

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K.-W. Jauch

**Ex-vivo Effekte von Gerinnungsinhibitoren auf die zelluläre
Immunfunktion nach Trauma**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Manuel Burggraf
aus
Forchheim

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Eugen Faist
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Stefan Holdenrieder Prof. Dr. Ekkehard Euler
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. H. Trentzsch Dr. rer. biol. hum. S. Zedler
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	24.05.2012

Meinen Eltern

- Inhalt -

1	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	Einführung	- 1 -
1.2	Grundlagen der humanen Immunfunktion	- 3 -
1.2.1	Das Immunsystem	- 3 -
1.2.2	Die Zellen des Immunsystems	- 4 -
1.2.3	Leukozytäre Oberflächenmarker	- 5 -
1.2.4	Immunobiologische Eigenschaften der analysierten Zytokine	- 7 -
1.2.4.1	Interleukin-6	- 7 -
1.2.4.2	Interleukin-10	- 7 -
1.2.4.3	Interleukin-13	- 8 -
1.2.4.4	Interferon- γ	- 9 -
1.2.4.5	Tumor Nekrose Faktor- α	- 9 -
1.2.5	Graphische Übersicht zellulärer Interaktionen.....	- 10 -
1.3	Immunologische Veränderungen nach Gewebetrauma	- 11 -
1.4	Aktiviertes Protein C	- 13 -
1.4.1	Grundlagen	- 13 -
1.4.2	Effekte auf zellulärer Ebene	- 15 -
1.5	Antithrombin	- 16 -
1.5.1	Grundlagen	- 16 -
1.5.2	Effekte auf zellulärer Ebene	- 17 -
1.5.3	Einfluss von Heparin auf die antiinflammatorische Potenz von AT	- 19 -
1.6	Fragestellungen	- 19 -
2	MATERIAL UND METHODE	- 21 -
2.1	Patientengut	- 21 -
2.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien	- 21 -
2.1.2	Verlaufsdokumentation	- 23 -
2.1.3	Demographische Daten	- 24 -
2.2	Geräte und Material	- 26 -
2.2.1	Geräte	- 26 -

- Inhalt -

2.2.2	Basischemikalien, Puffer und Lösungen	- 26 -
2.2.3	Verbrauchsmaterialien	- 27 -
2.3	Probenentnahme	- 28 -
2.4	Gewinnung mononukleärer Leukozyten (PBMC).....	- 28 -
2.5	Durchflusszytometrische Bestimmung des Immunstatus	- 30 -
2.5.1	Grundlagen	- 30 -
2.5.2	Kompensation der Fluoreszenzüberlappung.....	- 32 -
2.5.3	Verwendete Antikörper-Fluorochrom-Konjugate.....	- 33 -
2.5.4	Färbung der leukozytären Oberflächenmarker.....	- 34 -
2.5.5	Analyse.....	- 34 -
2.6	Herstellung der Versuchsansätze.....	- 35 -
2.6.1	Präinkubation der PBMC mit aPC und AT	- 35 -
2.6.2	Rationale zur Dosisfindung von aPC und AT	- 36 -
2.6.3	Herstellung der Heparin-Ansätze	- 37 -
2.6.4	Induktion der inflammatorischen Antwort	- 38 -
2.6.4.1	Stimulation der monozytären Zelllinie mit Lipopolysaccharid (LPS).....	- 38 -
2.6.4.2	Aktivierung der lymphozytären Zelllinie mit OKT3	- 38 -
2.6.5	Separation der zellfreien Überstände	- 38 -
2.7	Messung mit dem Multiplex-Zytokin-Assay	- 39 -
2.7.1	Funktionsweise des Multiplex-Systems.....	- 39 -
2.7.2	Protokoll der Multiplex-Messung	- 40 -
2.8	Statistische Auswertung	- 41 -
2.9	Qualitätssicherung	- 41 -
3	ERGEBNISSE	- 45 -
3.1	Immunstatus.....	- 45 -
3.1.1	Relativer Lymphozyten- und Monozytenanteil.....	- 45 -
3.1.2	Expression von HLA-DR und TLR4	- 46 -
3.2	Zytokin-Freisetzung im LPS-Ansatz.....	- 48 -
3.2.1	IL-10.....	- 48 -
3.2.2	TNF- α	- 52 -

- Inhalt -

3.3	Zytokin-Freisetzung im OKT3-Ansatz	- 56 -
3.3.1	IL-6	- 56 -
3.3.2	IL-13	- 61 -
3.3.3	IFN- γ	- 66 -
3.3.4	Probatorische Messungen von IL-4 und TNF- α	- 70 -
3.4	Einfluss von Heparin	- 72 -
4	DISKUSSION	- 75 -
4.1	Immunstatus	- 75 -
4.2	Patientenkollektiv	- 76 -
4.3	Aktiviertes Protein C	- 76 -
4.4	Antithrombin	- 79 -
4.5	Kombination von aPC und AT	- 82 -
4.6	Einfluss von Heparin	- 83 -
5	ZUSAMMENFASSUNG	- 85 -
6	LITERATURVERZEICHNIS	- 87 -
7	ABKÜRZUNGEN	- 97 -
8	CURRICULUM VITAE	- 99 -
9	DANKSAGUNG	- 103 -
10	ADDENDUM	- 105 -

