kidney Int* 57:476–486. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00867.x

59. Helm PC, Koerten M-A, Abdul-Khaliq H, Baumgartner H, Kececiloglu D, Bauer UMM (2016) Representativeness of the German National Register for Congenital Heart Defects: a clinically oriented analysis. *Cardiol Young* 26:921–926. doi: 10.1017/S1047951115001547
60. Hermon M, Tenner E, Burda G, Strohmaier W, Schlager G, Golej J (2019) Chylothorax and Chylous-Like Diseases in Children: Clinical Management. *Frontiers in Pediatrics* 7: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2019.00258> [Accessed March 29, 2023]
61. Hooper C, Lee YCG, Maskell N, on behalf of the BTS Pleural Guideline Group (2010) Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax* 65:ii4–ii17. doi: 10.1136/thx.2010.136978
62. Huang Z-Y, Shao M-M, Zhang J-C, Yi F-S, Du J, Zhou Q, Wu F-Y, Li S, Li W, Huang X-Z, et al (2021) Single-cell analysis of diverse immune phenotypes in malignant pleural effusion. *Nat Commun* 12:6690. doi: 10.1038/s41467-021-27026-9
63. Hughes A, Carter K, Cyrus J, Karam O (2020) Pleural Effusions After Congenital Cardiac Surgery Requiring Readmission: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr Cardiol* 41:1145–1152. doi: 10.1007/s00246-020-02365-4
64. Hughes CE, Nibbs RJB (2018) A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J* 285:2944–2971. doi: 10.1111/febs.14466
65. Huo Y, Chu Y, Guo L, Liu L, Xia X, Wang T (2017) Cortisol is associated with low frequency of interleukin 10-producing B cells in patients with atherosclerosis. *Cell Biochem Funct* 35:178–183. doi: 10.1002/cbf.3262
66. Inoue T, Kurosaki T. Memory B cells (2024) *Nat Rev Immunol* 24:5–17. doi: 10.1038/s41577-023-00897-3
67. Ivetic A, Hoskins Green HL, Hart SJ (2019) L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. *Front Immunol* 10:1068. doi: 10.3389/fimmu.2019.01068
68. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM (2017) Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol* 17:349–362. doi: 10.1038/nri.2017.28
69. Jany B, Welte T (2019) Pleuraerguss des Erwachsenen – Ursachen, Diagnostik und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* 12.
70. Justus G, Walker C, Rosenthal L-M, Berger F, Miera O, Schmitt KRL (2019) Immunodepression after CPB: Cytokine dynamics and clinics after pediatric cardiac surgery – A prospective trial. *Cytokine* 122:154018. doi: 10.1016/j.cyto.2017.03.017
71. Kalomenidis I, Stathopoulos GT, Barnette R, Guo Y, Peebles RS, Blackwell TS, Light RW (2005) Eotaxin-3 and Interleukin-5 Pleural Fluid Levels Are Associated With Pleural Fluid Eosinophilia in Post-Coronary Artery Bypass Grafting Pleural Effusions. *CHEST* 127:2094–2100. doi: 10.1378/chest.127.6.2094
72. Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, Yoshimura A (2016) Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol* 37:803–811. doi: 10.1016/j.it.2016.08.012
73. Kansy A, Tobota Z, Maruszewski P, Maruszewski B (2010) Analysis of 14,843 Neonatal Congenital Heart Surgical Procedures in the European Association for Cardiothoracic Surgery Congenital Database. *The Annals of Thoracic Surgery* 89:1255–1259. doi: 10.1016/j.athoracsur.2010.01.003
74. Kim K-W, Williams JW, Wang Y-T, Ivanov S, Gilfillan S, Colonna M, Virgin HW, Gautier EL, Randolph GJ (2016) MHC II+ resident peritoneal and pleural macrophages rely on IRF4 for development from circulating monocytes. *J Exp Med* 213:1951–1959. doi: 10.1084/jem.20160486
75. Klein SL, Flanagan KL (2016) Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol* 16:626–638. doi: 10.1038/nri.2016.90
76. Knochelmann HM, Dwyer CJ, Bailey SR, Amaya SM, Elston DM, Mazza-McCrann JM, Paulos CM (2018) When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. *Cell Mol Immunol* 15:458–469. doi: 10.1038/s41423-018-0004-4
77. Koenig MN, Naik E, Rohrbeck L, Herold MJ, Trounson E, Bouillet P, Thomas T, Voss AK, Strasser A, Coultas L (2014) Pro-apoptotic BIM is an essential initiator of physiological endothelial cell death independent of regulation by FOXO3. *Cell Death Differ* 21:1687–1695. doi: 10.1038/cdd.2014.90

