

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Zentrum für Chirurgie
Klinik für Unfallchirurgie

***Lipopolysaccharid – induzierte T – Lymphozytenproliferation
bei Patienten mit Trauma des knöchernen
Skeletts der Extremitäten***

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Jan Hinnerk Reeßing
aus Köln
2004

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Grosse-Wilde
1. Gutachter: Prof. Dr. med. C. Waydhas
2. Gutachter: Prof. Dr. med B. Kremens

Tag der mündlichen Prüfung: 1.Juni 2004

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 Das Immunsystem	6
1.1.1 Das humorale Immunsystem	6
1.1.2 Das zelluläre Immunsystem	7
1.2 Bakterielle Endotoxine	9
1.2.1 LPS als Aktivator des Immunsystems	11
1.3 Stimulation von T-Lymphozyten	12
1.3.1 Antigene	12
1.3.2 Superantigene	12
1.3.3 Mitogene	13
1.3.4 Lipopolysaccharid (LPS)	13
1.3.5 Die Rolle von CD 14 bei der LPS-Stimulation von MNZ	14
1.4 Trauma und Immunsystem	15
2 Material und Methoden	20
2.1 Isolierung der mononukleären Zellen	21
2.2 Zellkultur	22
2.3 Immunfluoreszenzfärbung	22
2.4 Statistische Auswertung	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Patientendaten	24
3.2 Einfluss von mittelschwerem Trauma auf die Proliferation der T-Lymphozyten	25
3.2.1. Spontanproliferation der MNZ	25
3.2.2. Stimulation der MNZ mit LPS, TT, PPD	29
3.2.3 CD14 und HLA-DR-Expression auf Monozyten	33
4 Diskussion	39
4.1 Einfluss von mittelschwerem Trauma auf die Spontanproliferation der MNZ	39
4.2 Einfluss von mittelschwerem Trauma auf die Proliferation der MNZ nach Stimulation mit LPS, TT oder PPD	41

4.3 Einfluss von mittelschwerem Trauma auf die Menge der Monozyten im peripheren Blut und ihre CD14-Rezeptor-Expression.....	43
4.4 Einfluss von mittelschwerem Trauma auf die HLA-DR-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten	44
5 Zusammenfassung.....	46
6 Literaturverzeichnis	47
7 Danksagung.....	53
8 Lebenslauf	54

Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigen – präsentierende Zelle
CARS	compensatory antiinflammatory response syndrome
CD	Cluster of differentiation
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
HLA	Human leukocyte antigen
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major histocompatibility complex
MNZ	periphere mononukleäre Zellen
MODS	multiple organ dysfunction syndrome
MOV	Multiorganversagen
PBS	Phosphate buffered saline
PHA	Phytohämagglutinin
PPD	Purified protein derivate of Mycobacterium tuberculosis
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TT	Tetanus toxoid
SIRS	systemic inflammatory response syndrome

1 Einleitung

Das Immunsystem rettet uns Menschen vor dem sicheren Tod durch Infektionen.

Unter Immunität versteht man die Unempfindlichkeit des Organismus für eine Infektion mit pathogenen Mikroorganismen bzw. den Schutz vor der Wirkung mikrobieller Stoffwechselprodukte.

1.1 Das Immunsystem

Bei der Immunität unterscheidet man angeborene Resistenz von erworbener Resistenz: Die angeborene, unspezifische Abwehr setzt sich zusammen aus physikalischen Barrieren (Haut, Mukosa), einer zellulären Abwehr durch Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen, sowie chemischen Barrieren (pH, Lipide, Enzyme, Surfactants).

Die erworbene, spezifische Immunität wird durch selektiv zu einer immunologischen Reaktion mit dem entsprechenden Antigen befähigte spezifische Antikörper in Körperflüssigkeiten sowie durch spezifische sensibilisierte T-Lymphozyten, Makrophagen und andere immunkompetente Zellen gewährleistet.

Es gibt zwei große Klassen von Immunantworten: Die Antikörper-Antwort des humoralen Immunsystems und die Zell-vermittelte Antwort des zellulären Immunsystems.

1.1.1 Das humorale Immunsystem

Die Antikörper-Antwort besteht in der Bildung von Antikörpern, einer Klasse von Proteinen, die synonym auch als Immunglobuline bezeichnet werden. Wegen der Abgabe dieser Antikörper an die 'Humores' des Körpers nennt man diesen Zweig der Immunität auch humorale Immunität.

Die Antikörper zirkulieren in der Blutbahn, gelangen aber auch in andere Körperflüssigkeiten. Überall dort binden sie spezifisch an das fremde Antigen, durch das ihre Bildung induziert wurde.

Antikörper inaktivieren aufgrund dieser Bindung unter anderem Viren und bakterielle Giftstoffe dadurch, dass sie eine Anheftung der Partikel oder Moleküle an Rezeptoren auf den entsprechenden Zielzellen blockieren. Außerdem leitet die Antikörper-Bindung bei eindringenden Mikroorganismen deren sichere Zerstörung durch den Körper ein, denn ein mit Antikörpern beladener Mikroorganismus kann von phagozytierenden Zellen wesentlich einfacher und wirksamer endozytiert und abgebaut werden. Weiterhin führt die Antikörper-Bindung zur Aktivierung eines Systems von Proteinen des Bluts, die in ihrer Gesamtheit „Komplement“ genannt werden und die die so gekennzeichneten Eindringlinge abtöten können.

1.1.2 Das zelluläre Immunsystem

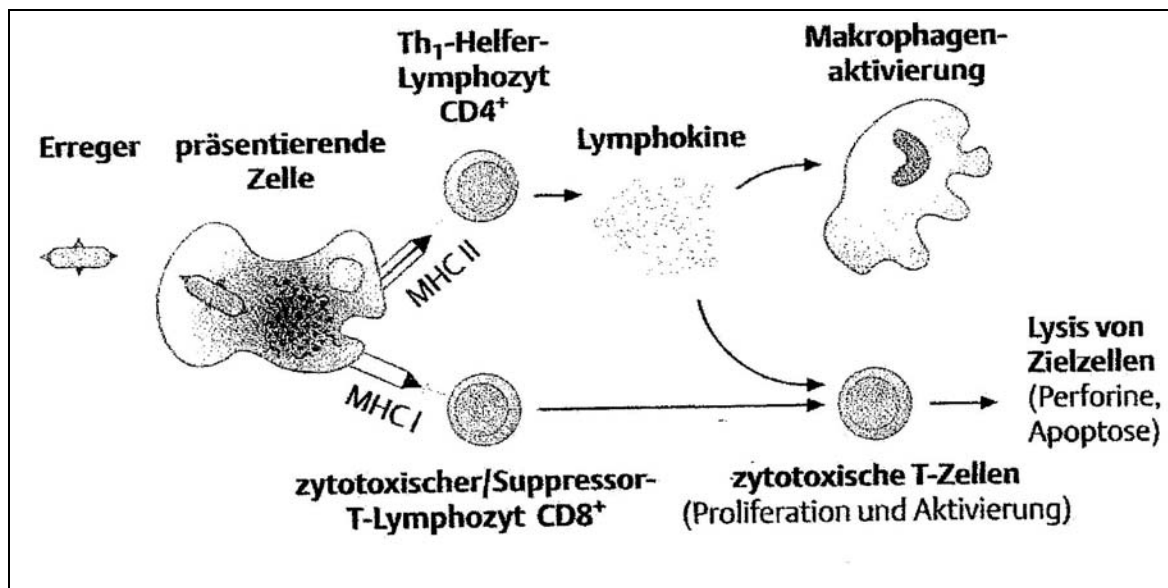
Träger der zellulären Immunreaktion sind $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Lymphozyten sowie natürliche Killerzellen. CD steht für `cluster of differentiation´ oder `cluster determinant´. Es handelt sich um Differenzierungsantigene, die durch Gruppen (Cluster) von monoklonalen Antikörpern definiert worden sind.

Die $CD4^+$ -Zellen, die auch als Helferzellen bezeichnet werden, haben in erster Linie regulatorische Funktionen, indem sie mittels Zytokinen die Aktivität der assoziierten Zellen beeinflussen. Neben diesen Funktionen haben die $CD8^+$ -Lymphozyten auch eine direkte Effektorfunktion: Nach Erkennung des durch die Antigen präsentierende Zelle (APZ) präsentierten Antigens wird neben der Aktivierung und Proliferation der T-Zellen auch die Lyse von Zielzellen eingeleitet, welche über die Sekretion zytotoxischer Substanzen (Perforine, Granzym) oder durch das Auslösen von Apoptose geschieht.

Zur Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor muss dieses nach einer Prozessierung in den APZ den T-Lymphozyten über die MHC-Moleküle präsentiert werden, wobei die $CD4^+$ -Zellen Peptide erkennen, die an MHC

Klasse II-Moleküle gebunden sind, und $CD8^+$ -Zellen mit MHC Klasse I komplexierte Proteinbestandteile erkennen.

Die natürlichen Killerzellen haben sowohl eine zytotoxische wie auch eine regulatorische Funktion. Sie erkennen im Gegensatz zu Lymphozyten die Antigene sofort, auch ohne Kontext mit MHC Klasse I oder MHC Klasse II Molekülen, und ohne vorherige Immunstimulierung und zerstören die von fremden Mikroorganismen befallenen Zellen.

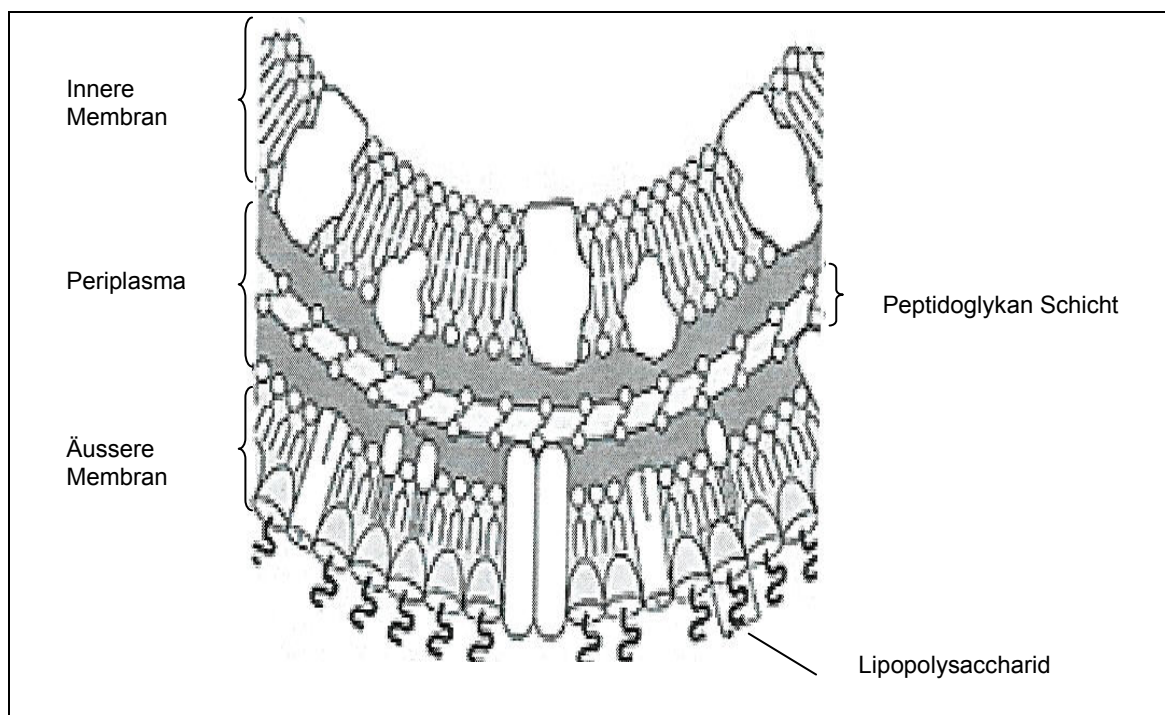


verändert nach: ³⁸

Abbildung 1: Aktivierung von T-Lymphozyten: Diese Abbildung stellt den schematischen Ablauf einer T-Lymphozytenaktivierung dar. Der Erreger wird von der Zelle über seine MHC-Komplexe präsentiert und führt so zur Aktivierung von CD4-positiven bzw CD8-positiven T-Lymphozyten. Über die Freisetzung von Lymphokinen kommt es zu einer weiteren Aktivierung der Makrophagen bzw der CD8-positiven, zytotoxischen T-Zellen.

1.2 Bakterielle Endotoxine

Endotoxine sind Teil der äusseren Membran der Zellwand von Gram-negativen Bakterien. Sie können pathogen sein, sind es aber nicht notwendigerweise. Wenngleich ein Endotoxin irgendein zellassoziertes bakterielles Toxin bezeichnet, so wird es doch im Speziellen für die Beschreibung des Lipopolysaccharidkomplexes der äusseren Membran Gram-negativer Bakterien gebraucht.



verändert nach: ⁶¹

Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Endotoxins: Dargestellt ist der Aufbau der äusseren Membran Gram-negativer Bakterien mit seinen verschiedenen Schichten

In *vivo* dient der Lipopolysaccharidkomplex des Bakteriums als Permeabilitätsbarriere und erschwert die Zerstörung durch Serumkomponenten und phagozytierenden Zellen. Weiterhin spielt er eine wichtige Rolle als Oberflächenstruktur bei der Interaktion zwischen Pathogen und Wirtskörper. Erst bei der Lyse des Bakteriums, sei es durch Komplement oder Lysozym vermittelt, oder auch durch Autolyse wird das Endotoxin frei und kann zu entzündlichen Prozessen führen.

Pathophysiologische Reaktionen des Wirtskörpers gegenüber Gram-negativen Bakterien oder dem Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) sind Fieber, Änderungen in der Anzahl der Leukozyten, disseminierte intravaskuläre Gerinnung, Hypotension, Schock und im schlimmsten Fall der Tod.

Dabei folgt auf eine Latenzperiode eine Periode physiologischem Distress, welche mit Diarrhöen und Schock einhergehen kann, der Tod. Die Ausmaße dieser Reaktionen sind abhängig von der Toxizität des Lipopolysaccharids, von der Menge des aufgenommenen Endotoxins, dem Ort der Aufnahme und auch der Empfänglichkeit des Wirtskörpers gegenüber LPS. Die folgende Abbildung zeigt die Abfolge der Reaktionen des Körpers gegenüber Endotoxin.

Ablauf der Körperreaktionen auf experimentell injiziertes Endotoxin:

1. Latenzperiode
2. Physiologischer Disstress (Diarrhöe, Prostration, Schock)
3. Tod

Abbildung 3: Ablauf der Körperreaktionen auf experimentell injiziertes Endotoxin. Über eine Latenzperiode kommt es zum physiologischen Disstress der im Tod enden kann.