1 Einleitung

1.1 Einführung

Schweres Trauma und die damit verbundenen immunobiologischen Veränderungen zählen nach wie vor zu den bedeutendsten Herausforderungen der modernen Medizin. Allein in Deutschland erleiden etwa 35000 Menschen jährlich ein Polytrauma (Kuhne et al., 2006). Hierunter versteht man multiple und auf Grund der Schwere vital bedrohliche Verletzungen. Dank großer Zugewinne im Wissen um die pathophysiologischen Zusammenhänge und der Etablierung neuer Therapieschemata konnte die Letalität von Schwerstunfallverletzten in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich gesenkt werden. Dennoch versterben klinikabhängig noch immer zwischen 5 und über 40 % der Unfallopfer (Bardenheuer et al., 2000, Biewener et al., 2004). In der westlichen Welt stellt Trauma somit unverändert die Haupttodesursache für die Gruppe der unter 45-jährigen dar. Neben den gravierenden Folgen für die Betroffenen und ihre Familien ergibt sich hierdurch auch eine ausgeprägte sozioökonomische Bedeutung. So liegt mit über 300000 verlorenen Arbeitsjahren der Verlust an Arbeitskraft in Deutschland noch vor den durch Malignome und Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachten Ausfällen (Oestern, 1997).

Im Hinblick auf die Letalität wurde bereits 1983 auf einen dreiphasigen Verlauf hingewiesen, welcher durch jüngere Studienergebnissen bestätigt wird (Trunkey, 1983, Bardenheuer et al., 2000):

1. Ein Teil der Patienten verstirbt bereits innerhalb der ersten Minuten nach Trauma. Ursächlich sind mehrheitlich schwere *Schädel-Hirn-Traumata* (SHT) sowie traumatische Rupturen der großen Gefäße. Eine medizinische Behandlung ist zu diesem frühen Zeitpunkt nahezu unmöglich und die Unfallopfer erliegen daher in der Regel noch am Unfallort ihren Verletzungen.
2. Im Zeitraum bis 24 Stunden nach Trauma sind die Patienten insbesondere durch den häufig massiven Blutverlust sowie den damit einhergehenden

- Einleitung -

hämorrhagischen Schock gefährdet. Die adäquate präklinische und frühe klinische Behandlung stellt hier den wesentlichen prognostischen Faktor dar.

3. Mit anteilig bis zu 50% sind die Folgen eines initial erlittenen SHT Hauptursache der beobachteten Spätletalität. Daneben steht die Ausbildung von *Multiorgandysfunktionssyndrom* (MODS) und *Multiorganversagen* (MOV), meist im Rahmen septischer Verläufe, als wesentliche Komplikation nach schwerem Trauma im Vordergrund. Späte Todesfälle treten dabei mit einer Häufung um den sechsten Tag auf.

Die erwähnte Steigerung der Überlebensrate lässt sich im Wesentlichen auf eine Optimierung der Rettungskette sowie die verbesserten intensivmedizinischen Therapieoptionen zurückführen. Hierdurch gelang es unter anderem die Inzidenz des Multiorganversagens von 25 % auf etwa 5 % kontinuierlich zu senken (Faist et al., 1983, Regel et al., 1996, Durham et al., 2003). Dennoch zeigt sich, dass bei manifestem MOV die Mortalität mit 32 % bei zwei beteiligten Organen bis hin zu 90 % bei vier Organen nahezu unverändert hoch ist (Durham et al., 2003). Ausgangspunkt dieses komplexen Krankheitsbildes ist eine systemische Hyperinflammation nach Trauma. In Folge des *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) kommt es zu einer Immunalteration welche septische Verläufe begünstigt und letztlich für die Entstehung des MOV zumindest mitverantwortlich ist (Faist und Wichmann, 1997). Interessanterweise können solche Veränderungen und deren Folgen auch bei elektiv operierten Patienten beobachtet werden (Angele und Faist, 2002). Eine Restauration der Immunfunktion wurde daher für beide Patientengruppen als therapeutisches Ziel postuliert (Faist und Kim, 1998). Sowohl für *aktiviertes Protein C* (aPC) als auch *Antithrombin* (AT) wurden bereits, neben ihrer bekannten Eigenschaft als physiologische Gerinnungsinhibitoren, solche immunmodulatorischen Effekte nachgewiesen. Darüber hinaus konnte für aPC in einer großen Phase-III-Studie ein positiver Einfluss auf die 28-Tage-Mortalität septischer Patienten gezeigt werden (Bernard et al., 2001). Beide Substanzen erscheinen daher äußerst interessant im Hinblick auf die gezielte Beeinflussung der posttraumatischen Immundysfunktion.