78. Kokubo K, Onodera A, Kiuchi M, Tsuji K, Hirahara K, Nakayama T (2022) Conventional and pathogenic Th2 cells in inflammation, tissue repair, and fibrosis. *Front Immunol* 13: doi: 10.3389/fimmu.2022.945063
79. Kovacikova L, Lakomy M, Skrak P, Cingelova D (2007) Immunologic status in pediatric cardiosurgical patients with chylothorax. *Bratislavské lekárske listy* 108:3–6.
80. Labidi M, Baillot R, Dionne B, Lacasse Y, Maltais F, Boulet L-P (2009) Pleural effusions following cardiac surgery: prevalence, risk factors, and clinical features. *Chest* 136:1604–1611. doi: 10.1378/chest.09-0689
81. Lai-Fook SJ (2004) Pleural Mechanics and Fluid Exchange. *Physiological Reviews* 84:385–410. doi: 10.1152/physrev.00026.2003
82. LeBien TW, Tedder TF (2008) B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112:1570–1580. doi: 10.1182/blood-2008-02-078071
83. León B (2022) Understanding the development of Th2 cell-driven allergic airway disease in early life. *Front Allergy* 3:1080153. doi: 10.3389/falgy.2022.1080153
84. Leung S, Liu X, Fang L, Chen X, Guo T, Zhang J (2010) The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol Immunol* 7:182–189. doi: 10.1038/cmi.2010.22
85. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK (2003) IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 170:3369–3376. doi: 10.4049/jimmunol.170.6.3369
86. Li D, Ma Y, Miao Y, Liu S, Bi Y, Ji Y, Wu Q, Zhou C, Ma Y (2024) Peritoneal B1 and B2 cells respond differently to LPS and IL-21 stimulation. *Mol Immunol* 170:46–56. doi: 10.1016/j.molimm.2024.04.007
87. Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC (1972) Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 77:507–513. doi: 10.7326/0003-4819-77-4-507
88. Light RW (1997) Diagnostic principles in pleural disease. *European Respiratory Journal* 10:476–481.
89. Lin J, Tang W, Liu W, Yu F, Wu Y, Fang X, Zhou M, Hao W, Hu W (2020) Decreased B1 and B2 Lymphocytes Are Associated With Mortality in Elderly Patients With Chronic Kidney Diseases. *Front Med (Lausanne)* 7:75. doi: 10.3389/fmed.2020.00075
90. Lindinger A, Schwedler G, Hense H-W (2010) Prevalence of congenital heart defects in newborns in Germany: Results of the first registration year of the PAN Study (July 2006 to June 2007). *Klin Padiatr* 222:321–326. doi: 10.1055/s-0030-1254155
91. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G (2021) Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Advanced Science* 8:2004433. doi: 10.1002/adv.202004433
92. Luo Q, Zhao W, Su Z, Liu Y, Jia Y, Zhang L, Wang H, Li Y, Wu X, Li S, et al (2019) Risk Factors for Prolonged Pleural Effusion Following Total Cavopulmonary Connection Surgery: 9 Years' Experience at Fuwai Hospital. *Front Pediatr* 7:456. doi: 10.3389/fped.2019.00456
93. Mace EM (2023) Human natural killer cells: Form, function, and development. *J Allergy Clin Immunol* 151:371–385. doi: 10.1016/j.jaci.2022.09.022
94. Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W (1993) Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med.* 1;177(5):1277-86. doi: 10.1084/jem.177.5.1277. PMID: 8386742; PMCID: PMC2190994.
95. Marcos-Ramiro B, García-Weber D, Millán J (2017) TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond actin and Rho. *Thrombosis and Haemostasis* 112:1088–1102. doi: 10.1160/th14-04-0299
96. Mass E, Nimmerjahn F, Kierdorf K, Schlitzer A (2023) Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. *Nat Rev Immunol* 23:563–579. doi: 10.1038/s41577-023-00848-y
97. Matata BM, Sosnowski AW, Galiñanes M (2000) Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation. *Ann Thorac Surg* 69:785–791. doi: 10.1016/s0003-4975(99)01420-4