1.2.1 LPS als Aktivator des Immunsystems

Sobald LPS aus lysierten Bakterien in die Blutbahn freigesetzt wird, bindet es an Plasmaproteine, den sogenannten „LPS-binding proteins“. Dieser LPS-bindende Proteinkomplex interagiert sodann mit den CD14-Rezeptoren auf Monozyten und Makrophagen.

Dies führt zur

- Produktion von Zytokinen wie:
IL-1, IL-6, IL-8, TNF α
- Aktivierung des Komplementsystems
- Aktivierung der Koagulationskaskade
- Proliferation von Lymphozyten.

Die freigesetzten Zytokine wiederum stimulieren die Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen. Sie sind Mediatoren der Entzündung und des septischen Schocks. Über die Komplementkaskade wird Histamin frei und neutrophile Granulozyten werden angezogen: Das Ergebnis ist eine Entzündung. Der Nettoeffekt der Koagulationskaskade ist die Einleitung einer Entzündung, intravaskuläre Koagulation, Blutungen und Schock.

All diese physiologischen Aktivitäten werden hauptsächlich über die Lipid A-Komponente von LPS vermittelt. Die folgende Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines Lipopolysaccharids.

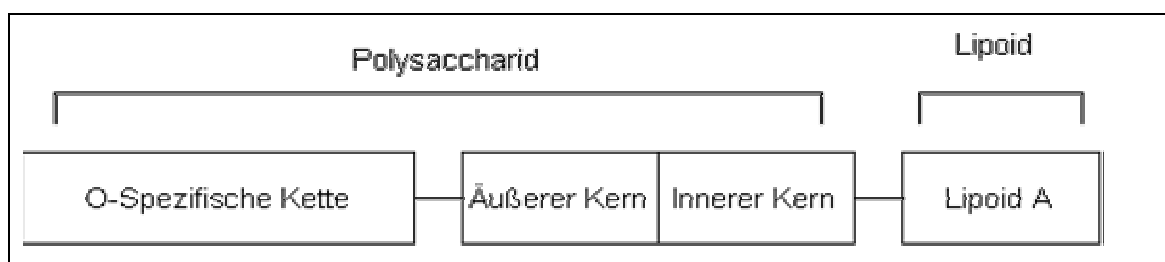


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Lipopolysaccharids

1.3 Stimulation von T-Lymphozyten

T-Lymphozyten lassen sich auf verschiedene Arten zur Proliferation anregen:

1.3.1 Antigene

Die Voraussetzung für Antigen-spezifische Aktivierung von T-Zellen ist die Erkennung von MHC-gebundenen Antigenpeptiden, die von den APZ dem T-Zell-Rezeptor-Komplex präsentiert werden ²⁴.

Neben dieser Aktivierung des T-Zell-Rezeptors über ein Antigen ist noch ein Kostimulierungssignal notwendig, welches zum Beispiel über die Bindung des B7-Proteins auf der APZ an deren Liganden – CD-28 oder CTLA-4 – auf der T-Zelle vermittelt wird ³.

Dieses Doppelsignal löst über Interleukin-2 die klonale Expansion der T-Zelle aus.

Das Recall-Antigen Tetanus Toxoid (TT), was für die vorliegende Studie genutzt wurde, ist ein Peptid, von dem bekannt ist, dass es die T-Zellen der meisten Menschen stimuliert, unabhängig von ihrem HLA-Haplotyp ⁶⁰.

1.3.2 Superantigene

Superantigene sind vor allem Toxine von Bakterien, aber auch Bestandteile von Retroviren können sich wie Superantigene verhalten.

Superantigene binden an die β -Untereinheit des T-Zell-Rezeptors, welche durch spezifische V β -Gensegmente kodiert wird. Die Erkennung der Superantigene ist unabhängig von der klonalen Spezifität des T-Zell-Rezeptors. Die Anzahl der Lymphozyten, die das jeweilige V β -Segment exprimieren, beläuft sich auf etwa 5% der peripheren T-Zellen. Endozytose oder proteolytische Prozessierung durch Antigenpräsentierende Zellen ist nicht notwendig: Die Superantigene binden als intakte Proteine an die MHC II-Moleküle an einer Stelle, die nicht der peptidbindenden Furche entspricht.

Somit wird bei Stimulation der T-Lymphozyten durch Superantigene der komplexe Prozess von Antigenpräsentation durch APZ und T-Zell-Kostimulation umgangen^{1'32'34'35}.

1.3.3 Mitogene

Mitogene sind Substanzen, die die Zellteilung induzieren. Sie imitieren Antigene in der Hinsicht, dass die Lymphozyten auf das Mitogen mit denselben zellulären Aktivitäten reagieren, wie auf Antigene.

Phytohämagglutinin (PHA) und Concanavalin A (Con A) wirken im menschlichen Blut spezifisch, das heisst, sie stimulieren überwiegend T-Lymphozyten.

1.3.4 Lipopolysaccharid (LPS)

Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin) ist eine der Hauptkomponenten der äusseren Membran Gram - negativer Bakterien. Die Freisetzung von LPS durch die Lyse der Bakterie gilt neben anderen Mechanismen als mitverantwortlich für systemische Reaktionen schwerverletzter Patienten und kann zu septischem Schock mit hohem Risiko eines tödlichen Ausgangs führen.

LPS stimuliert verschiedene Typen von Zellen, darunter Monozyten/Makrophagen¹⁰⁻¹¹, Endothelzellen⁴⁵ und Granulozyten⁶³ zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren, einschliesslich IL-1, IL-6 und TNF- α . Murine B-Lymphozyten werden durch LPS zur Proliferation und Antikörper-Produktion angeregt²⁵.

Menschliche B-Zellen sowie Myeloidzellen reagieren allerdings nicht mit Proliferation auf LPS¹²⁻⁷⁴.

CD3⁺- CD56⁺ natürliche Killerzellen vermehren sich und expandieren dahingegen unter dem Stimulus des Endotoxins²⁷.

LPS induziert weiterhin sowohl menschliche als auch murine T-Lymphozyten zur Proliferation und Zytokin-Produktion⁵⁵. Diese T-Zell-Aktivierung ist abhängig von direktem Zellkontakt zwischen T-Lymphozyten und akzessorischen Monozyten⁵². Diese Rezeptor-Liganden-Interaktion ist nicht

MHC-restringiert und beruht auf der Interaktion zwischen CD28 und/oder CTLA-4 auf Lymphozyten und ihren Liganden CD80 und/oder CD 86 auf den akzessorischen Monozyten⁵⁰.

CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen und IL-12 sind weitere notwendige Faktoren um eine T-Zellaktivierung durch LPS zu erzielen^{50,51}.

Die geringe Frequenz, mit der T-Zellen auf LPS reagieren, lässt darauf schliessen, dass LPS kein T-Zell-Mitogen ist; die Abhängigkeit von CD80-CD28-Interaktionen schliesst die Möglichkeit, LPS wirke wie ein Superantigen, aus; und die MHC-unrestringierte Interaktion zwischen APZ und T-Lymphozyten machen die Wirkweise als klassisches T-Zell-Antigen unwahrscheinlich⁵¹.

Da Monozyten und Stammzellen kein CD1 exprimieren, kommt auch die Möglichkeit, LPS - als ein lipinöses Antigen - könne wie Lipoarabinomannan⁶⁴ über CD1 – MHC-unabhängig - präsentiert werden, nicht in Frage⁵¹.

1.3.5 Die Rolle von CD 14 bei der LPS-Stimulation von MNZ

Der CD14-Rezeptor auf Monozyten spielt eine essentielle Rolle in der Transmission von LPS-Signalen in das Innere der Zelle⁷³.

Studien an genetisch veränderten Mäusen haben gezeigt, dass das Fehlen des CD14-Proteins zu einer verminderten Antwort auf LPS führte³¹, während eine verstärkte Expression von CD14 sich in einer Hypersensitivität gegenüber LPS äusserte²².

1.4 Trauma und Immunsystem

Der Begriff Trauma stammt aus dem Griechischen und beschreibt eine durch äußere Gewalteinwirkung hervorgerufene Verletzung. Nach heutigem medizinischen Verständnis umfasst der Begriff sowohl die Verletzung des Organismus durch elektive chirurgische Eingriffe, wie auch durch unfallbedingte Verletzungen. Beide Ereignisse stellen Eingriffe in die körperliche Integrität dar, die zu immunologischen, metabolischen und mikrozirkulatorischen Komplikationen im schlimmsten Fall mit Todesfolge führen können.

Das schwere unfallbedingte Trauma stellt nach amerikanischen Studien die vierthäufigste Todesursache überhaupt und die häufigste Todesursache in den ersten drei Lebensdekaden dar ⁴⁴. Auch in Deutschland spielt das schwere Trauma mit jährlich cirka 10000 posttraumatischen Todesfällen eine wichtige Rolle.

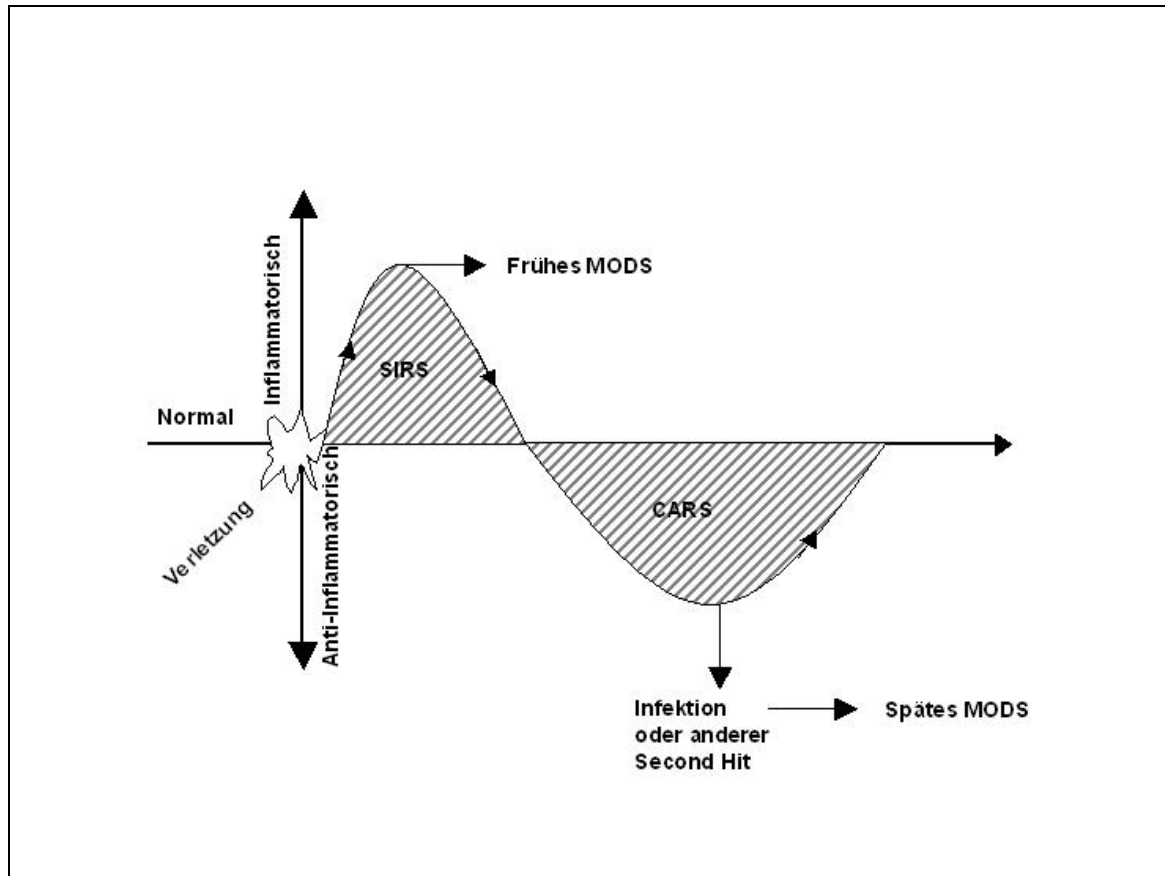
Die Letalität der polytraumatisierten Patienten konnte in den letzten Jahren durch Einführung moderner Rettungssysteme, Fortschritte in Diagnostik und chirurgischer Versorgung gesenkt werden. Die immer erfolgreichere Primärbehandlung führte zu einer Stabilisierung der vitalen Funktionen in der initialen Phase nach dem Trauma. Während in den Jahren 1975 – 1980 die Mortalität aufgrund eines Multiorganversagens bei Patienten mit einem Injury Severity Score (ISS) > 15 Punkten noch bei 18% lag, verringerte sich die Mortalität in den Jahren 1998 – 1999 signifikant auf 4,1%. Die Morbidität des Multiorganversagens ist indessen in den letzten Jahren nicht gesunken ⁵⁷.

In den frühen 80er Jahren wurde zum ersten Mal postuliert, dass schwere Verletzungen zu beeinträchtigter Funktion der Lymphozyten führen und diese Änderungen im Immunsystem zur Sepsis prädisponieren, aber nicht notwendigerweise durch Sepsis hervorgerufen wurden ⁵⁸.

Eine Vielzahl von Immundefekten, die einem Trauma nachfolgten, waren zu dem Zeitpunkt schon beschrieben: Dysfunktionen der polymorphnukleären

Leukozyten⁵³, des Komplementsystems⁹, der Lymphozyten⁴¹ und Makrophagen⁶⁹.

Heutzutage wird die immunologische Antwort auf Verletzungen gut durch folgendes Modell beschrieben:



verändert nach:^{49,56}

Abbildung 5: Immunologische Antwort auf eine Verletzung

Einem schweren Trauma folgt direkt eine systemische inflammatorische Antwort (SIRS), die in einer Minderheit von Patienten (20-30%) persistiert und zum multiplen Organdysfunktions-Syndrom (MODS) mit hoher Mortalität führen kann. In der Mehrheit der Patienten verschwindet die systemische inflammatorische Antwort ohne zum multiplen Organdysfunktions-Syndrom zu führen und mündet in eine kompensatorische antiinflammatorische Antwort (CARS) mit verminderter Resistenz gegenüber nosokominalen Infektionen.

Die klinischen Manifestationen der systemischen Antwort auf Trauma, hämorrhagischen Schock, Verbrennungen, Infektionen und andere Verletzungen sind als systemische inflammatorische Antwort (= systemic inflammatory response syndrome = SIRS) definiert worden:

Als Einschlusskriterien gilt das Auftreten von zumindest zwei der folgenden Symptome:

- Temperatur $> 38\text{ °C}$ oder $< 36\text{ °C}$
- Herzfrequenz > 90 Schläge/min
- Atemfrequenz > 20 Atemzüge/min oder $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg
- Leukozyten $> 12000/\mu\text{l}$ oder $< 4000/\mu\text{l}$ oder $> 10\%$ unreife Granulozyten im peripheren Blut

Die nach einer Vielzahl von unspezifischen Schädigungen auftretende systemische inflammatorische Reaktion wird überwiegend unter dem klinischen Bild eines unkomplizierten Heilungsverlaufes unbeschadet überstanden. Wenn sich eine Perpetuierung des Geschehens abzeichnet, mündet das SIRS im ungünstigsten Fall in ein unkontrollierbares Versagen der physiologischen Regulationsvorgänge mit der Folge eines progredienten (Multi-) Organversagens (= multiple organ dysfunction syndrome = MODS)⁵⁹.