1.2 Grundlagen der humanen Immunfunktion

1.2.1 Das Immunsystem

Dem humanen Immunsystem kommt die komplexe Aufgabe zu, den Körper vor schädigenden inneren und äußeren Einflüssen zu schützen. Hierzu zählen von außen eindringende Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, etc.) genauso wie körpereigene entartete Zellen. Um diese Funktion aufrecht zu erhalten steht dem Immunsystem eine Vielzahl unterschiedlicher Abwehrmechanismen zu Verfügung. Grundsätzlich kann dabei zwischen „angeborener“ (unspezifischer) und „erworbener“ (spezifischer) Immunität unterschieden werden. Beiden gemeinsam ist das Vorhandensein sowohl zellulärer als auch löslicher Komponenten. Dabei sind die Träger der unspezifischen Immunität bereits beim ersten Kontakt mit dem entsprechenden Antigen in der Lage ihre Aufgabe wahrzunehmen, während spezifische Immunantworten einer vorherigen Aktivierung bedürfen, dann aber durch die Entwicklung sogenannter Resistenzen längerfristigen Schutz bieten (Janeway et al., 2005).

Tabelle 1 stellt einen Überblick über die Komponenten der Immunabwehr dar. Es ist jedoch anzumerken, dass die beiden Systeme keinesfalls als voneinander abgegrenzt betrachtet werden dürfen. Im Gegenteil bestehen vielfältige Verbindungen zwischen angeborener und erworbener Immunität. So präsentieren z.B. Makrophagen die via Phagozytose und intrazellulärer Prozessierung gewonnenen, mikrobiellen Antigene über spezielle Rezeptoren an T-Lymphozyten und aktivieren diese (Askew et al., 1995). Erst durch diese Wechselwirkung sind die T-Lymphozyten zur Stimulation der antigenproduzierenden B-Zellen in der Lage. Die verschiedenen Zellpopulationen produzieren dabei eine nur noch schwer überschaubare Zahl unterschiedlicher Zytokine und Chemokine, welche in der Summe ihrer pro- und anti-inflammatorischen Eigenschaften die empfindliche Balance der körpereigenen Abwehr sicherstellen. Dysfunktionen, wie sie unter anderem nach schwerem Gewebetrauma gesehen werden, stören dieses Gleichgewicht nachhaltig und können daher Ursache lebensbedrohlicher Infektionen und Organstörungen sein.

- Einleitung -

Tabelle 1: Einteilung des humanen Immunsystems in Komponenten der unspezifischen und spezifischen Immunität

Unspezifische Immunität	Spezifische Immunität
<p>Mechanische Barrierefunktion: Haut, Schleimhaut, etc.</p> <p>Zelluläre Komponenten: Phagozyten (Monozyten/Makrophagen, Granulozyten, Retikuloendotheliales System), Natürliche Killerzellen</p> <p>Lösliche Komponenten: Lysozym, Komplement, pH, NO, H₂O₂, etc.</p>	<p>Zelluläre Komponenten: Antigenpräsentierende Zellen (z.B. Makrophagen, Dendritische Zellen), T-Lymphozyten, B-Lymphozyten</p> <p>Humorale Komponente: Spezifische Antikörper</p>

1.2.2 Die Zellen des Immunsystems

Die Zellen des Immunsystems besitzen mit der pluripotenten CD34+ Stammzelle eine einheitliche Vorläuferzelle. Diese differenziert sich während der weiteren Entwicklung in myelomonozytäre sowie lymphatische Zellreihen. Der myelomonozytären Zellreihe werden polymorphkernige Zellen (PMN, u.a. Granulozyten), dendritische Zellen (DC), Mastzellen sowie Monozyten / Makrophagen (Mø) zugerechnet. Myelomonozytäre Zellen, welche auch als Antigen-präsentierende Zellen (APC) bezeichnet werden, besitzen die Eigenschaft zur Aktivierung von T-Lymphozyten und stellen somit eine wichtige Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. Zur lymphatischen Zellreihe gehören dagegen T- und B-Lymphozyten sowie *Natürliche Killer* (NK)-Zellen. Lymphozyten sind die Effektorzellen der spezifischen Immunität. T-Helferlymphozyten (T_H-Zellen) haben vorwiegend regulatorischen Einfluss auf andere Immunzellen während zytotoxische T-Lymphozyten insbesondere viral infizierte Körperzellen abtöten. B-Lymphozyten erkennen freie oder durch T-Helferlymphozyten präsentierte antigene Epitope. Dies führt zu klonaler Expansion des B-Lymphozyten und schließlich zur Produktion sowie Sezernierung großer Mengen spezifischer Antikörper. Seit einiger Zeit sind neben ruhenden T_H0-Zellen, die eine breite Palette teils antagonistischer Zytokine sezernieren, mindestens zwei