98. Matsushima K, Yang D, Oppenheim JJ (2022) Interleukin-8: An evolving chemokine. *Cytokine* 153:155828. doi: 10.1016/j.cyto.2022.155828
99. McComb S, Thiriot A, Akache B, Krishnan L, Stark F (2019) Introduction to the Immune System. *Methods Mol Biol* 2024:1–24. doi: 10.1007/978-1-4939-9597-4_1
100. McGrath EE, Blades Z, Anderson PB (2010) Chylothorax: aetiology, diagnosis and therapeutic options. *Respir Med* 104:1–8. doi: 10.1016/j.rmed.2009.08.010
101. Md T, B N, T H, Dj P (2014) Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et biophysica acta* 1843: doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014
102. Mercer RM, Corcoran JP, Porcel JM, Rahman NM, Psallidas I (2019) Interpreting pleural fluid results. *Clin Med (Lond)* 19:213–217. doi: 10.7861/clinmedicine.19-3-213
103. Miserocchi G, Pistolesi M, Miniati M, Bellina CR, Negrini D, Giuntini C (1984) Pleural liquid pressure gradients and intrapleural distribution of injected bolus. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 56:526–532. doi: 10.1152/jappl.1984.56.2.526
104. Miserocchi G, Negrini D, Pistolesi M, Bellina CR, Gilardi MC, Bettinardi V, Rossitto F (1988) Intrapleural liquid flow down a gravity-dependent hydraulic pressure gradient. *Journal of Applied Physiology* 64:577–584. doi: 10.1152/jappl.1988.64.2.577
105. Miserocchi G (1997) Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* 10:219–225. doi: 10.1183/09031936.97.10010219
106. Miserocchi G (2009) Mechanisms controlling the volume of pleural fluid and extravascular lung water. *European Respiratory Review* 18:244–252. doi: 10.1183/09059180.00002709
107. Mohammadzadeh Lari S, Akbari A, Roustai Geraylow K, Zarifkia S, Hokmabadi F, Javidarabshahi Z, Nouri Daloe M, Hadizadeh Talasaz Z, Rafatpanah H, Akhlaghi S, et al (2022) Comparative Study of Vascular Endothelial Growth Factor in Exudative and Transudative Pleural Effusion. *Tanaffos* 21:384–390.
108. Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K (2012) B-1 B Cell Development in the Fetus and Adult. *Immunity* 36:13–21. doi: 10.1016/j.immuni.2011.11.017
109. Montecino-Rodriguez E, Fice M, Casero D, Berent-Maoz B, Barber CL, Dorshkind K (2016) Distinct Genetic Networks Orchestrate the Emergence of Specific Waves of Fetal and Adult B-1 and B-2 Development. *Immunity* 45:527–539. doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.012
110. Moraes-Pinto MI de, Suano-Souza F, Aranda CS (2020) Immune system: development and acquisition of immunological competence. *J Pediatr (Rio J)* 97:S59–S66. doi: 10.1016/j.jped.2020.10.006
111. Negrini D, Moriondo A (2013) Pleural function and lymphatics. *Acta Physiologica* 207:244–259. doi: 10.1111/apha.12016
112. Nguyen M, Stiel L, Guilloteau A, Bahr P-A, Masson D, Thomas C, Blot M, Guy J, Fontaine C, Durand B, et al (2022) Leukocyte cell population data in patients with cardiac surgery and cardiopulmonary bypass: A potential readily available tool to monitor immunity. *Front Immunol* 13:1101937. doi: 10.3389/fimmu.2022.1101937
113. Noppen M, De Waele M, Li R, Gucht KV, D'Haese J, Gerlo E, Vincken W (2000) Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1023–1026. doi: 10.1164/ajrccm.162.3.9910050
114. Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH, Entman ML (2000) A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H1049–1055. doi: 10.1152/ajpheart.2000.278.4.H1049
115. Odeh M, Sabo E, Srujo I, Oliven A (2000) Tumour necrosis factor alpha in the diagnostic assessment of pleural effusion. *QJM: An International Journal of Medicine* 93:819–824. doi: 10.1093/qjmed/93.12.819
116. Orange JS, Geha RS, Bonilla FA (2003) Acute chylothorax in children: selective retention of memory T cells and natural killer cells. *The Journal of Pediatrics* 143:243–249. doi: 10.1067/S0022-3476(03)00305-6