Die Mehrheit der Patienten, die die Phase des SIRS ohne die Entwicklung eines MODS überwinden, zeigen nach einer Zeit relativer klinischer Stabilität ein kompensatorisches anti-inflammatorisches Syndrom (= compensatory antiinflammatory response syndrome = CARS) mit verminderter Immunität und abgeschwächter Resistenz gegenüber Infektionen.

Eine folgende Infektion bei nicht-funktionstüchtigem Immunsystem kann so schnell zum Multiorganversagen (MOV) führen und mit dem Tode enden.

Der hier als CARS bezeichnete anti-inflammatorische Zustand des Immunsystems wird an anderen Stellen auch als Immunparalyse bezeichnet⁶⁶⁻⁵⁻⁷¹. Wenngleich diese Abwehrlage durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden kann, so ist sie stets begleitet von funktionellen Abnormalitäten der Leukozyten.

Dies zeichnet sich aus in einer drastischen Abnahme der Expression von MHC-Klasse II- und CD86-Molekülen auf den APZ, was mit einer verminderten Antigenpräsentation verbunden ist ⁶⁷. Außerdem ist die Unterdrückung der Lymphozyten-Antwort auf Mitogene ⁵⁸ und einer verminderten Fähigkeit zur Produktion von Zytokinen seitens der MNZ ² zu beobachten.

Die erniedrigte MHC-Klasse II-Expression auf peripheren Blutmonozyten wird als ein diagnostischer Indikator der Immunparalyse (CARS) angesehen, wobei deren Persistenz mit einem hohen Risiko für schwere Infektionen und einem tödlichen Ausgang korreliert ¹⁸⁻⁴.

Im Jahre 1980 berichtete die Forschergruppe um C. Baker, dass 78% aller nicht-neurologischen Todesfälle nach Trauma auf Sepsis zurückzuführen seien ⁷.

Im Klinikum Grosshadern in München waren im Jahre 1990 55% der Todesfälle nach operativen Eingriffen unter extrakorporaler Zirkulation durch septisches Multiorganversagen bedingt ¹⁹.

Eine epidemiologische Studie von 1995 ⁵⁹ zeigte, dass von 3078 Patienten internistischer, chirurgischer und kardiovaskulärer Intensivstationen und allgemeinchirurgischer, Herz-Thorax-chirurgischer und onkologischer Normalstationen 68% die Kriterien eines SIRS erfüllten. Von diesen Patienten entwickelten 26% eine Sepsis, 18% eine schwere Sepsis und 4% einen septischen Schock mit einer ansteigenden Mortalität von 7% bis auf 46%.

Heutzutage ist bekannt, dass die Dysregulation essentieller Mediator- und Zellsysteme des körpereigenen Abwehrsystems die Voraussetzung für das Auftreten eines septischen Multiorganversagens ist ²⁸.

Während einige Wissenschaftler in dem Ausmaß der Dysregulation dieser Systeme den entscheidenden Faktor für die Entwicklung eines Sepsissyndroms zuordnen ¹⁶, zeigte sich in anderen Studien, dass die Antwort der Lymphozyten, als wichtiger Bestandteil des Immunsystems, auf mitogene oder antigene Stimulation das Ausmass des Traumas widerspiegelte ⁴¹. Andere Studien bestätigten eine direkte Proportionalität zwischen der Grösse der Änderung der Abwehrantworten und der Schwere der Verletzung ⁴³.

In der vorliegenden Studie wurde nun untersucht, welche Änderungen im Immunsystem von Patienten, die aufgrund von Extremitätenfrakturen mittelschwerer chirurgischer Eingriffe unterzogen wurden, auftreten. Es sollte herausgefunden werden, ob auch ein mittelschweres Trauma zu einer Veränderung im Immunsystem führt.

Im Speziellen wurden die Proliferationsantworten der peripheren mononukleären Zellen spontan, unter Endotoxinstimulation und Antigenstimulation untersucht, um eventuelle Unterschiede bei verschiedenen Wegen der Immunantwort herauszufinden.

Zusätzlich erfolgte die Messung der Menge der Monozyten und ihre HLA-DR-, sowie CD14-Expression.

2 Material und Methoden

Die Untersuchung wurde an 20 Patienten (4 Frauen und 16 Männer) mit unterschiedlichen chirurgischen Eingriffen, in einem Alter von 21 bis 68 Jahren mit einem Altersdurchschnitt von 42 ± 13 Jahren durchgeführt. Von diesen Patienten hatten 14 unterschiedliche Frakturen des knöchernen Skelettes (m=11, w=3). Bei den verbleibenden 6 Patienten erfolgte eine Metallentfernung von Stahlimplantaten (2 Tibiamarknägel, 1 Femurmarknagel, 1 Humerusmarknagel, 2 Plattenosteosynthesen).

Bei den 14 Frakturpatienten handelt es sich bei 12 Patienten um Frakturen der unteren Extremität von denen 8 Patienten mit Plattenosteosynthesen (3 Tibiakopffrakturen, 3 Calcaneusfrakturen, 1 Pilonfraktur, 1 Mittelfußknochenfraktur) versorgt wurden, 2 Patienten bekamen einen Oberschenkelmarknagel, 1 Patient einen Unterschenkelmarknagel und 1 Patient wurde mit einer Schraubenosteosynthese (Calcaneusfraktur) versorgt. Bei den verbleibenden 2 Patienten handelte es sich um Frakturen der oberen Extremität wobei ein Patient mit einer Drahtcerclage (Claviculafraktur) und einer mit einer Plattenosteosynthese (Ulnarfraktur) versorgt wurde. Bei den eingebrachten Marknägeln und Platten und Schraubenosteosynthesen handelte es sich um Titanimplantate.

Die chirurgische Versorgung der Frakturen erfolgte zwischen dem ersten und dem elften Tag nach Trauma.

17 der chirurgischen Eingriffe erfolgten in Intubationsnarkose, 2 in kombinierter spinaler mit epiduraler Anästhesie und 1 Eingriff erfolgte in Spinalanästhesie. Keiner der Patienten zeigte in den ersten beiden postoperativen Tagen klinische Zeichen einer bakteriellen Komplikation.

Als Kontrolle wurden Blutproben von 30 Probanden in einem Alter von 20-60 Jahren analysiert die sich weder vom Alter als auch vom Geschlecht signifikant von der Patientengruppe unterschieden. Diese Werte wurden zu einem Meßzeitpunkt erhoben und dienen als Referenz für die statistische Auswertung der gemessenen Ergebnisse der Patienten.

2.1 Isolierung der mononukleären Zellen

Den Patienten wurden heparinisierte Blutproben [NH₄-Heparin, Sarstedt Monovette] um 7 Uhr am Operationstag und dem ersten und zweiten Tag nach der Operation ebenfalls um 7 Uhr im Rahmen der regulären Blutabnahmen abgenommen.

Zur Trennung der peripheren mononukleären Zellen (das heißt vor allem der T-Lymphozyten, Monozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen) von den Granulozyten und Erythrozyten wurde die Tatsache benutzt, dass mononukleäre Zellen eine niedrigere Dichte haben als die anderen genannten Zellen. So konnten die mononukleären Zellen durch eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation auf Ficoll-Paque [Ficoll-Paque: Dichte 1.077 g/ml, Biochrom KG, Berlin] gewonnen werden. Dazu wurde die Blutprobe zu gleichen Volumenanteilen mit PBS [PBS Dulbecco's: Phosphate Buffered Saline W/O Sodium Bicarbonate, Gibco BRL] gemischt und vorsichtig auf ein Polster von cirka 10 ml Ficoll-Paque geschichtet. Nach einer Zentrifugationszeit von 45 Minuten bei 290 xg bei Raumtemperatur waren die mononukleären Zellen als weißliche Schicht auf dem farblosen Ficoll-Paque zu erkennen. Die Granulozyten und Erythrozyten dagegen waren durch die Ficoll-Paque-Schicht gewandert und befanden sich am Grund des Zentrifugenröhrchens. Mit einer Pipette konnte die Schicht der mononukleären Zellen vorsichtig geerntet werden. Zur Entfernung der Thrombozyten wurden die mononukleären Zellen noch zweimal mit PBS gewaschen (10-minütige Zentrifugation bei 400 xg, 4°C) in Medium [RPMI 1640: mit Glutamax-I mit 25MM HEPES, Gibco BRL] mit 10% FCS [fötales Kälberserum, Sigma, Deisenhof] und Antibiotika (Penicillin 100 U/ml und Streptomycin 100 µg/ml) [Sigma, Deisenhof] aufgenommen. Zur Ermittlung der Viabilität und der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau [Sigma, Deisenhof] versetzt und in einer Neubauerkammer gezählt. Die Viabilität der untersuchten mononukleären Zellen lag stets über 95%.

2.2 Zellkultur

Mononukleäre Zellen (1×10^6 /ml) wurden in RPMI 1640, 10 % FCS und Antibiotika kultiviert. Die Zellen wurden in 96-Napf Flachbodenplatten [Becton Dickinson Labware, Heidelberg] in einem Volumen von 200 μ l/Kultur kultiviert. Es wurden jeweils drei parallele Kulturansätze für 7 Tage mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle wurden drei Zellansätze mit Tetanus Toxoid (TT) (1 LF/ml) [Behring Werke AG, Marburg] und mit PPD [purified protein derivatives of Mycobacterium tuberculosis, Statens Serum Institut, Copenhagen, Dänemark] (1 μ g/ml) stimuliert. Drei Zellansätze wurden ohne jeglichen Zusatz als Kontrolle der Spontanproliferation mitgeführt. Die Stimuli waren während der ganzen Kulturzeit anwesend. Die DNS-Synthese wurde durch den radioaktiven Einbau von [3 H]TdR (0,2 μ Ci/Kultur) [spezifische Aktivität 2 Ci/mM, Amersham Buchler, Braunschweig] während der letzten 8 Stunden der Kultur bestimmt. Die Zellen wurden über Glasfiltermatten filtriert und die Radioaktivität in den Filtern in einem β -Counter [LKB Wallac, 1205 Betaplate, Berthold, Hannover] gemessen.

2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Phänotypisierung der mononukleären Zellen wurden die Zellen mit murinen, monoklonalen Antikörpern (mAK) markiert. Die Zellen wurden mit eiskaltem Azid-PBS (PBS mit 0,1 % NaN_3) gewaschen und mit Fluoreszenz markiertem mAK anti-CD14 [Klon M5E2, Isotyp IgG_{2a}, Pharmingen, Hamburg], oder mit anti-HLA-DR [Klon G46-6, Isotyp IgG_{2a}, Pharmingen] in den von den Herstellern angegebenen Konzentrationen versetzt. Zur Ermittlung der unspezifischen, meist Fc-Rezeptor vermittelten Markierung der Zellen wurde ein Zellaliquot mit einem Kontrollantiserum vom IgG_{2a}-Isotyp [Dianova, Hamburg] markiert, wobei das Kontrollserum in der gleichen Konzentration eingesetzt wurde wie die monoklonalen Antikörper.

Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 4°C wurden die Zellen durch Zentrifugation über einem FCS Gradienten (200 xg für 10 min) gewaschen.

Die Zellen wurden in einem FACStar Flow Cytometer [Becton Dickinson, Heidelberg] analysiert. Die Monozyten wurden eingegrenzt durch ihre Vorwärts/Seitwärts Streuung. Es wurden 10.000 Zellen von jeder Probe gezählt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil von jedem mononukleären Antikörper im Vergleich zu den fluoreszenzmarkierten Zellen der Isotyp-Kontrolle bestimmt.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte durch den Student-T-Test mit dem Programm SPSS Version 11. Die Signifikanz wurde bei $p = 0,05$ festgelegt.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism Version 3.0. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

3 Ergebnisse

3.1 Patientendaten

Die Studie zur Veränderung von Immunparametern nach mittelschwerem Trauma wurde an 20 Patienten durchgeführt, von denen 14 Knochenbrüche nach Unfällen erlitten und 6 zur Metallentfernung geplant elektiv ins Krankenhaus kamen. Tabelle 1 fasst die Patientendaten mit Altersangaben zusammen.

Tabelle 1: Übersicht der Patientendaten

Diagnose	Anzahl	Alter	
		Durchschnitt	Verteilung
Knochenbrüche nach Unfällen	14	45 ± 12	27 - 68
Metallentfernung	6	36 ± 14	21 - 56
Kontrolle	30	35 ± 13	20 - 60

Unter den Patienten befanden sich 4 Frauen und 16 Männer. Trotz der unterschiedlichen Geschlechterverteilung gab es keinen signifikanten Altersunterschied zwischen den beiden Geschlechtern ($p=0,24$) (Abbildung 6).

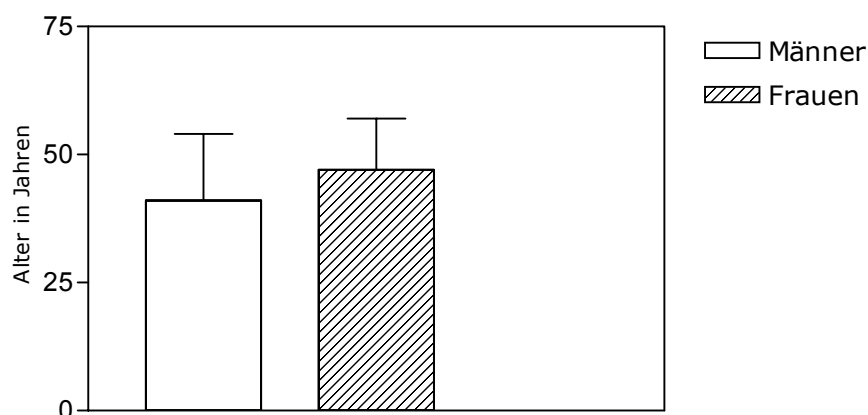


Abbildung 6: Altersvergleich der Patienten. Aufteilung der Patienten nach Geschlecht und Darstellung des Alters in Jahren

3.2 Einfluss von mittelschwerem Trauma auf die Proliferation der T-Lymphozyten

Durch den Einbau von radioaktivmarkiertem [^3H]TdR wurde in den Zellkulturen von monozytären Zellen die DNS-Synthese gemessen, und somit die Proliferation von T-Zellen (vgl. Einleitung) in der Kultur bestimmt.