- Einleitung -

Subtypen spezialisierter T_H -Zellen bekannt, die sich erst nach Aktivierung aus T_H0 -Zellen differenzieren. T_H1 -Zellen unterstützen in ihrer Funktion die zelluläre Immunität durch $M\phi$ und NK-Zellen und wirken proinflammatorisch. Die Aufgabe von T_H2 -Zellen besteht in der Aufrechterhaltung der humoralen Immunität durch Stimulation von B-Zellen, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten. In ihrer Funktion sind sie überwiegend anti-inflammatorisch. Sämtliche Zellen des Immunsystems kontrollieren sich dabei in ihrer Wirkung ständig wechselseitig über die Freisetzung unterschiedlicher Mediatoren (Zytokine, Lymphokine, etc.).

Die verschiedenen zellulären Subpopulationen unterscheiden sich dabei an ihrer Oberfläche durch ein bestimmtes, für sie charakteristisches Muster von Membranstrukturen. Dies ermöglicht die durchflusszytometrische Unterscheidung der einzelnen Subpopulationen. Diese auch als „*cluster of differentiation*“ (CD) bezeichneten Oberflächenmoleküle verändern sich teilweise im Rahmen von Zellaktivierung und -differenzierung. So ist beispielsweise der Phänotyp von ausdifferenzierten T-Helferlymphozyten $CD3+CD4+CD8-$ während zytotoxische T-Lymphozyten $CD3+CD4-CD8+$ sind. Daneben existieren eine Reihe weiterer, funktionell bedeutender Oberflächenstrukturen (T-Zellrezeptor, MHC-Moleküle, Toll-like-Rezeptor, etc.) deren variable Expression wichtige Aufschlüsse über Aktivierungs- und Funktionszustand von Leukozyten liefert.

1.2.3 Leukozytäre Oberflächenmarker

Das **CD45**-Oberflächenmolekül, auch als „leukocyte common antigen“ bezeichnet, stellt einen Panleukozytenmarker dar, welcher in unterschiedlicher Stärke auf allen Immunzellen exprimiert wird. Es sind verschiedene Isoformen bekannt, die unter anderem differierende Aktivitätszustände von T-Lymphozyten charakterisieren und an der Erkennung von Antigenen durch den *T-Zellrezeptor* (TCR) beteiligt sein sollen.

Das **CD3**-Antigen wird auf reifen T-Lymphozyten exprimiert und ist Teil einer größeren Membranstruktur der auch der TCR angehört. Es handelt sich dabei um einen transmembranen Komplex der neben zwei TCR-Ketten (α und β) auch vier CD3-Ketten (γ -, δ - und zwei ϵ -Ketten) sowie zwei sogenannte ζ -Ketten enthält. Die Aufgabe der CD3-Ketten besteht in der Vermittlung der Signaltransduktion ins Zellinnere. CD3 dient damit in vivo der Aktivierung von T-Lymphozyten, was zur

- Einleitung -

Transkription einer Reihe wichtiger Zytokine führt (s.u.). Mit OKT3 steht ein monoklonaler Antikörper gegen CD3 zur Verfügung, mit welchem eine Stimulation der T-Lymphozyten auch in vitro möglich ist (siehe Abschnitt 2.6.4.2).

Der **CD14**-Rezeptor ist auf Zellen der myelomonozytären Linie zu finden und wird von Monozyten / Makrophagen stark, von Granulozyten schwach exprimiert. Als einkettiges Molekül mit einem Molekulargewicht von 55kDa ist er über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker an die Zellmembran gekoppelt. Dabei ist CD-14 aber nur auf der Zelloberfläche lokalisiert und hat keine intrazelluläre Domäne. Für die Signaltransduktion ins Zellinnere ist daher TLR-4 (s.u.) im Sinne eines Ko-Rezeptors erforderlich.

CD16 stellt einen Fc-Rezeptor dar und wird v.a. auf NK-Zellen, aber auch auf PMN und Mø gefunden. Fc-Rezeptoren erkennen Antikörper die an pathogene Strukturen gebunden sind. Dies ist Grundlage der Antikörper vermittelten Phagozytose oder Zytotoxizität.

TLR4, ein Mitglied der „Toll-like-Rezeptor“-Familie, wurde 1998 als Rezeptor des bakteriellen *Lipopolysaccharid* (LPS, Endotoxin), einem strukturellen Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien identifiziert (Poltorak et al., 1998). TLR4 ist insbesondere auf Mø stark exprimiert und aktiviert nach Bindung von LPS (CD14 vermittelt) die Synthese einer Reihe proinflammatorischer Genprodukte. LPS kann daher auch in vitro zur Stimulation von Monozyten verwendet werden (siehe Abschnitt 2.6.4.1). Darüber hinaus erhöht ein vorausgehendes Trauma die Empfindlichkeit von Mø für LPS deutlich („Priming“).