117. Oriss TB, McCarthy SA, Morel BF, Campana MA, Morel PA (1997) Crossregulation between T helper cell (Th)1 and Th2: inhibition of Th2 proliferation by IFN-gamma involves interference with IL-1. *J Immunol* 158(8):3666-72. PMID: 9103429.
118. Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner DA, Asano T, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S (2002) Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Interleukin-8 Production via NF- κ B and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathways Inhibits Cell Apoptosis in Human Hepatocytes. *Infect Immun* 70:6294–6301. doi: 10.1128/IAI.70.11.6294-6301.2002
119. Ostadfar A (2016) "Chapter 1 - Fluid Mechanics and Biofluids Principles.," In: Ostadfar A, editor. *Biofluid Mechanics*. Academic Press p. 1–60 doi: 10.1016/B978-0-12-802408-9.00001-6
120. Paluskievicz CM, Cao X, Abdi R, Zheng P, Liu Y, Bromberg JS (2019) T Regulatory Cells and Priming the Suppressive Tumor Microenvironment. *Front Immunol* 10:2453. doi: 10.3389/fimmu.2019.02453
121. Parrish YK, Baez I, Milford T-A, Benitez A, Galloway N, Rogerio JW, Sahakian E, Kagoda M, Huang G, Hao Q-L, et al (2009) IL-7 Dependence in Human B Lymphopoiesis Increases During Progression of Ontogeny from Cord Blood to Bone Marrow. *J Immunol* 182:4255–4266. doi: 10.4049/jimmunol.0800489
122. Paunel-Görgülü A, Wacker M, El Aita M, Hassan S, Schlachtenberger G, Deppe A, Choi Y-H, Kuhn E, Mehler TO, Wahlers T (2017) cfDNA correlates with endothelial damage after cardiac surgery with prolonged cardiopulmonary bypass and amplifies NETosis in an intracellular TLR9-independent manner. *Sci Rep* 7:17421. doi: 10.1038/s41598-017-17561-1
123. Paust HJ, Turner JE, Riedel JH, Disteldorf E, Peters A, Schmidt T, Krebs C, Velden J, Mittrücker HW, Steinmetz OM, Stahl RA, Panzer U (2012) Chemokines play a critical role in the cross-regulation of Th1 and Th17 immune responses in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 82(1):72-83. doi: 10.1038/ki.2012.101. Epub 2012 Apr 11. PMID: 22495297.
124. Peluso I, Pallone F, Monteleone G (2006) Interleukin-12 and Th1 immune response in Crohn's disease: Pathogenetic relevance and therapeutic implication. *World J Gastroenterol* 12:5606–5610. doi: 10.3748/wjg.v12.i35.5606
125. Petagna L, Antonelli A, Ganini C, Bellato V, Campanelli M, Divizia A, Efrati C, Franceschilli M, Guida AM, Ingallinella S, et al (2020) Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence. *Biol Direct* 15:23. doi: 10.1186/s13062-020-00280-5
126. Pfefferle A, Jacobs B, Haroun-Izquierdo A, Kveberg L, Sohlberg E, Malmberg K-J (2020) Deciphering Natural Killer Cell Homeostasis. *Front Immunol* 11: doi: 10.3389/fimmu.2020.00812
127. Physiology of breathlessness associated with pleural effusions - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25978627/> [Accessed January 4, 2025]
129. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H (2013) B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 131:959–971. doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.046
130. Pleuraerguss - AMBOSS. <https://next.amboss.com/de/article/F50gNg?q=pleurapunktion#AAaRmM> [Accessed January 7, 2025]
131. Pober JS (2002) Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res* 4:S109–S116. doi: 10.1186/ar576
132. Porcel JM, Light RW (2021) Pleural Fluid Analysis: Are Light's Criteria Still Relevant After Half a Century? *Clinics in Chest Medicine* 42:599–609. doi: 10.1016/j.ccm.2021.07.003
133. Prelog M, Kipp S, Kern H, Neu N (2009) Accumulation of CD8+CD45RA+CD62L+ T Cells in Acute Chylothorax in Neonates. *NEO* 95:86–90. doi: 10.1159/000151760
134. Protein, gesamt im Serum (Plasma) - Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik - eMedpedia | springermedizin.de. https://www.springermedizin.de/emedpedia/detail/lexikon-der-medizinischen-laboratoriumsdiagnostik/protein-gesamt-im-serum-plasma?epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-49054-9_2561 [Accessed January 6, 2025]