3.2.1. Spontanproliferation der MNZ

Je drei Zellansätze aus monozytären Zellen der Patienten und der gesunden Kontrollgruppe wurden ohne Stimulation über 7 Tage kultiviert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, die einen cpm/Kultur-Wert von 697 ± 627 aufzeigte, hatte die Patientengruppe präoperativ eine um bis zu vierfach erhöhte Spontanproliferation der T-Lymphozyten *in vitro* (2604 ± 1857 cpm/Kultur), welches einem hochsignifikantem Ergebnis entspricht ($p < 0,001$). (Abbildung 7)

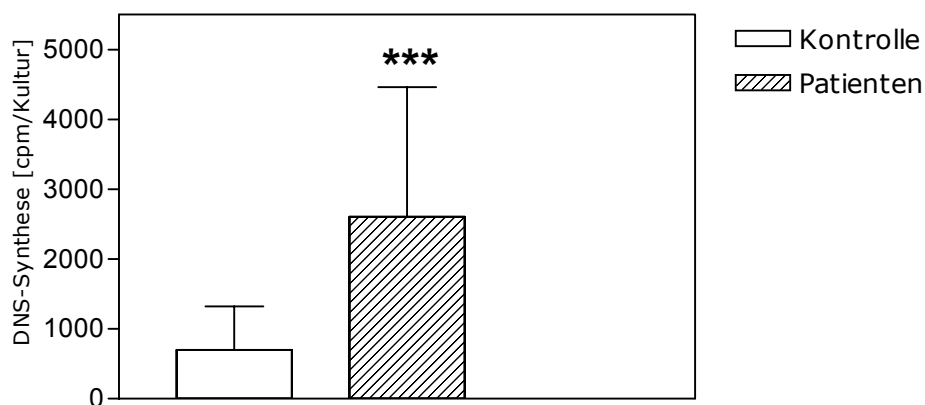


Abbildung 7: Vergleich der Spontanproliferation der Kontrolle und der Patienten präoperativ. Die Spontanproliferation der Patienten ist hochsignifikant ($p < 0,001$) erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe

Es wurden die unterschiedlichen Spontanproliferationen der jeweiligen Patienten untereinander verglichen, um herauszufinden, ob sich ein Altersabhängiger oder Geschlechterabhängiger Unterscheid zeigte. Dabei konnten jedoch keine signifikanten Unterscheide festgestellt werden.

(Altersabhängigkeit : $p= 0,29$, Geschlechterabhängigkeit $p= 0,09$). (Abbildungen 8 und 9)

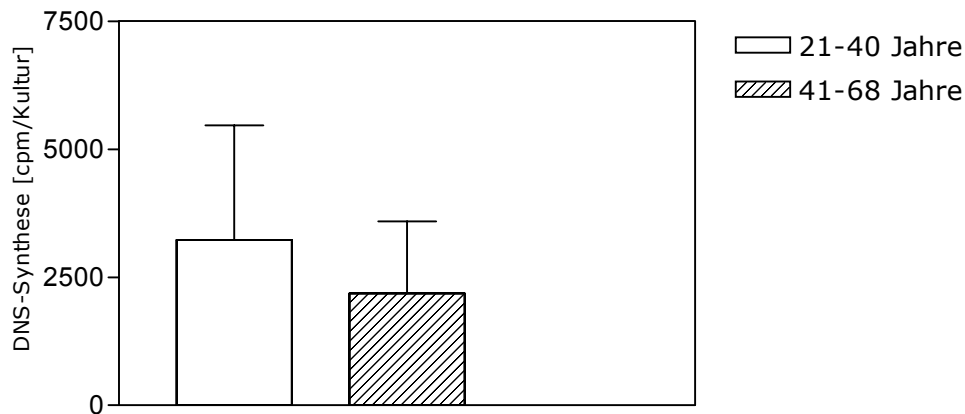


Abbildung 8: Vergleich der Spontanproliferation der Patienten aufgeteilt in 2 Altersklassen, wobei es keine signifikanten Unterschiede gab.

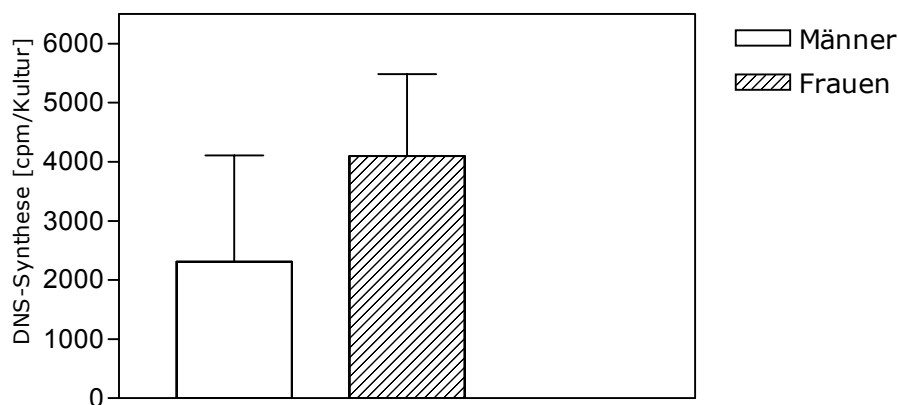


Abbildung 9: Vergleich der Spontanproliferation der Patienten aufgeteilt nach dem Geschlecht, wobei es keine signifikanten Unterschiede gab.

Ein weiteres Unterscheidungskriterium war die Zeit zwischen dem Trauma und des chirurgischen Eingriffes. Dazu wurden die Frakturpatienten anhand der Zeit zwischen Trauma und Operation in zwei Gruppen eingeordnet. Bei der Gruppe 1 (OP am Tag 1-5) lag die Zeit zwischen Trauma und Operation bei $3 \pm 1,2$ Tagen und bei der Gruppe 2 (OP am Tag 6-11) zwischen $9 \pm 1,6$ Tagen. (Abbildung 10). Auch bei diesem Unterscheidungskriterium konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p= 0,7$).

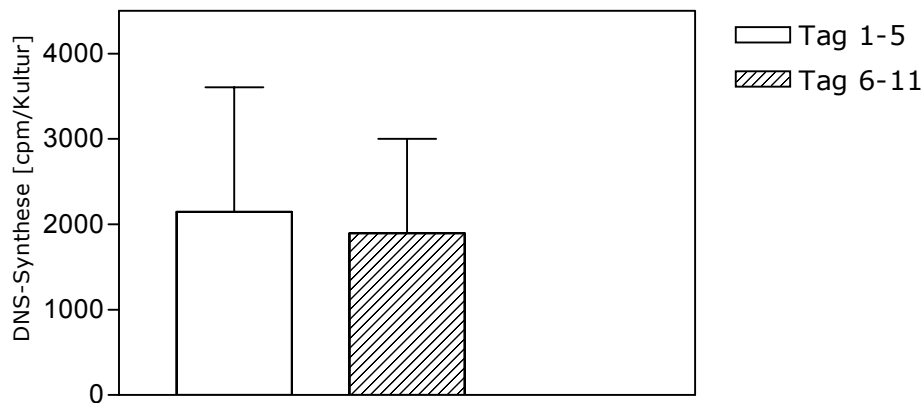


Abbildung 10: Vergleich der Spontanproliferation der Frakturpatienten anhand des Zeitpunktes zwischen Trauma und Operation in Tagen.

Bei der Unterscheidung der Patienten zwischen Fraktur und Metallentfernung zeigte sich, dass die Spontanproliferation bei den Patienten, die zur geplanten Metallentfernung ins Krankenhaus kamen, höher war als bei den restlichen Patienten. (Patienten mit Metallentfernung: 3757 ± 2419 cpm/Kultur; Fraktur Patienten 2109 ± 1267 cpm/Kultur) (siehe Abbildung 11). Dieser Unterschied war allerdings mit $p = 0,2$ nicht signifikant. Auch im weiteren postoperativen Verlauf zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Spontanproliferation dieser beiden Patientengruppen (Abbildung 12).

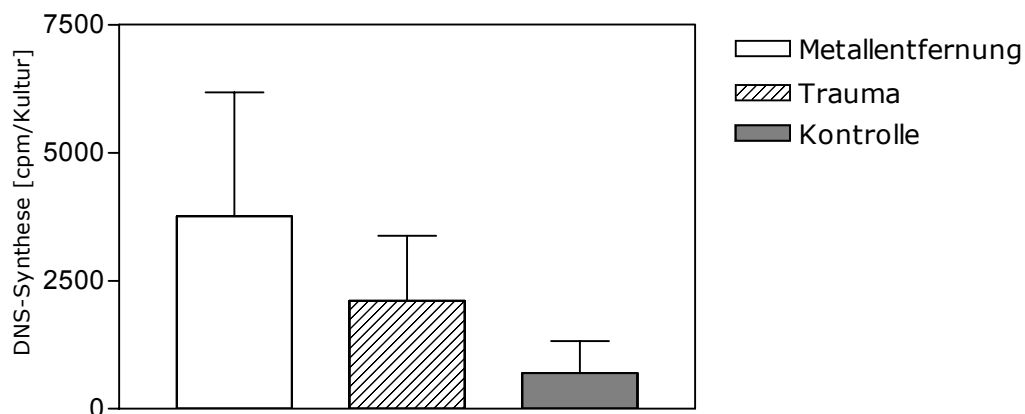


Abbildung 11: Vergleich der Spontanproliferation der Patientengruppen. Es zeigt sich eine leicht erhöhte Spontanproliferation der Patienten mit Metallentfernung im Vergleich zu den Frakturpatienten. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

Im postoperativen Verlauf zeigte sich eine Normalisierung der erhöhten T-Zellproliferation. Es erfolgt ein kontinuierlicher Abfall der Spontanproliferation, wenngleich die Werte sowohl für den ersten als auch für den zweiten postoperativen Tag) im Vergleich zur Kontrollgruppe noch signifikant erhöht waren ($p= 0,001$ und $p= 0,044$). (1.postoperativer Tag: 2231 ± 1692 cpm/Kultur; 2. postoperativer Tag 1479 ± 1223 cpm/Kultur) (Abbildung 13)

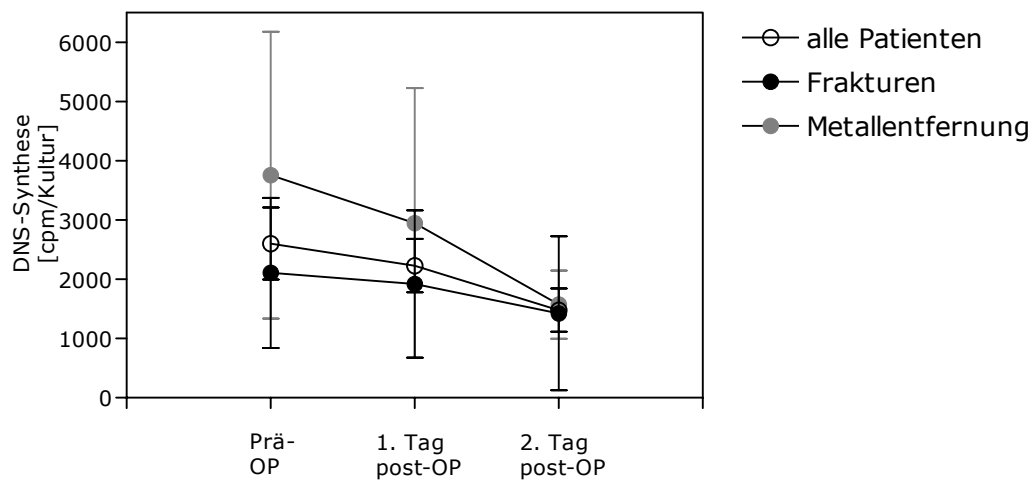


Abbildung 12: Entwicklung der Spontanproliferation im postoperativen Verlauf.

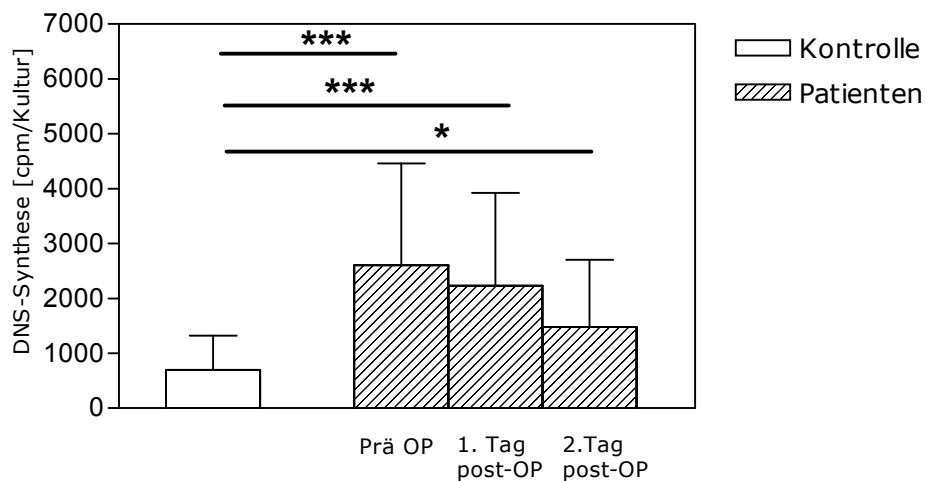


Abbildung 13: Darstellung der Entwicklung der Spontanproliferation der Patienten im Vergleich zu den Referenzwerten der Kontrollgruppe. Es zeigt sich eine hochsignifikante ($***p < 0,001$) Erhöhung der Spontanproliferation am präoperativen und am ersten postoperativen Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe. Am zweiten postoperativen Tag nahm diese ab, war aber noch im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($*p= 0,044$) erhöht.

3.2.2. Stimulation der MNZ mit LPS, TT, PPD

Die Kulturansätze der mononukleären Zellen wurden über 7 Tage mit dem Endotoxin Lipopolysaccharid kontinuierlich stimuliert. Im Vergleich der T-Zellproliferation des Blutes der gesunden Kontrollgruppe gegenüber der Patienten zeigte sich, dass präoperativ die Zellen der Patienten nicht in dem Ausmaße stimulierbar waren, wie die Zellen der gesunden Kontrollen. Die DNS-Synthese ergab 4996 ± 3423 cpm/Kultur für die Patienten und 6730 ± 6510 cpm/Kultur für die Kontrolle. Aufgrund der hohen individuellen Schwankungen sowohl innerhalb der Patientengruppe, als auch bei den Probanden, war dieser Unterschied mit $p= 0,236$ aber nicht signifikant (Abbildung 14).