HLA-DR oder „human leukocyte antigen“-DR ist ein Heterodimer aus dem *major histocompatibility complex* (MHC)- Klasse II. MHCs sind Moleküle, mit denen prozessierte antigene Peptide an T-Lymphozyten präsentiert werden und gehören zur Immunglobulin-Superklasse. Dabei werden MHC-I auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, während MHC-II auf hierfür spezialisierten APCs zu finden sind. Über MHC-I wird eine Bindung an CD8 vermittelt, was zur Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten führt. MHC-II kann über CD4 an T-Helferlymphozyten präsentieren und regt die Ausdifferenzierung ruhender Vorläuferzellen in Effektorzellen an.

1.2.4 Immunobiologische Eigenschaften der analysierten Zytokine

1.2.4.1 Interleukin-6

Interleukin (IL)-6 ist ein je nach Isoform 21,5 bis 28 kDa schweres Protein aus 185 Aminosäuren und wurde 1972 erstmals beschrieben (Schimpl und Wecker, 1972). Mengemäßig erfolgt die Synthese hauptsächlich in stimulierten Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen, allerdings sind eine Reihe weiterer immunkompetenter Zellen (z.B. Lymphozyten) sowie u.a. Muskel- und Gliazellen zur Produktion von IL-6 in der Lage. In Monozyten führt IL-6 selbst, sowie u.a. Endotoxin, Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), IL-1 β , *platelet derived growth factor* (PDGF) oder Virusinfekte zu gesteigerter Synthese (Shalaby et al., 1989). Inhibitoren der IL-6 Produktion stellen IL-4, *transforming growth factor- β* (TGF- β) und Glucocorticoide dar. In seiner Eigenschaft als Zytokin besitzt es pleiotrope (vielfältige) proinflammatorische Wirkungen. So ist IL-6 der wichtigste Mediator zur Produktion von Akut-Phase-Proteinen in Hepatozyten (Castell et al., 1988) und wird nach entsprechendem Reiz innerhalb kürzester Zeit (etwa 2h) induziert (Coulie et al., 1987). IL-6 Rezeptoren finden sich dabei auf einer Vielzahl von Zellen. Von großer Bedeutung ist die Fähigkeit zur Proliferationssteigerung von T- und B-Lymphozyten durch IL-6. In einer Reihe von Arbeiten konnte eine Gruppe um Hirano den Effekt von IL-6 auf B-Zell-Differenzierung und Antikörperproduktion nachweisen, was zur früheren Bezeichnung „B-cell stimulating factor-2“ (BSF-2) führte (Teranishi et al., 1982, Hirano et al., 1986). Daneben besitzt IL-6 auch antivirale Aktivität, weshalb es zeitweilig auch als Interferon β 2 bezeichnet wurde (Weissenbach et al., 1980). Überdies hinaus stimuliert es die Megakaryozytenreifung (Asano et al., 1990). Nach akzidentellem oder chirurgischem Trauma steigen die Serumspiegel von IL-6 stark an und können in ihrer Höhe mit dem Auftreten posttraumatischer Komplikationen und negativem Outcome korreliert werden (Roumen et al., 1993). Das Ausmaß des Anstiegs ist dabei mit der Schwere des Gewebetraumas assoziiert.

1.2.4.2 Interleukin-10

IL-10 ist ein 36 kDa schweres Homodimer mit pleiotropen antiinflammatorischen Eigenschaften. Wichtigster Produzent sind T_H2-Zellen, aber auch M ϕ und B-Lymphozyten synthetisieren IL-10. Es ist der wichtigste Gegenspieler der

- Einleitung -

proinflammatorischen Zytokine, indem es sowohl die Transkriptionsrate dieser Mediatoren reduziert, als auch den Abbau der zugehörigen mRNA fördert. Auch eine Herauslösung von TNF-Rezeptoren aus Zellmembranen („shedding“) wurde beschrieben, was zur vermehrten Inaktivierung von gelöstem TNF führt (Fiorentino *et al.*, 1989, Opal und DePalo, 2000). Daneben hemmt IL-10 insbesondere die T_H1 -Antwort u.a. durch Suppression der *Interferon* (IFN)- γ Produktion. Interessanterweise wird IL-10 durch nahezu dieselben Stimuli wie auch IL-6 induziert (LPS, TNF- α , IL-1, Viren), inhibitorisch wirken analog IL-4 sowie IFN- γ . Im Unterschied zu IL-6 steigen die Serumspiegel nach Stimulus aber deutlich später an. Experimentell konnte gezeigt werden, dass bei frühzeitiger Applikation von Antikörpern gegen IL-10 die Mortalität in einem Verbrennungs- / Sepsismodell gesenkt werden kann und dies möglicherweise auf einer Wiederherstellung der T_H1 -Funktion beruht (Lyons *et al.*, 1999).