135. Qazi BS, Tang K, Qazi A (2011) Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated inflammation and angiogenesis. *Int J Inflam* 2011:908468. doi: 10.4061/2011/908468
136. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I (2021) Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 124:359–367. doi: 10.1038/s41416-020-01048-4
137. Rastogi S, Rizwani W, Joshi B, Kunigal S, Chellappan SP (2012) TNF- α response of vascular endothelial and vascular smooth muscle cells involve differential utilization of ASK1 kinase and p73. *Cell Death Differ* 19:274–283. doi: 10.1038/cdd.2011.93
138. Rennekampff HO, Hansbrough JF, Kiessig V, Doré C, Sticherling M, Schröder JM (2000) Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J Surg Res* 93:41–54. doi: 10.1006/jsre.2000.5892
139. Reslova N, Michna V, Kasny M, Mikel P, Kralik P (2017) xMAP Technology: Applications in Detection of Pathogens. *Front Microbiol* 8:55. doi: 10.3389/fmicb.2017.00055
140. Ribot JC, Lopes N, Silva-Santos B (2021) $\gamma\delta$ T cells in tissue physiology and surveillance. *Nat Rev Immunol* 21:221–232. doi: 10.1038/s41577-020-00452-4
141. Rinder CS, Mathew JP, Rinder HM, Tracey JB, Davis E, Smith BR (1997) Lymphocyte and monocyte subset changes during cardiopulmonary bypass: effects of aging and gender. *J Lab Clin Med* 129:592–602. doi: 10.1016/s0022-2143(97)90193-1
142. Roberts AW, Lee BL, Deguine J, John S, Shlomchik MJ, Barton GM (2017) Tissue-Resident Macrophages Are Locally Programmed for Silent Clearance of Apoptotic Cells. *Immunity* 47:913–927.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.006
143. Rosado M, Silva R, G. Bexiga M, G. Jones J, Manadas B, Anjo SI (2019) “Chapter Four - Advances in biomarker detection: Alternative approaches for blood-based biomarker detection.” In: Makowski GS, editor. *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier p. 141–199 doi: 10.1016/bs.acc.2019.04.003
144. Said EA, Al-Reesi I, Al-Shizawi N, Jaju S, Al-Balushi MS, Koh CY, Al-Jabri AA, Jeyaseelan L (2021) Defining IL-6 levels in healthy individuals: A meta-analysis. *J Med Virol* 93:3915–3924. doi: 10.1002/jmv.26654
145. Sammiceli S, Ruffin N, Lantto R, Vivar N, Chiodi F, Rethi B (2012) IL-7 modulates B cells survival and activation by inducing BAFF and CD70 expression in T cells. *J Autoimmun* 38:304–314. doi: 10.1016/j.jaut.2012.01.012
146. Schild HH, Strassburg CP, Welz A, Kalff J (2013) Treatment options in patients with chylothorax. *Dtsch Arztebl Int* 110(48):819–26. doi: 10.3238/arztebl.2013.0819. PMID: 24333368; PMCID: PMC3865492.
147. Schindler TI, Wagner J-J, Goedicke-Fritz S, Rogosch T, Coccejus V, Laudénbach V, Nikolaizik W, Härtel C, Maier RF, Kerzel S, et al (2017) TH17 Cell Frequency in Peripheral Blood Is Elevated in Overweight Children without Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol* 8:1543. doi: 10.3389/fimmu.2017.01543
148. Schirren M, Sponholz S, Schirren J (2018) Therapie des Chylothorax. *Chirurg* 89:563–574. doi: 10.1007/s00104-018-0659-5
149. Schnell A, Littman DR, Kuchroo VK (2023) TH17 cell heterogeneity and its role in tissue inflammation. *Nat Immunol* 24:19–29. doi: 10.1038/s41590-022-01387-9
150. Seghaye M-C (2003) The clinical implications of the systemic inflammatory reaction related to cardiac operations in children. *Cardiol Young* 13:228–239. doi: 10.1017/S1047951103000465
151. Segura RM (2004) Useful clinical biological markers in diagnosis of pleural effusions in children. *Paediatric Respiratory Reviews* 5:S205–S212. doi: 10.1016/S1526-0542(04)90039-5
152. Shaw TJ, Zhang XY, Huo Z, Robertson D, Lovell PA, Dalgleish AG, Barton DPJ (2016) Human Peritoneal Mesothelial Cells Display Phagocytic and Antigen-Presenting Functions to Contribute to Intraperitoneal Immunity. *Int J Gynecol Cancer* 26:833–838. doi: 10.1097/IGC.0000000000000697
153. Skaria T, Burgener J, Bachli E, Schoedon G (2016) IL-4 Causes Hyperpermeability of Vascular Endothelial Cells through Wnt5A Signaling. *PLoS One* 11:e0156002. doi: 10.1371/journal.pone.0156002