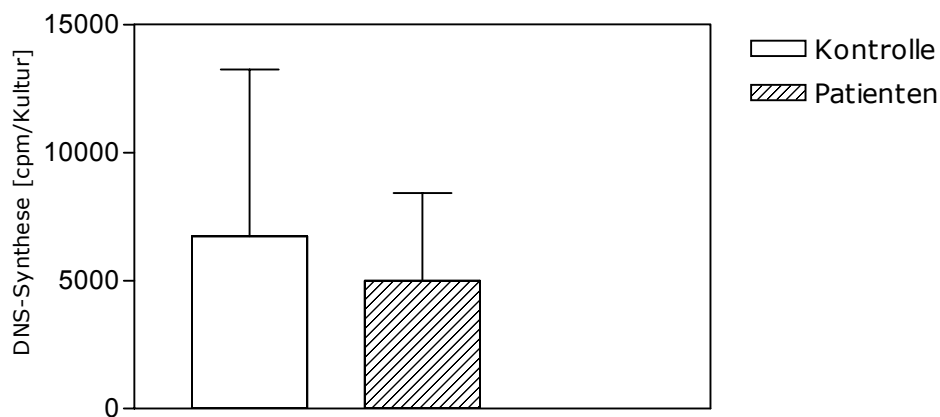


Abbildung 14: Vergleich der präoperativen LPS-Stimulation der Patienten mit derer der Kontrollgruppe. Es zeigt sich eine erniedrigte Stimulationsfähigkeit der Patienten, die Aufgrund der hohen individuellen Streuung jedoch nicht signifikant war ($p= 0,23$).

Auch für die Stimulation der MNZ mit LPS, TT und PPD wurden die Gruppen wie schon bei den Untersuchungen der Spontanproliferation in die oben genannten Untergruppen aufgeteilt. Der einzige bestehende Unterschied war eine tendenziell reduzierte LPS Stimulierbarkeit am präoperativen Tag der Frakturpatienten im Vergleich zu den Patienten mit Metallentfernung. Die Werte entsprachen denen der gesunden Kontrollgruppe. (Metallentfernung 7200 ± 3347 cpm/Kultur, Kontrolle 6725 ± 6512 cpm/Kultur) (Abbildung 15).

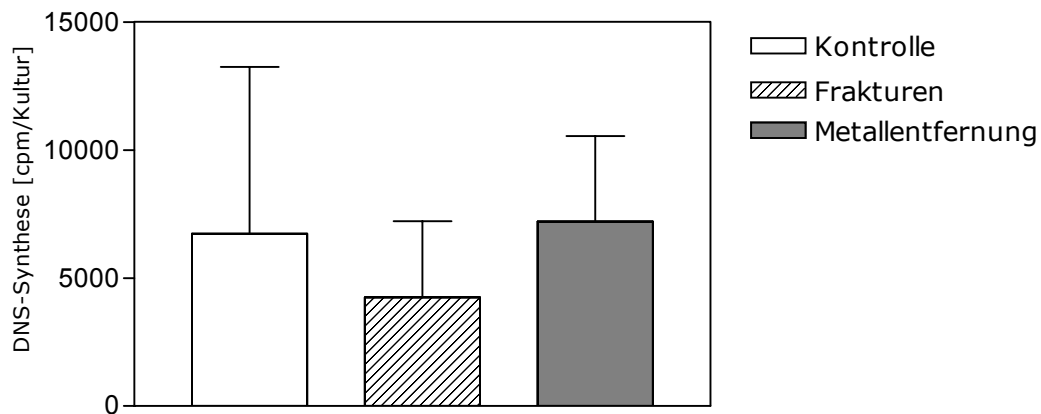


Abbildung 15: Vergleich der präoperativen LPS Stimulierbarkeit der Patienten mit Metallentfernung und mit Fraktur. Es zeigt sich eine im Vergleich zur Kontrollgruppe normale Stimulationsfähigkeit der Patienten mit Metallentfernung im Vergleich zu den Frakturpatienten.

Im postoperativen Verlauf zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Patientengruppen, so dass sie im Folgenden als eine Gruppe zusammengefasst werden. Es stellte sich eine, im Vergleich zur Kontrollgruppe, am ersten postoperativen Tag signifikant ($p < 0,02$) reduzierte Stimulationsfähigkeit durch LPS (3519 ± 3229 cpm/Kultur) dar. Am zweiten postoperativen Tag bestand ebenfalls eine weiterhin signifikante ($p = 0,048$) Reduktion der T-Zellproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe (3608 ± 3357 cpm/Kultur). Abbildung 16 gibt die Entwicklung der T-Zellproliferation unter LPS-Stimulierung vor und nach der Operation wieder.

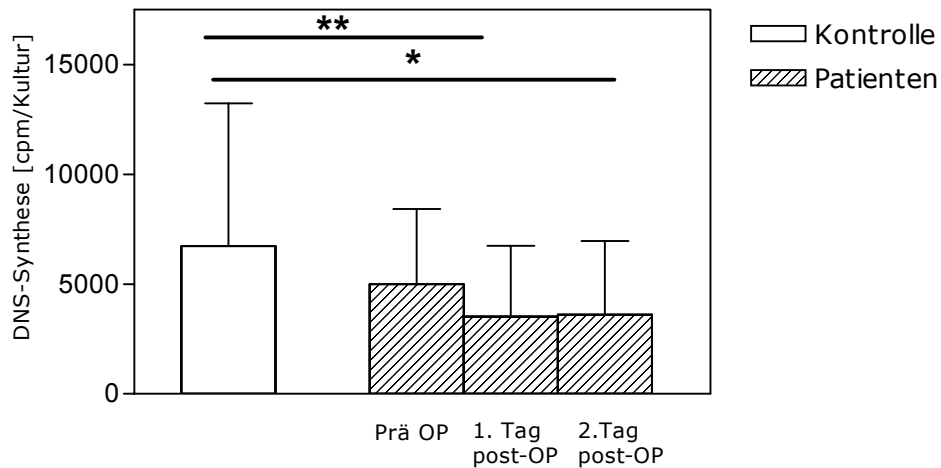


Abbildung 16: Entwicklung der LPS Stimulierbarkeit der Patienten im Vergleich zu den Referenzwerten der Kontrollgruppe. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der Stimulierbarkeit der Patienten sowohl am ersten als auch am zweiten postoperativen Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe. (**p= 0,02 für den ersten postoperativen Tag und *p= 0,048 für den zweiten postoperativen Tag.)

Die Stimulation der mononukleären Zellen mit Recall-Antigenen zeigt in der Anwendung von Tetanus-Toxoid (TT) sowie dem Tuberkulinderivat PPD ähnliche Ergebnisse. Es wurde beobachtet, dass die DNS-Synthese bei den mit Tetanus Toxin und PPD stimulierten Kulturansätzen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert war, wobei es keinen Unterschied zwischen den Patientengruppen gab. Diese reduzierte Ansprechbarkeit auf die Recall-Antigene zeigte sich schon am präoperativen Tag bei unseren Patienten (Abbildung 17 und 18).

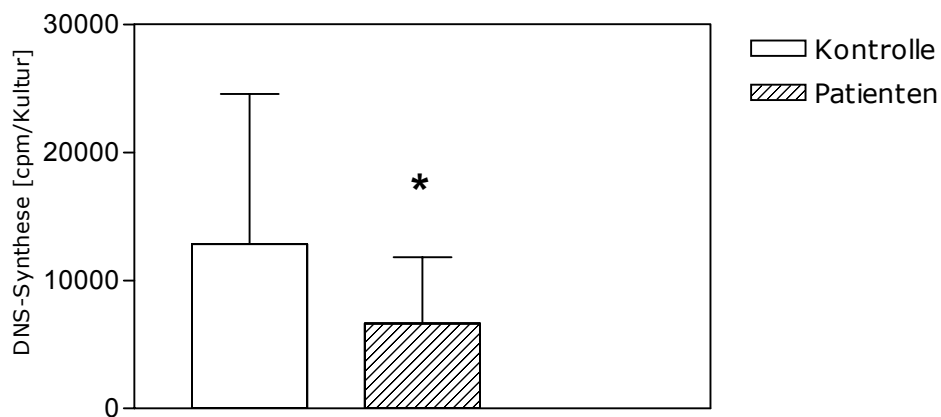


Abbildung 17: Vergleich der präoperativen TT Stimulationsfähigkeit der Patienten und derer der Kontrollgruppe. Es zeigt sich bereits präoperativ eine signifikant (*p= 0,01) erniedrigte Stimulationsfähigkeit der Patienten.

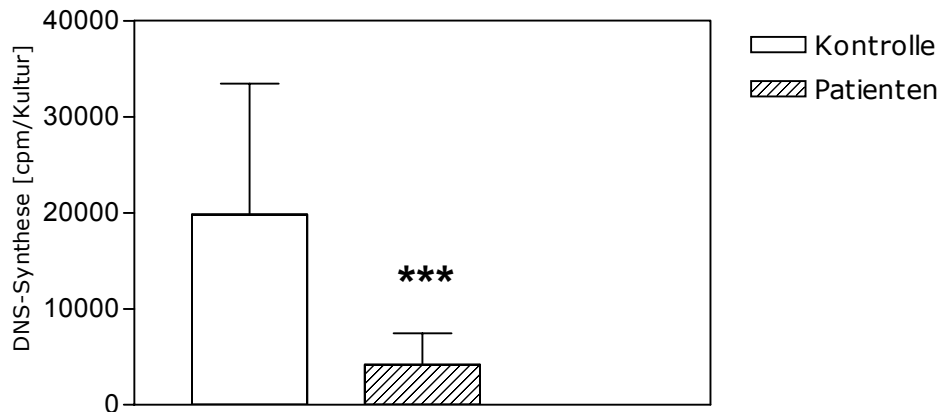


Abbildung 18: Vergleich der präoperativen PPD Stimulationsfähigkeit der Patienten und derer der Kontrollgruppe. Es zeigt sich bereits präoperativ eine hochsignifikant (***) erniedrigte Stimulationsfähigkeit der Patienten.

Die nachfolgenden Grafiken 19 und 20 zeigen den Verlauf der Proliferation mit Recall Antigen der gesamten Spender. Auch hier kam es zu der bereits oben erwähnten individuellen Streuung der Stimulierbarkeit unter den Patienten. Dennoch zeigte sich insgesamt eine deutliche Abnahme der T-Zellproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe.

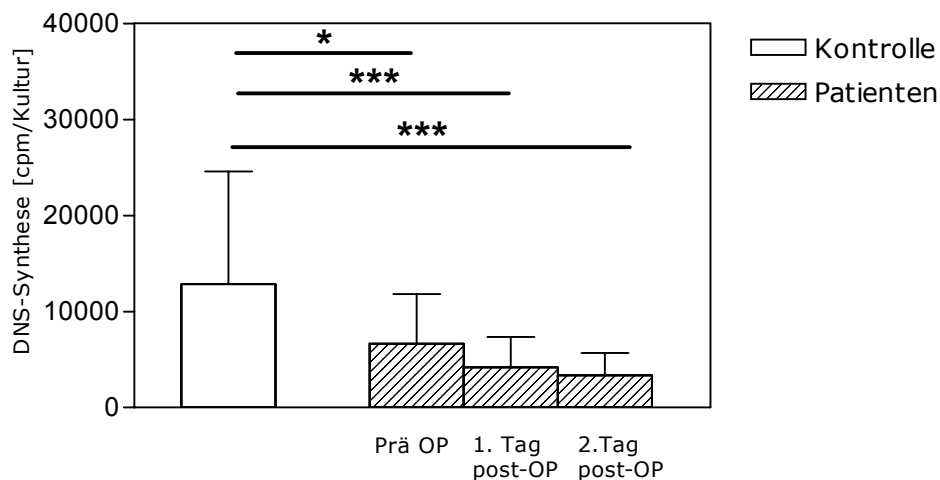


Abbildung 19: Entwicklung der TT Stimulierbarkeit der Patienten im Vergleich zu den Referenzwerten der Kontrollgruppe. Es zeigt sich bereits präoperativ eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant (* $p = 0,01$) erniedrigte Stimulationsfähigkeit. Am ersten und zweiten postoperativen Tag reduzierte sich diese im Vergleich zur Kontrollgruppe weiter hochsignifikant. (***) $p < 0,001$)

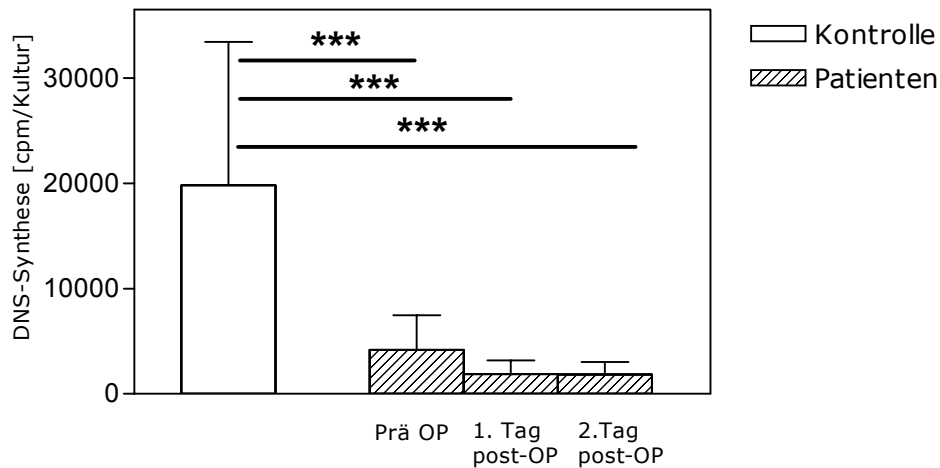


Abbildung 20: Entwicklung der PPD Stimulierbarkeit der Patienten im Vergleich zu den Referenzwerten der Kontrollgruppe. Es zeigt sich bereits präoperativ eine im Vergleich zur Kontrollgruppe hochsignifikant (***) erniedrigte Stimulationsfähigkeit. Am ersten und zweiten postoperativen Tag reduzierte sich diese im Vergleich zur Kontrollgruppe weiter hochsignifikant. (***) $p < 0,001$)

3.2.3 CD14 und HLA-DR-Expression auf Monozyten

CD14 ist ein in der Literatur gut beschriebener LPS-Rezeptor auf Monozyten und spielt eine wichtige Rolle bei der LPS-induzierten T-Zell Proliferation.