1.2.4.3 Interleukin-13

IL-13, ein Protein aus 132 Aminosäuren, wird wie IL-10 überwiegend aus T_H2 -Zellen freigesetzt. Es besitzt hohe strukturelle und funktionelle Verwandtschaft zu IL-4, dem Leitzytokin der T_H2 -Antwort (Minty *et al.*, 1993). Dies belegt auch die enge Nachbarschaft der IL-13 und IL-4 Gensequenz auf Chromosom 5q (Morgan *et al.*, 1992). So supprimiert IL-13 wie IL-4 die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine sowie die CD14 Expression aktivierter $M\phi$. Im Unterschied zu IL-10 erhöhen beide Zytokine jedoch die Antigen präsentierenden Eigenschaften der Monozyten, u.a. durch gesteigerte Expression von MHC-II Molekülen. Da IL-13 auch die Überlebenszeit kultivierter Monozyten erhöht, stellt es kein generelles Makrophagen supprimierendes Zytokin dar. Bei B-Lymphozyten verstärkt es Proliferation und Differenzierung („Antikörperklassen-Switch“ zu IgG4 und IgE). Anders als IL-4 verstärkt IL-13 jedoch nicht die Proliferation von T-Lymphozyten. Allerdings hemmt es ebenfalls, vermutlich über die Suppression der IL-12 Produktion aktivierter $M\phi$, die Differenzierung von T_H0 - in T_H1 -Zellen. Nach Stimulus wird es im Unterschied zu IL-4 bereits sehr früh und dann über einen längeren Zeitraum (bis 72h) produziert (Zurawski und de Vries, 1994). Bisher sind die Effekte von IL-13 nach Trauma noch unzureichend beschrieben. In einem ex-vivo Modell konnte ein regulatorischer Effekt von IL-13 auf die proinflammatorische Zytokinfreisetzung aus $M\phi$ nach Trauma gezeigt werden (Kim *et al.*, 1995). Es scheint jedoch in-vivo nicht

- Einleitung -

zwangsläufig zu einem Anstieg der Serumspiegel von IL-13 im posttraumatischen Verlauf zu kommen (Hensler et al., 2000).

1.2.4.4 Interferon- γ

Interferone sind lösliche Proteine mit der Fähigkeit zur Induktion antiviraler Immunantworten. 1957 von Isaacs und Lindemann erstmals beschrieben (Isaacs und Lindenmann, 1957) unterscheidet man zwei Typen von Interferonen. Typ-I-Interferone werden durch Bakterien und Viren induziert und von Leukozyten (IFN- α) beziehungsweise Fibroblasten (IFN- β) sezerniert. Hauptaufgabe ist die Suppression von Virus- und Zellproliferation. IFN- γ , ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 21 bis 24 kDa, wird auf Grund struktureller Unterschiede als Typ-II-Interferon bezeichnet und ausschließlich aus naiven T_H0- und T_H1- sowie NK-Zellen freigesetzt. Als physiologischer Stimulus wirken Antigene, die Freisetzung erhöht sich unter Einfluss von IL-2, IL-18 und insbesondere IL-12 (Alzona et al., 1995). IFN- γ gilt als Leitzytokin der T_H1-Antwort und fördert die Umwandlung von T_H0- in T_H1-Zellen bei gleichzeitiger Hemmung der T_H2-Entwicklung. Die wohl bedeutendste Aufgabe ist das sogenannte „Priming“ von Makrophagen, was deren Empfänglichkeit für LPS, IL-1 und TNF- α erhöht. Daneben erhöht es die MHC-I und -II Expression sowohl auf M ϕ als auch T- und B-Lymphozyten. Außerdem steigert es die IgG2a-Freisetzung aus B-Zellen bei gleichzeitiger Hemmung der IL-4 vermittelten B-Zellproliferation und des Antikörper-Switch. Generell fördert IFN- γ somit also neben der zellulären auch die humorale Immunität und stellt damit einen wichtigen natürlichen Immunmodulator dar.

1.2.4.5 Tumor Nekrose Faktor- α

TNF- α , ein 17 kDa Protein, stellt das bedeutendste Zytokin der proinflammatorischen Antwort dar und M ϕ sind neben T-Lymphozyten dessen wichtigster Produzent. Nach Bindung von LPS an den CD14-TLR4 Rezeptorkomplex erfolgt innerhalb von Minuten eine exzessive Ausschüttung des Moleküls. Trotz der nur geringen biologischen Halbwertszeit besteht seine Bedeutung in der Initiation der weiteren Mediatorfreisetzung. TNF- α steht am Beginn der Entzündungskaskade und ruft die Synthese und Liberation weiterer Mediatoren (u.a. IL-6) hervor. Diese können dann das entzündliche Geschehen auch in Abwesenheit von TNF- α über einen wesentlich längeren Zeitraum aufrecht