154. Song X, Guo L, Zhang Q, Chen W, Fan W, Lv C, Tang P, Dong Z, Ye X, Ding Q (2023) The diagnostic value of interleukin-36 cytokines in pleural effusions of varying etiologies. *Clin Chim Acta* 549:117533. doi: 10.1016/j.cca.2023.117533
155. Souza RF, Caetano MAF, Magalhães HIR, Castelucci P (2023) Study of tumor necrosis factor receptor in the inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 29:2733–2746. doi: 10.3748/wjg.v29.i18.2733
156. Stavnezer J, Guikema JEJ, Schrader CE (2008) Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annu Rev Immunol* 26:261–292. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248
157. Stenken JA, Poschenrieder AJ (2015) Bioanalytical Chemistry of Cytokines-A Review. *Anal Chim Acta* 853:95–115. doi: 10.1016/j.aca.2014.10.009
158. Sundaralingam A, Bedawi EO, Rahman NM (2020) Diagnostics in Pleural Disease. *Diagnostics (Basel)* 10:1046. doi: 10.3390/diagnostics10121046
159. Syeda MZ, Hong T, Huang C, Huang W, Mu Q (2024) B cell memory: from generation to reactivation: a multipronged defense wall against pathogens. *Cell Death Discov* 10:1–16. doi: 10.1038/s41420-024-01889-5
160. Takahama Y (2006) Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6:127–135. doi: 10.1038/nri1781
161. Tárnok A, Bocsi J, Pipek M, Osmancik P, Valet G, Schneider P, Hamsch J (2001) Preoperative prediction of postoperative edema and effusion in pediatric cardiac surgery by altered antigen expression patterns on granulocytes and monocytes. *Cytometry* 46:247–253. doi: 10.1002/cyto.1135
162. Trotter A, Mück K, Grill H-J, Schirmer U, Hannekum A, Lang D (2001) Gender-related plasma levels of progesterone, interleukin-8 and interleukin-10 during and after cardiopulmonary bypass in infants and children. *Crit Care* 5:343–348.
163. Troussard X, Vol S, Cornet E, Bardet V, Couaillac J-P, Fossat C, Luce J-C, Maldonado E, Siguret V, Tichet J, et al (2014) Full blood count normal reference values for adults in France. *J Clin Pathol* 67:341–344. doi: 10.1136/jclinpath-2013-201687
164. Ullrich KA-M, Schulze LL, Paap E-M, Müller TM, Neurath MF, Zundler S (2020) Immunology of IL-12: An update on functional activities and implications for disease. *EXCLI J* 19:1563–1589. doi: 10.17179/excli2020-3104
165. Valle MT, Degl'Innocenti ML, Bertelli R, Facchetti P, Perfumo F, Fenoglio D, Kunkl A, Gusmano R, Manca F (1995) Antigen-presenting function of human peritoneum mesothelial cells. *Clin Exp Immunol* 101:172–176. doi: 10.1111/j.1365-2249.1995.tb02294.x
166. Vantourout P, Hayday A (2013) Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* 13:88–100. doi: 10.1038/nri3384
167. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ (2008) How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523–532. doi: 10.1038/nri2343
168. Vives M, Porcel JM, Vicente de Vera M, Ribelles E, Rubio M (1996) A study of Light's criteria and possible modifications for distinguishing exudative from transudative pleural effusions. *Chest* 109:1503–1507. doi: 10.1378/chest.109.6.1503
169. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331:44–49. doi: 10.1126/science.1198687
170. Wagner BJ, Lindau D, Ripper D, Stierhof Y-D, Glatzle J, Witte M, Beck H, Keppeler H, Lauber K, Rammensee H-G, et al (2011) Phagocytosis of dying tumor cells by human peritoneal mesothelial cells. *J Cell Sci* 124:1644–1654. doi: 10.1242/jcs.078907
171. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ (2020) A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* 20:651–668. doi: 10.1038/s41577-020-0306-5
172. Walker S, Maskell N (2017) Identification and management of pleural effusions of multiple aetiologies. *Curr Opin Pulm Med* 23:339–345. doi: 10.1097/MCP.0000000000000388
173. Walker JA, McKenzie ANJ (2018) TH2 cell development and function. *Nat Rev Immunol* 18:121–133. doi: 10.1038/nri.2017.118