Daher haben wir die CD14-Expression der Monozyten bei 6 Fraktur Patienten vor und nach mittelschweren chirurgischen Eingriffen mit denen von 10 gesunden freiwilligen Probanden verglichen. Wie schon bei den anderen Untersuchungen gab es auch hier keine signifikanten Alters- und Geschlechtsunterschiede (nicht dargestellt). Die Monozyten wurden durch ihre Vorwärts-Seitwärtsstreuung eingegrenzt. Am präoperativen Tag konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen der Anzahl der CD14-positiven Monozyten bei der Kontrollgruppe und der der Patientengruppe feststellen. ($p = 0,2$ Abbildung 21)

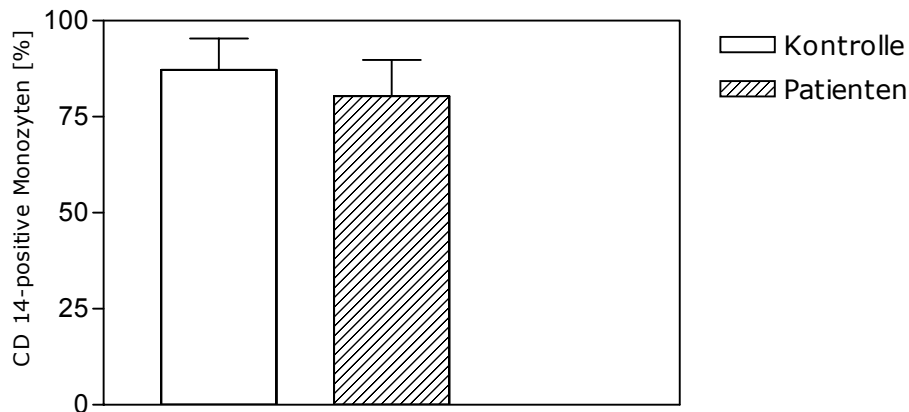


Abbildung 21: Darstellung der Anzahl der präoperativen CD14-positiven Monozyten der Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied.

Am ersten postoperativen Tag zeigte sich jedoch eine signifikante Abnahme ($p= 0,002$) der CD14-Expression im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe. Am zweiten postoperativen Tag fanden sich die Werte wieder auf einem präoperativen Niveau ein und unterschieden sich somit nicht signifikant von der Kontrollgruppe ($p= 0,19$).

Die folgende Abbildung 22 zeigt den Verlauf der CD 14-positiven Monozyten während der Studie.

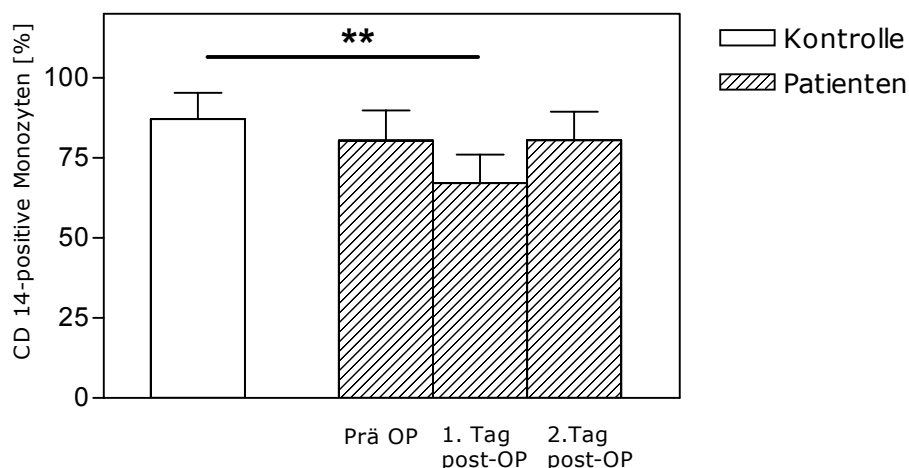


Abbildung 22: Verlauf der CD14-positiven Monozyten der Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Präoperativ konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Am ersten postoperativen Tag kam es jedoch zu einer signifikanten (** $p= 0,002$) Abnahme der Anzahl CD14 positiver Monozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Am zweiten postoperativen Tag liess sich kein Unterschied mehr feststellen.

In mehreren Studien zeigte sich, dass es nach großen schwerwiegenden chirurgischen Eingriffen zu einer verminderten HLA-DR-Expression auf Monozyten kommt. Es wurde in unseren Untersuchungen versucht festzustellen, ob auch mittelschwere chirurgische Eingriffe zu einem Rückgang der HLA-DR-Expression führen.

In unserer Studie konnten wir allerdings keine signifikanten Unterschiede der HLA-DR-Expression an den präoperativen bzw postoperativen Tagen, und derjenigen der Kontrollgruppe feststellen.

Die folgende Abbildung 23 zeigt den Vergleich der präoperativen Werte der HLA-DR-Expression unserer Patienten mit den Werten der HLA-DR-Expression der Kontrollgruppe ($p=0,11$).

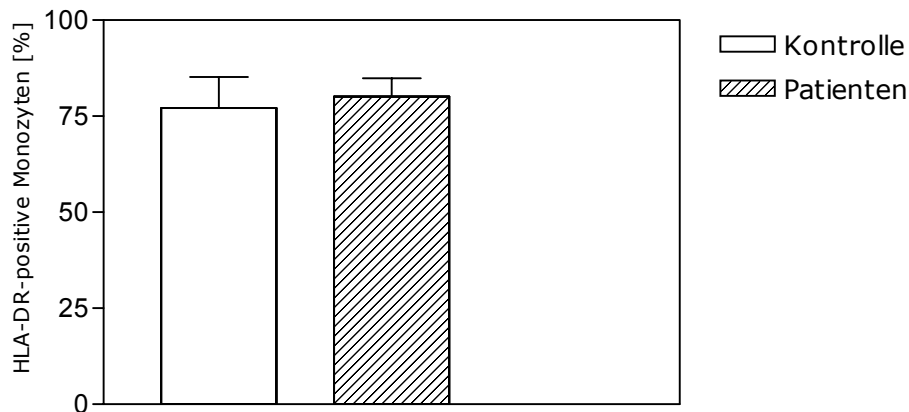


Abbildung 23: Darstellung der Anzahl der präoperativen HLA-DR Expression auf Monozyten der Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied.

In der Abbildung 24 wird der Verlauf der HLA-DR-Expression im Zeitraum der Studie dargestellt. Diese zeigt deutlich, dass wir im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikativen Rückgang der genannten Expression feststellen konnten (1.post OP: $p=0,66$, 2.Post OP: $p=0,15$)



Abbildung 24: Verlauf der HLA-DR Expression auf Monozyten der Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es zeigte sich an keinem Tag des Beobachtungszeitraumes ein signifikanter Unterschied.

Während der FACS Analysen wurde routinemäßig die Anzahl der Monozyten innerhalb der mononukleären Zellen mitbestimmt. Die nachfolgende Abbildung 25 zeigt eine solche Bestimmung der Monozyten innerhalb der mononukleären Zellen. Der eingegrenzte Bezirk innerhalb der Grafik stellt den Anteil der Monozyten dar.

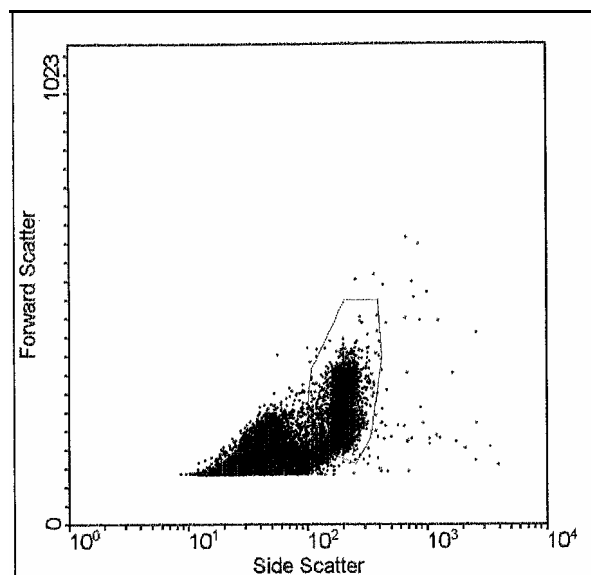


Abbildung 25: Darstellung der Monozyten in der FACS Analyse. Der eingegrenzte Bezirk stellt den Anteil der Monozyten innerhalb der mononukleären Zellen dar.

Beim Vergleich der präoperativen Werte der Monozytenkonzentration mit denen der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p= 0,8$), was in der Abbildung 26 gezeigt wird.

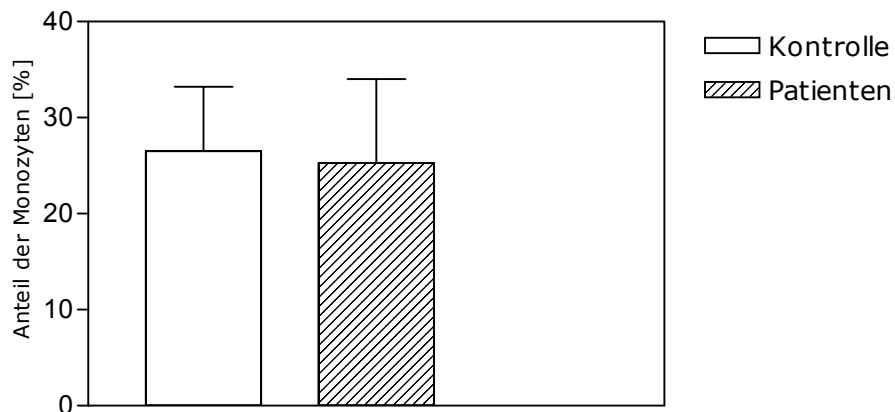


Abbildung 26: Darstellung des Anteils der Monozyten innerhalb der mononukleären Zellen am präoperativen Tag der Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Am ersten postoperativen Tag kam es zu einer hoch signifikanten Reduktion ($p < 0,001$) der Monozyten auf ein Drittel der Ausgangswerte. Obwohl es am zweiten postoperativen Tag zu einer Zunahme der Monozyten kam, war immer noch eine signifikante Verminderung ($p= 0,024$) des prozentualen Anteils der Monozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden (Abbildung 27).

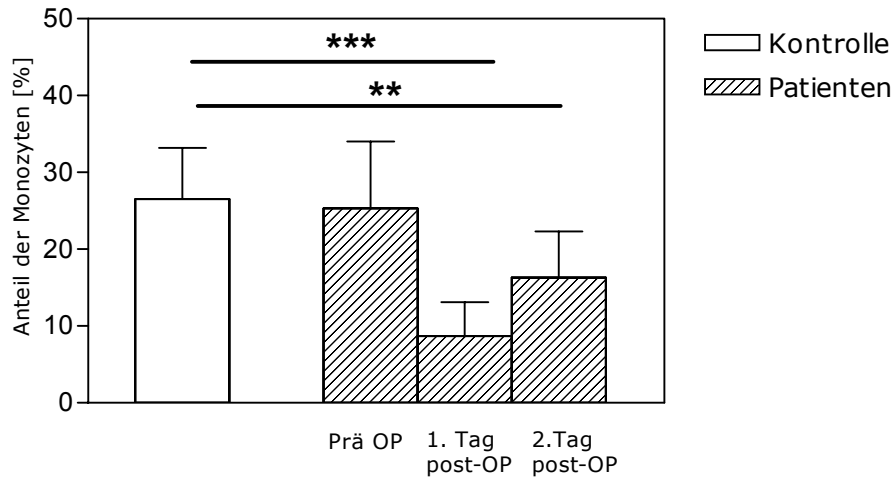


Abbildung 27: Verlauf der Monozyten innerhalb der mononukleären Zellen der Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Präoperativ konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Am ersten postoperativen Tag kam es jedoch zu einer hochsignifikanten (***) Abnahme des Monozytenanteils im Vergleich zur Kontrollgruppe. Am zweiten postoperativen Tag war der Anteil der Monozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls signifikant (** $p = 0,024$) erniedrigt.

4 Diskussion

Zahlreiche experimentelle Studien der letzten Jahre haben ergeben, dass es nach schwerem Trauma zu einer Suppression des Immunsystems kommt. Ebenfalls lange bekannt ist, dass Endotoxine Gram-negativer Bakterien für die pathophysiologischen Reaktionen bei einer Sepsis mitverantwortlich sind, was sich in einer verringerten T-Lymphozyten Proliferation zeigt. In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob auch mittelschwere Traumata zu einer solchen Immunmodulation führen können.

4.1 Einfluss von mittelschwerem Trauma auf die Spontanproliferation der MNZ

In dieser Studie wurden drei unstimulierte Zellansätze als Kontrolle der Spontanproliferation mitgeführt. Auffällig war, dass bei dem Patientenkollektiv schon präoperativ eine signifikant erhöhte Spontanproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe gesunder Spender vorlag ($p < 0,001$).

Adamik et al. konnten in ihren Studien mit schwerverletzten Patienten eine vergleichbar erhöhte Spontanproliferation der MNZ zeigen. Da im Vergleich zwischen Traumapatienten, septischen überlebenden Patienten und septischen nicht-überlebenden Patienten die Spontanproliferation der MNZ der septischen nicht-überlebenden Patienten die der anderen Gruppen um ein Vielfaches übertraf, wurde eine erhöhte Spontanproliferation der MNZ als ein schlechtes prognostisches Zeichen gewertet².

Eine weitere Studie untersuchte Patienten, die überwiegend gastrointestinale Operationen hinter sich hatten, also keine Unfalltraumapatienten waren. Hier liess sich bei den nicht-infektiösen Patienten eine doppelt so hohe Spontanproliferation von Lymphozyten finden wie bei der Kontrollgruppe⁶⁵. Eine erhöhte Spontanproliferation der MNZ zeigte sich zudem bei Infektionen, sowohl viraler⁴⁶, als auch bakterieller Art²⁹. Auch Autoimmundefekte⁷²⁻⁸⁻⁶⁻²³

und maligne Lymphome oder andere Tumoren³³ führen zu einer erhöhten Spontanproliferation der T-Zellen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Verletzungen, Defekte oder Infekte, die mit einer Aktivierung des Immunsystems oder einem Eingriff in "Steuerzentren" wie das Knochenmark einhergehen, eine erhöhte spontane DNS-Synthese zur Folge haben. Eine erhöhte Spontanproliferation lässt sich also als ein Charakteristikum von Eingriffen in die Körperintegrität benennen. Möglicherweise reflektiert diese Verstärkung der Proliferation *in vitro* eine erhöhte Lymphozyten-Aktivierung *in vivo*.

Bei weiteren Unterteilungen der Patienten in eine Traumagruppe und in eine Gruppe von Patienten, die elektiv zur Metallentfernung ins Krankenhaus kamen, zeigte sich, dass bei letzterer Gruppe eine erhöhte Spontanproliferation im Vergleich zur Frakturgruppe vorlag. Hierbei handelte es sich allerdings um keinen signifikanten Unterschied und im weiteren postoperativen Verhalten zeigten sich keine weiteren Besonderheiten. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Spontanproliferation in dieser Gruppe ist, dass es durch den eingebrachten Fremdkörper zu einer Unausgewogenheit unter den Kontrollmechanismen des Immunsystems kommt. Es ist bekannt, dass es bei Stahlimplantaten zu einer Korrosion an der Oberfläche des Implantates und zu Abschilferung kleiner Stahlpartikel kommt. Obwohl die zelluläre Reaktion auf die Stahlpartikel als mild gewertet wird⁷⁰, könnte sie mit zu einer leichten Erhöhung der Spontanproliferation im Vergleich zur Frakturgruppe beitragen. Ob es bei einem Titanimplantat, welches als besondere Eigenschaft die gute Oberflächen-Repassivierung hat und daher eine geringe Korrosion erfolgt, zu einem anderen Ergebniss kommen würde, könnte Bestandteil weiterführender Untersuchungen sein.