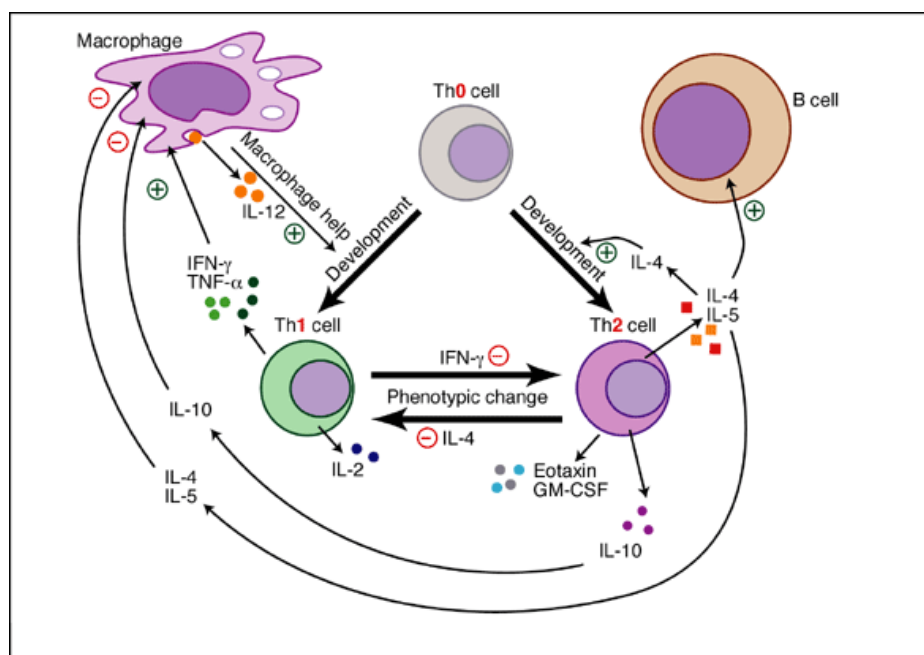
- Einleitung -

erhalten. Die Bedeutung von TNF- α für die Entstehung eines septischen Schocks nach Endotoxinämie beziehungsweise nach Trauma konnte dabei vielfach nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte bereits allein durch Hämorrhagie eine Erhöhung des TNF- α Spiegels beobachtet werden (Ayala et al., 1990). Der ursprüngliche Name rührt dabei von der zytotoxischen Wirkung auf Tumorzellen in vitro und in vivo her (Larrick und Wright, 1990). Rezeptoren für TNF- α finden sich auf allen kernhaltigen Zellen, was die vielfältigen Eigenschaften dieses Zytokins erklärt. Daneben existieren im Serum gelöste Rezeptorformen, welche der kurzen Halbwertszeit in vivo zugrunde liegen. Im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus wirkt u.a. IL-6 inhibitorisch (Tracey und Cerami, 1993, Hildebrand *et al.*, 2005).

1.2.5 Graphische Übersicht zellulärer Interaktionen

Abbildung 1 zeigt einen stark vereinfachten Überblick der zellulären Interaktionen. Die beschriebenen Einflüsse bestehen häufig nur temporär im Rahmen unterschiedlicher Aktivierungszustände. Dennoch ist diese Darstellung zum Verständnis der komplexen Regulationsmechanismen hilfreich.

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der zellulären Regulationsmechanismen (Harber et al., 2000)



1.3 Immunologische Veränderungen nach Gewebetrauma

Sowohl durch schweres Unfalltrauma als auch bei Patienten nach ausgedehnten Operationen kommt es zu einem Anstieg der Serumspiegel proinflammatorischer Zytokine, deren Höhe gut mit dem späteren Auftreten eines MOV korreliert (Roumen et al., 1993). Für das klinische Bild dieser systemischen Hyperinflammation führten Bone und Kollegen bereits 1992 den Begriff des „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ ein (Bone et al., 1992). In *Tabelle 2* sind die Kriterien zur Definition des SIRS dargestellt. Diese proinflammatorische Reaktion kann grundsätzlich als physiologische Antwort des Organismus auf eine Vielzahl unterschiedlicher Schädigungen aufgefasst werden. Erst wenn die körpereigenen Regulationsmechanismen nicht mehr in der Lage sind die überschießende Immunantwort zu kontrollieren, kann es zu Organdysfunktionen bis hin zum multiplen Organversagen kommen (Yao et al., 1998). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass es nach initialer Hyperinflammation zu einer längerfristigen Phase der Immundepression kommt (Faist und Kim, 1998, Angele und Faist, 2002). Diese als „*Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome*“ (CARS) bezeichnete Immunsuppression (Bone, 1996) beruht auf einer Vielzahl immunologischer Veränderungen die in ihrem Zusammenwirken bis zur Immunparalyse führen können (siehe *Abbildung 2*). So wurde unter anderem eine Störung von Chemotaxis, Phagozytosefähigkeit und „respiratory burst“ der neutrophilen Granulozyten beschrieben (Rivkind et al., 1991). Außerdem kommt es zu einer vermehrten Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine (Ertel et al., 1995). Auf zellulärer Ebene konnte nach Stimulation mit bakteriellem Endotoxin eine reduzierte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren aus Monozyten traumatisierter beziehungsweise operierter Patienten gezeigt werden (Keel et al., 1996, Haupt et al., 1998). Auch für Lymphozyten als Träger der spezifischen Immunität wurden Beeinträchtigungen nach Trauma postuliert. Die generelle Depression der lymphozytären Reaktion auf unterschiedliche Stimuli in der Folge eines Gewebeschadens ist seit langem bekannt (Riddle und Berenbaum, 1967, O'Mahony et al., 1984). Dies konnte auch in einem Trauma-Hämorrhagie-Modell bestätigt werden (Zellweger et al., 1995). In einer Reihe von Untersuchungen konnte darüber hinaus eine Dysbalance von T-Helferzell-Subpopulationen gefunden werden. So dominiert nach traumatischer Schädigung die T_H2-Antwort (Decker et