174. Wan YY, Flavell RA (2009) How Diverse—CD4 Effector T Cells and their Functions. *J Mol Cell Biol* 1:20–36. doi: 10.1093/jmcb/mjp001
175. Wang NS. The preformed stomas connecting the pleural cavity and the lymphatics in the parietal pleura (1975) *Am Rev Respir Dis* 111:12–20. doi: 10.1164/arrd.1975.111.1.12
176. Weltman JK, Karim AS (2000) IL-5: biology and potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs* 9:491–496. doi: 10.1517/13543784.9.3.491
177. Weyand CM, Goronzy JJ (2016) Aging of the Immune System. Mechanisms and Therapeutic Targets. *Ann Am Thorac Soc* 13:S422–S428. doi: 10.1513/AnnalsATS.201602-095AW
178. Wilson A, Trumpp A (2006) Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6:93–106. doi: 10.1038/nri1779
179. Winer H, Rodrigues GOL, Hixon JA, Aiello FB, Hsu TC, Wachter BT, Li W, Durum SK (2022) IL-7: Comprehensive review. *Cytokine* 160:156049. doi: 10.1016/j.cyto.2022.156049
180. Wolf NK, Kissiov DU, Raulet DH (2023) Roles of natural killer cells in immunity to cancer, and applications to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 23:90–105. doi: 10.1038/s41577-022-00732-1
181. Wolff B, Burns AR, Middleton J, Rot A (1998) Endothelial Cell “Memory” of Inflammatory Stimulation: Human Venular Endothelial Cells Store Interleukin 8 in Weibel-Palade Bodies. *Journal of Experimental Medicine* 188:1757–1762. doi: 10.1084/jem.188.9.1757
182. Wu S-Y, Fu T, Jiang Y-Z, Shao Z-M (2020) Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer* 19:120. doi: 10.1186/s12943-020-01238-x
183. Wu Y, Hirschi KK (2021) Tissue-Resident Macrophage Development and Function. *Front Cell Dev Biol* 8:617879. doi: 10.3389/fcell.2020.617879. PMID: 33490082; PMCID: PMC7820365.
184. Wu Z, Zheng Y, Sheng J, Han Y, Yang Y, Pan H, Yao J (2022) CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Front Immunol* 13: doi: 10.3389/fimmu.2022.816005
185. Yang C-Y, Kuo Y-H, Chen M, Wang C-L, Shih L-J, Liu Y-C, Hsueh P-C, Lai Y-H, Chu C-M, Wu C-C, et al (2021) Pleural cytokines MIF and MIP-3 α as novel biomarkers for complicated parapneumonic effusions and empyema. *Sci Rep* 11:1763. doi: 10.1038/s41598-021-81053-6
186. Yatim KM, Lakkis FG (2015) A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol* 10:1274–1281. doi: 10.2215/CJN.10031014
187. Ye Z-J, Zhou Q, Gu Y-Y, Qin S-M, Ma W-L, Xin J-B, Tao X-N, Shi H-Z (2010) Generation and differentiation of IL-17-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion. *J Immunol* 185:6348–6354. doi: 10.4049/jimmunol.1001728
188. Ygberg S, Nilsson A (2012) The developing immune system - from foetus to toddler. *Acta Paediatr* 101:120–127. doi: 10.1111/j.1651-2227.2011.02494.x
189. Yoshida H, Magi M, Tamai H, Kikuchi J, Yoshimoto K, Otomo K, Matsumoto Y, Noguchi-Sasaki M, Takeuchi T, Kaneko Y (2024) Effects of interleukin-6 signal inhibition on Treg subpopulations and association of Tregs with clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 63:2515–2524. doi: 10.1093/rheumatology/keae196
190. Zemlin M, Berger A, Franz A, Gille C, Härtel C, Küster H, Müller A, Pohlandt F, Simon A, Merz W (2018) Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen. Leitlinie der GNPI, DGPI, DGKJ und DGGG. (S2k-Level, AWMF-Leitlinien-Register-Nr. 024/008, April 2018). *Z Geburtshilfe Neonatol.* 2019 Jun;223(3):130-144. German. doi: 10.1055/a-0756-7338. Epub 2019 Jun 14. PMID: 31200398.
191. Zeng Y, Wang L, Zhou H, Qi Y (2022) A meta-analysis of Th1 and Th2 cytokine profiles differentiating tuberculous from malignant pleural effusion. *Sci Rep* 12:2743. doi: 10.1038/s41598-022-06685-8
192. Zenhausern R, Day AS, Safavinia B, Han S, Rudy PE, Won Y-W, Yoon J-Y (2022) Natural killer cell detection, quantification, and subpopulation identification on paper microfluidic cell chromatography using smartphone-based machine learning classification. *Biosens Bioelectron* 200:113916. doi: 10.1016/j.bios.2021.113916