Nach der Operation nahm bei beiden untersuchten Patientengruppen die Spontanproliferation wieder ab, bis sie am zweiten postoperativen Tag fast wieder Normalwerte erreichte. Bei allen untersuchten Patienten war ein unkomplizierter Verlauf im Beobachtungszeitraum der Studie (erster und zweiter postoperativer Tag) zu verzeichnen; korrespondierend hiermit nahm auch die Spontanproliferation der MNZ ab. Es liegt nahe, diese Beobachtungen

als Wiederherstellung der Balance im Immunsystem durch eine operative Verminderung der Verletzung des Knochenmarks – Zentrum der Hämatopoese zu deuten.

4.2 Einfluss von mittelschwerem Trauma auf die Proliferation der MNZ nach Stimulation mit LPS, TT oder PPD

Trauma und operativer Stress sind bekannt als Induktoren verminderter Aktivität des Immunsystems, was im Extremfall zu einer Anergie der T-Lymphozyten und damit zu einem erhöhten Risiko von Infektionen führen kann ^{15·14·39·54·47}.

In den Kulturansätzen, die mit dem Endotoxin LPS stimuliert wurden, zeigte sich, dass die Proliferation der T-Lymphozyten der Frakturpatienten zu jedem Zeitpunkt geringer war als die Proliferation der T-Zellen der gesunden Kontrollgruppe. Die Patienten, die zur Metallentfernung ins Krankenhaus kamen, zeigten eine im Vergleich zur Kontrollgruppe normale LPS-Stimulationsfähigkeit am präoperativen Tag. Sowohl in der Patientengruppe als auch in der Kontrollgruppe kam es zu starken individuellen Streuungen der LPS-Stimulierbarkeit.

In der Gesamtdarstellung aller Patienten zeigte sich jedoch eine deutlich verminderte Proliferation der T-Lymphozyten, die am ersten postoperativen Tag deutlich unter den Werten der Kontrollgruppe lag ($p < 0,001$), und am zweiten postoperativen Tag wieder anstieg, aber im Vergleich zur Kontrollgruppe noch signifikant erniedrigt war ($p = 0,048$).

Auch auf die beiden zur Stimulation gebrauchten Recall-Antigene Tetanustoxoid (TT) und Tuberkulin (PPD = purified protein derivate) bestand bereits präoperativ eine signifikant reduzierte Ansprechbarkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hier gab es keine Unterschiede zwischen den Patienten mit Metallentfernung und den Frakturpatienten. Ebenso wie die verringerte Proliferation nach LPS-Stimulation war auch die Antwort auf die Recall-Antigene präoperativ signifikant reduziert gegenüber Normalprobanden ($p < 0,001$ für PPD und $p = 0,016$ für TT).

Die Proliferation nach Stimulation mit den Recall-Antigenen Tetanus Toxoid und PPD war im Vergleich zur Kontrollgruppe nach den operativen Eingriffen ebenfalls signifikant reduziert ($p < 0,016$ für TT und $p < 0,001$ für PPD). Im Gegensatz zur Stimulation mit LPS war aber am zweiten Tag nach der Operation noch kein Anstieg der Proliferation zu erkennen.

Die Antwort der Memory-T-Zellen war durch das unfallbedingte Trauma und die nachfolgende Operation also stärker inhibiert als die Antwort derjenigen T-Zellen, die durch LPS aktivierbar waren. Auch die Tatsache, dass die Patienten mit der Metallentfernung präoperativ mit LPS jedoch nicht mit TT und PPD stimulierbar waren, stärkt diesen Erklärungsansatz. Diese Patienten scheinen sich in einer Art Übergangssituation ihrer immunozytären Abwehr zu befinden. Auf der einen Seite zeigen sie eine erhöhte Spontanproliferation, auf der anderen Seite sind sie aber gut durch LPS stimulierbar.

Auch in der Literatur wird beschrieben, dass es nach diversen Traumata (sei es unfallbedingt oder durch operative Eingriffe verursacht), zu einer verminderten Aktivierbarkeit der T-Lymphozyten durch Antigene kommt. Die Schwere des traumatischen Ereignisses bestimmt auch hier, wie lange diese reduzierte Aktivierbarkeit anhält^{62,48,42}.

In der Zusammenfassung lässt sich eine reduzierte Ansprechbarkeit der T-Lymphozyten von verletzten Patienten – sei es Verletzung durch ein akzidentielles Trauma oder ein geplantes Operationstrauma – gegenüber T-Zell-Stimulantien herausbilden.

Möglicherweise ist eine *in vivo* bestehende maximale Stimulation der Lymphozyten der Grund aus dem Stimulantien *in vitro* zu keinem Effekt mehr führen.

4.3 Einfluss von mittelschwerem Trauma auf die Menge der Monozyten im peripheren Blut und ihre CD14-Rezeptor-Expression

CD 14 ist ein in der Literatur gut beschriebener LPS-Rezeptor auf Monozyten und spielt in der LPS-induzierten T-Zellproliferation eine wichtige Rolle. Daher wurde in dieser Arbeit sowohl der Anteil an CD 14-positiven Monozyten, als auch deren Verlauf untersucht. Um Interpretationsfehler bei dem Anteil der CD14-positiven Monozyten im Vergleich zu der absoluten Anzahl der Monozyten zu verhindern, wurde ebenfalls die Gesamtzahl der Monozyten sowie deren Verlauf untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede in der Menge der gesamten peripheren Monozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen am präoperativen Tag festgestellt werden.

Am ersten postoperativen Tag verminderte sich die Menge der gesamten Monozyten allerdings hochsignifikant ($p < 0,001$) auf ein Drittel der Ausgangswerte, wohingegen sie am zweiten postoperativen Tag wieder anstiegen. Die ursprüngliche Anzahl an Monozyten wurde jedoch bis dahin noch nicht wiedererlangt und im Vergleich zur Kontrollgruppe war sie noch signifikant ($p = 0,024$) erniedrigt.

Die Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein. Sie besagt, dass eine der charakteristischen Auffälligkeiten im Immunsystem nach chirurgischem Trauma darin besteht, dass es zu einer Änderung des Vorkommens der verschiedenen mononukleären Zellpopulationen im Blutbild kommt. Dies ist unter anderem ein Hinweis auf Änderungen im hämatopoetischen Kompartiment^{20,21}.

Wie schon in der absoluten Monozytenanzahl konnten wir auch bei der Anzahl der CD14-positiven Monozyten am präoperativen Tag keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe feststellen ($p = 0,2$). Es zeigte sich bei der Messung der CD14-positiven Monozyten am ersten postoperativen Tag eine signifikante Abnahme im Vergleich zu den Werten der

Kontrollgruppe ($p= 0,002$). Am zweiten postoperativen Tag fanden sich die Werte wieder auf einem präoperativen Niveau ein, so dass es keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe gab ($p= 0,19$).

Die in dieser Untersuchung gefundene Reduktion der monozytären CD14-Expression nach einem Trauma stimmt mit anderen experimentellen Studien überein³⁷⁻⁴⁰.

Die Reduktion der CD14-positiven zirkulierenden Monozyten im peripheren Blut der Patienten dieser Untersuchung ist möglicherweise ein Grund für die verminderte T-Zell-Proliferation nach LPS-Stimulation, da CD14 ein wichtiger Baustein für die Transmission des Endotoxinsignals ins Innere der Zelle ist⁷³.

4.4 Einfluss von mittelschwerem Trauma auf die HLA-DR-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten

HLA-DR ist ein Protein des MHC-Klasse II-Komplexes. Seine Expression spielt eine zentrale Rolle in der Antigenpräsentation und der Initiierung der Immunantwort²⁶. Bei schweren Trauma-Patienten ist die monozytäre HLA-DR-Expression vermindert. Eine persistierende verminderte Expression wird mit einem erhöhten Risiko assoziiert, eine schwere Sepsis zu entwickeln^{68-73,36}. Vermutlich führt der Verlust von zelloberflächen-assoziiertem HLA-DR zu einer verminderten Fähigkeit der Monozyten zur Antigenpräsentation. Dies äußert sich in einer beeinträchtigten T-Zell-Stimulation.

In der vorliegenden Arbeit an Patienten mit mittelschwerem Trauma ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der HLA-DR Expression auf Monozyten am präoperativen Tag im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ($p= 0,12$). Auch im postoperativen Verlauf der HLA-DR Expression kam es zu keinen

Veränderungen, weder im Vergleich zu den präoperativen Ausgangswerten, noch im Vergleich zur Kontrollgruppe (1.post OP: $p=0,66$, 2.Post OP: $p=0,15$). Die prozentuelle Reduktion der HLA-DR-Expression erwies sich als stark abhängig im Zeitverlauf und von der Schwere des chirurgischen Eingriffes^{68,36}. Daher lässt sich die nicht gefundene Veränderung in der HLA-DR-Expression in dieser Untersuchung so deuten, dass entweder die Operation weniger belastend für die Funktionen des Immunsystems war, oder die Messung am ersten und zweiten postoperativen Tag vorhergehende transiente Änderungen in der monozytären HLA-DR-Expression verschleiert hat.

Wie bereits erwähnt führt eine Verminderung der HLA-DR-Expression zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems, durch eine verminderte MHC Klasse II-abhängige Antigenpräsentation der APZ und dadurch resultierende verringerte T-Zell-Stimulation.

Die Quantifikation von MHC Klasse II-Molekülen auf murinen APZ ergab, dass eine T-Zell-Aktivierung schon erfolgt, wenn weniger als 0,1% aller oberflächengebundenen MHC Klasse II-Komplexe mit spezifischen Peptiden beladen sind^{17,30}.

Wenngleich eine signifikante Verringerung der HLA-DR-Expression durch schweres Trauma hervorgerufen wird, liegt die Vermutung nahe, dass die Kapazität der zirkulierenden Monozyten zur Antigenpräsentation und T-Zell-Stimulation dadurch nicht beeinträchtigt wird. Die gefundene Konstanz der HLA-DR-Expression im Blut der Patienten dieser Studie, die mit einer reduzierten T-Zell-Proliferation einhergeht, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass reduzierte HLA-DR-Expression auf Monozyten nicht die hauptsächliche Ursache für eine verminderte Ansprechbarkeit der T-Zellen auf Proliferationsreize darstellt.

Abschließend lässt sich sagen, dass auch ein mittelschweres Trauma zu einer Homöostasestörung im humanen Immunsystem führt, wenn auch nicht alle hier untersuchten immunologischen Funktionen gleich stark und gleich lang betroffen sind. Anscheinend gibt es unterschiedlich sensitive Parameter zur Statusaufklärung des Immunsystems.

5 Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit basiert auf Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass es bei Patienten mit schweren Traumata zu einer allgemeinen Immunsuppression kommt. Diese zeigte sich unter anderem auch in einer verminderten Stimulierbarkeit der T-Lymphozyten durch Lipopolysaccharid, welche mit einem erhöhten Risiko einer Sepsis assoziiert wird.

Deshalb wurden bei verschiedenen Unfallchirurgischen Patienten mit mittelschwerem Trauma untersucht, ob sich auch hier die T-Lymphozytenproliferation verändert. Dazu wurden 20 Patienten in die Studie eingeschlossen und die Werte mit denen einer vergleichbaren Kontrollgruppe verglichen.

Es wurden mononukleäre Zellen für 7 Tage mit Lipopolysaccharid, Tetanus Toxoid und purified protein derivatives of Mycobacterium tuberculosis (PPD) stimuliert. Die Desoxyribonukleinsäure (DNS) -Synthese wurde durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin ($[^3\text{H}]\text{TdR}$) bestimmt. Zur Phänotypisierung der mononukleären Zellen wurden diese mit monoklonalen Antikörpern markiert und in einem FACStar Flow Cytometer analysiert. Die relative Monozytenanzahl wurde bestimmt und der prozentuale Anteil der durch die Antikörper markierten Zellen ermittelt.

Es zeigte sich, dass die Spontanproliferation der Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war. Dagegen war die Lipopolysaccharid-induzierte T-Lymphozytenproliferation bereits am präoperativen Tag reduziert. Diese verringerte sich hochsignifikant am ersten postoperativen Tag und war noch am zweiten Tag signifikant verringert. Die Untersuchungen mit Tetanus Toxoid und PPD ergaben, dass auch hier bereits präoperativ eine hochsignifikant verringerte Stimulationsfähigkeit vorlag, die im Verlauf des Beobachtungszeitraums noch weiter abnahm. Im Vergleich der CD14-positiven Monozyten fand sich ein am ersten postoperativen Tag verminderter Anteil, währenddessen es bei den HLA-DR positiven Monozyten zu keinem Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe kam.

Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass auch schon bei einem mittelschweren Trauma die T-Lymphozyten-vermittelte Immunantwort signifikant reduziert ist. Die Gefahr septischer Komplikationen ist also auch bei dieser Patientengruppe nicht auszuschließen und im klinischen Alltag werden die Patienten auch entsprechend beobachtet.

6 Literaturverzeichnis

1. Acha-Orbea, H., Held W., Waanders, G. A., Shakov, A. N., Scarpellino, L., Lees, R. K., MacDonald, H. R. (1993): Exogenous and endogenous mouse mammary tumor virus superantigens. *Immunol. Rev.* 131, 5-25.
2. Adamik, B., Zimecke, M., Wlaszczyk, A., Kübler, A. (1997): Immunological status of septic and trauma patients. II. Proliferative response and production of IL-6 and TNF- α by peripheral blood mononuclear cells from septic survivor, nonsurvivor and trauma patients: a correlation with the survival rate. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 45, 277-284.
3. Allison, J. P. (1994): CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 6, 414-419.
4. Asadullah, K., Woiciechowsky, C., Döcke, W. D. (1995): Very low monocyctic HLA-DR expression indicates high risk of infection - immunomonitoring for patients after neurosurgery and patients during high dose steroid therapy. *Eur J Emerg Med* 2, 184-190.
5. Asadullah, K., Woiciechowsky, C., Doecke, W. D., et.al. (1995): Immunodepression following neurosurgical procedures. *Crit Care Med* 23, 1976-1983.
6. Bacon, P. A., Sewell, T. L., Crowther, D. (1975): Reactive lymphoid cells in autoimmune and haematological disorders. *Clin Exp Immunol* 19, 201-208.
7. Baker, C. C., Oppenheimer, L., Stephens, B. (1980): Epidemiology of trauma deaths. *Am J Surg* 140, 144-150.
8. Biberfeldt, P., Hedfords, E. (1974): Atypical blood lymphocytes in sarcoidosis: morphology, cytochemistry and membrane properties. *Scand J Immunol* 3, 615.
9. Bjornson, A. B., Altemaier, W. A., Bjornson, H. S. (1978): Host defense against opportunistic micro-organisms following trauma: 1. studies to determine the association between changes to humoral components of host defense and septicemia in burned patients. *Ann Surg* 188, 93-101.
10. Cavaillon, J. M., Haeffner-Cavaillon, N. (1990): Signals involved in interleukin 1 synthesis and release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes/macrophages. *Cytokine* 2, 313-329.
11. Cavaillon, J. M., Haeffner-Cavaillon, N., Kirsch, S. J., Warren, H. S. (1990): Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infect Immunol* 58, 2375-2382.