193. Zhang J, Huang S, Zhu Z, Gatt A, Liu J (2024) E-selectin in vascular pathophysiology. *Front Immunol* 15: doi: 10.3389/fimmu.2024.1401399
194. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ, et al (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116:e74-80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558
195. Zocchi L (2002) Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *European Respiratory Journal* 20:1545–1558. doi: 10.1183/09031936.02.00062102
196. Zola H, Swart B, Banham A, Barry S, Beare A, Bensussan A, Boumsell L, D. Buckley C, Bühring H-J, Clark G, et al (2007) CD molecules 2006 — Human cell differentiation molecules. *Journal of Immunological Methods* 319:1–5. doi: 10.1016/j.jim.2006.11.001

9 Publikationen

Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit sind im Folgenden aufgeführt.

Artikel:

Flögel L, Kaiser E, Hans MC, Goedicke-Fritz S, Bous M, Abdul-Khaliq H, Poryo M, Zemlin M and Weber R (2024) Immunological characterization of pleural effusions in pediatric patients. *Frontiers in Immunology* 15:1506073. doi: 10.3389/fimmu.2024.1506073

Impact factor 2024: 5,7

Vortrag:

Flögel L, Kaiser E, Hans MC, Goedicke-Fritz S, Bous M, Abdul-Khaliq H, Poryo M, Zemlin M und Weber R: Charakterisierung T-Zell-vermittelter Immunreaktionen in Pleuraerguss und Blut pädiatrischer Patienten nach kardiochirurgischem Eingriff.
Kongress der GNPI/DGPI/WAKKA, 2024, München

Poster:

Flögel L, Kaiser E, Hans MC, Goedicke-Fritz S, Bous M, Abdul-Khaliq H, Poryo M, Zemlin M und Weber R: Immunologische Charakterisierung von Pleuraergüssen im Kindesalter.
KKJ/DGKJ-Kongress, 2023, Hamburg

10 Danksagung

An vorliegender Arbeit waren Personen in vielfältiger Weise beteiligt. Ihnen soll gedankt werden.

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Michael Zemlin gebührt Dank für die Bereitstellung eines Forschungsprojekts, dessen Bearbeitung nicht nur große Freude bereitet hat, sondern auch Motivation für zukünftige Forschungstätigkeiten ist.

Meinen Betreuerinnen Dr. Regine Weber und Dr. Elisabeth Kaiser möchte ich danken für die Unterstützung in allen praktischen und theoretischen Belangen, für konstruktive Kritik und kreative Lösungsvorschläge. Außerdem möchte ich Ellen Maurer danken für all die Hilfe und die freundliche Aufnahme im Labor.

Herrn PD Dr. Martin Poryo von der Klinik für Pädiatrische Kardiologie des UKS danke ich herzlich für die unermüdliche klinische Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Ein besonderer Dank gilt den teilnehmenden Kindern und deren Eltern, für ihre Bereitschaft zur Studienteilnahme.

Meiner Gymnasiallehrerin Frau Renner danke ich dafür, dass sie früh wichtige Grundsteine für den beschrittenen und zu beschreitenden Weg gelegt hat.

Meinen Eltern danke ich für die Werte, die sie mir vermittelt haben.

Meiner Schwester Lisa danke ich dafür, dass sie da ist.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.