12. Cella, M., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1997): Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9, 10-16.
13. Cheadle, W. G., Hershman, M. F., Wellhausen, S. R., Polk, H. C. J. (1991): HLA-DR antigen expression on peripheral blood monocytes correlates with surgical infection. *Am J Surg* 161, 639-645.
14. Christou, N., Meakins, J. (1979): Delayed hypersensitivity in surgical patients: a mechanism for anergy. *Surgery* 86, 78-85.
15. Christou, N., Meakins, J. (1979): Neutrophil function in surgical patients: two inhibitors of granulocyte chemotaxis associated with sepsis. *J. Sur. Res.* 26, 355-364.
16. DeCamp, M. M., Demling, R. H. (1988): Posttraumatic multisystem organ failure. *JAMA* 260, 530-534.
17. Demotz, S. H., Grey, M., Sette, A. (1990): The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 249, 1028-1030.
18. Döcke, W. D., Randow, F., Syrbe, U. (1997): Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN- γ treatment. *Nat Med* 3, 678-681.
19. Faist, E. (1995): Der Einfluß der ausgedehnten operativen Intervention auf die zellvermittelte Immunantwort. *Gynäkologe* 28, 72-83.
20. Faist, E. (1996): The mechanisms of host defense dysfunction following shock and trauma. *Curr Top Microbial Immunol* 216, 259-274.
21. Faist, E., Schinkel, C., Zimmer, S. (1996): Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World J Surg* 20, 454-459.
22. Ferrero, E., Jiao, D., Tsuberi, B. Z., et al. (1993): Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 2380-2384.
23. Fraser, K. B., Haire, M., Millar, J. H. D., McCrea, S. (1979): Increased tendency to spontaneous in vitro lymphocyte transformation in clinically active multiple sclerosis. *Lancet* 3, 175-176.
24. Germain R.N. (1994): MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76, 287-299.
25. Gery, I., Krüger, J., Spiesel, S. Z. (1972): Stimulation of B-lymphocytes by endotoxin. *J Immunol* 108, 1088-1091.
26. Gonwa, T. A., Picker, L. J., Raff, H. V. (1983): Antigen-presenting capabilities of human monocytes correlates with their expression of

- HLA-DS, an Ia determinant distinct from HLA-DR. *J Immunol* 130, 706-711.
27. Goodier, M. R., Londei, M. (2000): Lipopolysaccharide stimulates the proliferation of human CD56⁺CD3⁻ NK cells: A regulatory role of monocytes and IL-10. *J Immunol* 165, 139-147.
 28. Goris, J. A., Boeckhorst te, T. P. A., Nuytinck, J. K. S., Wimbrere, J. S. F. (1985): Multiple organ failure. Generalized autodestructive inflammation. *Arch Surg* 120, 1109-1115.
 29. Gump, D. V., Fekety, F. R. (1967): The relationship of infection and DNA-synthesizing cells in human blood. *J Lab Clin med* 69, 428-437.
 30. Harding, C. V., Unanue, E. R. (1990): Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T cell stimulation. *Nature* 346, 574-576.
 31. Haziot, A., Ferrero, E., Kontgen, F., et al. (1996): Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 4, 407-414.
 32. Heeg K., Miethke T., Wagner H. (1996): Superantigen-mediated lethal shock: the functional state of ligand-reactive T cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 216, 83-100.
 33. Heier, H. E., Godal, T. (1977): DNA-synthesis in unstimulated blood lymphocytes of patients with untreated malignant lymphomas or other malignant tumours. *Scand J Haematol* 18, 149-153.
 34. Herman A., Kappler J.M., Marrack P., Pullen A.M. (1991): Superantigens: mechanisms of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 745-772.
 35. Hermann T., MacDonald H.R. (1991): T cell recognition of superantigens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 174, 21-38.
 36. Hershman, M. F., Cheadle, W. G., Wellhausen, S. R. (1990): Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in trauma patient. *Br J Surg* 77, 204-207.
 37. Hiesmayr, M. J., Spittler, A., Lassnigg, A., Berger, R., Laufer, G., Kocher, A., Artemiou, O., Boltz-Nitulescu, G., Roth, E. (1999): Alterations in the number of circulating leucocytes, phenotype of monocyte and cytokine production in patients undergoing cardiothoracic surgery. *Clin. Exp. Immunol.* 115, 315-323.
 38. Hof, H., Müller, L., Dörries, R. (2000): *Mikrobiologie. Duale Reihe;* Stuttgart: Thieme, 42.

39. Howard, R., Simmons, R. (1974): Acquired immunologic deficiencies after trauma and surgical procedures. *Surg Gynecol Obstet.* 139, 772-782.
40. Kawasaki, T., Ogata, M., Kawasaki, C., Tomihisa, T., Okamoto, K., Shigematsu, A. (2001): Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. *Anesth. Analg.* 92, 1322-1326.
41. Keane, R. M., Birmingham, W., Shatney, C. M., et al. (1983): Prediction of sepsis in the multitraumatic patients by assays of lymphocyte dysfunction. *Surg Gynecol Obstet* 156, 163-167.
42. Kehlet, H., Thomsen, M., Kjaer, M., Platz, P. (1977): Postoperative depression of lymphocyte transformation response to microbial antigens. *Br J Surg* 64(12), 890-893.
43. Lennard, T. W. J., Shenton, B. K., Borzotta, A. (1985): The influence of surgical operations on components of the human immune system. *Br J Surg* 72, 771-776.
44. Lewis, F. R., Krupski, W. C., Trunkey, D. D. (1988): Management of the injured patient., 187-209.
45. Loppnow, H., Libby, P. (1989): Adult human vascular endothelial cells express the IL-6 gene differently in response to LPS and IL-1. *Cell Immunol* 122, 493-503.
46. MacKinney, A. A. (1965): Tissue culture of cells already in DNA-synthesis from patients with infectious mononucleosis. *Blood* 26, 36-48.
47. MacLean, L. (1979): Host resistance in surgical patients. *J Trauma.* 19, 297-304.
48. Manjuck, J., Saha, DC., Astiz, M., Eales, LJ., Rackow, EC. (2000): Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. *J Lab Clin Med* 135, 153-160.
49. Mannick, J. A., Rodrick, M. L., Lederer, J. A. (2001): The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 193, 237-242.
50. Mattern, T., Flad, H.-D., Brade, H., Rietschel, E. Th., Ulmer, A. J. (1998): Stimulation of human t lymphocytes by LPS is MHC unrestricted, but strongly dependent on B7 interactions. *J. Immunol.* 160, 3412-3418.
51. Mattern, T., Girroleit, G., Flad, H.-D., Rietschel, E. Th., Ulmer, A. J. (1999): CD34⁺ hematopoietic stem cells exert accessory function in lipopolysaccharide-induced T cell stimulation and CD 80 expression on monocytes. *J. Exp. Med.* 189 (4), 693-700.

52. Mattern, T., Tanhäuser, A., Reiling, N., Toellner, K.-M., Duchrow, M., Kusumoto, S., Rietschel, E. Th., Ernst, M., Brade, H., Flad, H.-D., Ulmer, A. J. (1994): Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes. *J. Immunol.* 153, 2996-3004.
53. Meakins, J., McLean, A. P. H., Kelly, R., et al. (1978): Delayed hypersensitivity and neutrophil chemotaxis: Effect of trauma. *J Trauma* 18, 240-247.
54. Meakins, J., Pietsch, J., Bubenick, O., Kelly, R., Rode, H., Gordon, J., MacLean, L. D. (1977): Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Ann. Surg.* 186, 241-250.
55. Milner, E. C., Rudbach, J. A., VonEschen, K. B. (1983): Cellular responses to bacterial lipopolysaccharide: T cells recognize LPS determinants. *Scand. J. Immunol* 18, 21-28.
56. Moore, F. A., Moore, E. E. (1995): Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am.* 75, 257-277.
57. Nast-Kolb, D., Aufmkolk, M., Rucholtz, S., Obertacke, U., Waydhas, C. (2001): Multiple organ failure still a major cause of morbidity but no mortality in blunt multiple trauma. *J Trauma* 51, 835-841.
58. O'Mahony, J. B., Palder, S. B., Wood, J. J., McIrvine, A., Rodrick, M. L., Demling, R. H., Mannick, J. A. (1984): Depression of cellular immunity after multiple trauma in the absence of sepsis. *J Trauma* 24, 869-875.
59. Rangel-Frausto, M. S., Pittet, D., Costigan, M., Hwang, T., Davis, C. S., Wenzel, R. P. (1995): The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *JAMA* 273, 117-123.
60. Reece J.C., Geysen H.M., Rodda S.J. (1993): Mapping the major human T helper epitopes of tetanus toxin. The emerging picture. *J Immunol* 151, 6175-6184.
61. Rietschel E.Th., Brade, H. (1992): Bacterial endotoxins. *Sci Am* 267, 54-61.
62. Salo, M., Merikanto, J., Eskola, J., Nieminen S., Aho, A. J. (1979): Impaired lymphocyte transformation after accidental trauma. *Acta Chir Scand* 145, 367-372.
63. Schade, F. U., Burmeister, I., Engel, R. (1987): Increased 13-hydroxyoctadecadienoic acid content in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 147, 695-700.

64. Sieling, P. A., Chatterjee, D., Porcelli, S., Prigozy, T. I., Mazzaccaro, R. J., Soriano, T., Bloom, B. R., Brenner, M. B., Kronenberg, M., Brennan, P. J., et al. (1995): CD 1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 269, 227-230.
65. Soop, M., Soop, A., Sundqvist, K. G. (1998): Spontaneous lymphocyte proliferation during trauma and infection. *Scan J Immunol* 28, 659-665.
66. Volk, H. D., Reinke, P., Krausch, D., et al. (1996): Monocyte deactivation: rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med* 22, 474-481.
67. Volk, H. D., Thieme, M., Heym, C. (1991): Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease - predictive value and new therapeutic strategies. *Bering Inst Mitt* 88, 208-215.
68. Wakefield, C. H., Carey, P. D., Foulds, S. (1993): Changes in major histocompatibility complex class 2 expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg* 80, 205-209.
69. Wang, B. S., Haecock, E. H., Wu, W. V. O., et al. (1980): Generation of suppressor cells in mice after surgical trauma. *J Clin Invest* 66, 200-209.
70. Willert, H. G., Buchhorn, G. H., Gobel, D., Schaffner, S., Schenk, S., Semlitsch, M. (1996): Wear behavior and histopathology of classic cemented metal on metal hip endoprotheses. *Clin Orthop* 329, 160-186.
71. Woiciechowsky, C., Asadullah, K., Nestler, D. (1998): Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med* 4, 808-813.
72. Yano, K., Morimasa, K., Asano, T., Shinohara, Y., Ota, Z. (1985): Characterization of spontaneous DNA synthesizing and/or IgG-secreting cells in peripheral blood from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 35, 57.
73. Ziegler-Heitbrock, H. W., Ulevitch, R. J. (1993): CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 14, 121-125.
74. Zubler, R. H., Werner-Favre, C., Wen, L., Sekita, K., Straub, C. (1987): Theoretical and practical aspects of B-cell activation: murine and human systems. *Immunol Rev* 99, 281-299.

7 Danksagung

Für seine exzellente Betreuung und Förderung möchte ich mich bei Professor Christian Waydhas bedanken.

Ohne die Anleitung und Förderung von Frau PD Dr. Taila Mattern, ihrer Diskussions- und Hilfsbereitschaft zu jedem Zeitpunkt, wäre die Arbeit so nicht zustande gekommen. Dafür bin ich ihr sehr dankbar.

Professor Ullrich Schade danke ich für seine ruhige und unterstützende Art im Labor.

Bei Herrn Professor Grosse-Wilde möchte ich mich für die freundliche Bereitstellung des β -Counters bedanken.

Ich danke Marion Frisch und allen anderen Mitarbeitern im Labor für ihre Unterstützung und für die freundliche Atmosphäre.

Ein großes Dankeschön geht an meine Freunde, die mich die ganze Zeit unterstützt und ermuntert haben.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern und meinen Schwestern Imke und Anna danken, die mir während des Studiums und der Doktorarbeit immer mit Rat und konstruktiver Kritik zur Seite standen. Ohne deren Hilfe und Ermunterung wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

8 Lebenslauf

ANGABEN ZUR PERSON

Name: Jan Hinnerk Reeßing
Geburtsdatum: 07.07.1976
Geburtsort: Köln
Wohnort: Essen
Familienstand: ledig
Konfession: evangelisch

SCHULAUSBILDUNG

1982 - 1986 Grundschole Lilienthal
1986 – 1988 Orientierungsstufe Lilienthal
1988 Gymnasium Lilienthal
1988 – 1995 Städt. Gymnasium Broich
1995 Abitur

ZIVILDIENTST

1995 – 1996 Johanniter Unfallhilfe, Ausbildung zum Rettungssanitäter

STUDIUM

10/96 – 05/03 Studium der Humanmedizin
10/96 – 05/99 Vorklinisches Studium, Ruhr-Universität Bochum
05/99 – 05/03 Klinisches Studium, Gesamthochschule Essen

EXAMINA

04/1998 Physikum
04/2000 1. Staatsexamen
04/2002 2. Staatsexamen
05/2003 3. Staatsexamen

PRAKTISCHES JAHR

Innere Medizin	Hospital Universitario de San Juan, Alicante, Spanien
Chirurgie	Hospital Universitario de San Juan, Alicante, Spanien
Anästhesie	Universitätsklinikum Essen

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

1994 – 1997	Extrawachen auf Stationen des Westdeutschen Tumorzentrums der Universität Essen
WS 1998/1999	studentischer Tutor des Präparierkurses WS98/99
1997 – 2000	Extrawachen auf der unfallchirurgischen Intensivstation des Universitätsklinikums Essen

AUSLANDSAUFENTHALTE

07/1992 – 06/1993	South Terrebonne High School, Houma, Louisiana, USA mit High School Abschluss
10/2000 – 07/2001	Studium an der Universidad Miguel Hernandez de Elche, Spanien
04/2002 – 08/2002	Hospital Universitario de San Juan, Spanien (Innere Medizin)
08/2002 – 12/2002	Hospital Universitario de San Juan, Spanien (Chirurgie)

BERUF

Juni 2003	Arzt im Praktikum in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin am Universitätsklinikum Essen
-----------	--