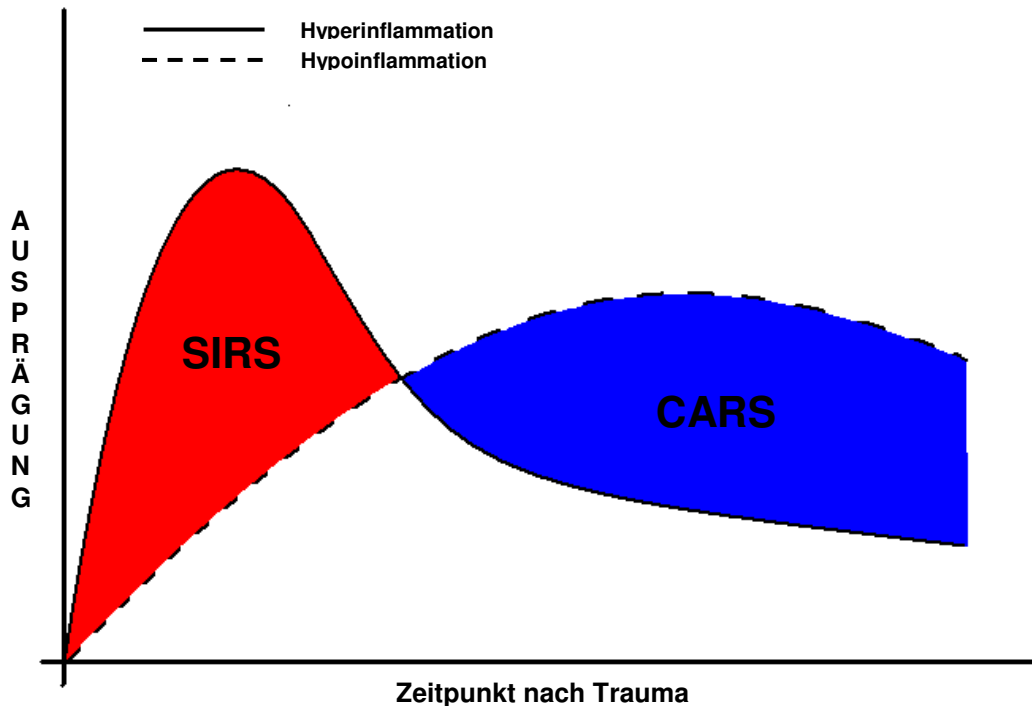
- Einleitung -

al., 1996, Mack et al., 1996, O'Sullivan et al., 1995). Dabei produzieren T_H2-Lymphozyten unter anderem IL-10, ein vornehmlich antiinflammatorisches Zytokin, sowie Interleukin-4. IL-4 stellt bekanntermaßen einen der stärksten Suppressoren der mehrheitlich proinflammatorischen T_H1-Antwort dar. Auf Grund der beschriebenen Veränderungen verwundert die Anfälligkeit traumatisierter Patienten für septische Komplikationen und hierdurch bedingtem MODS / MOV nicht (Fry et al., 1980, Faist et al., 1983, Menges et al., 1999). Interessanterweise lieferten andere Studien Erklärungsmodelle, bei denen für die Entwicklung eines MOV im posttraumatischen Verlauf keine strenge Bindung an ein septisches Geschehen nötig war (Goris et al., 1985, Norton, 1985). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass allein die Infusion proinflammatorischer Zytokine zu MODS und MOV führen kann und dass dieser Effekt durch die Administration Zytokin inhibierender Substanzen reversibel ist (Okusawa *et al.*, 1988, Rensing und Bauer, 2001). Diese Hinweise legen den Schluss nahe, dass es bereits früh im posttraumatischen Verlauf, allein durch die unkontrollierte Hyperinflammation ohne begleitende Infektion, zur Organschädigung kommen kann. Insgesamt scheinen somit sowohl die frühzeitige Eindämmung der überschießenden Immunantwort, als auch die Wiederherstellung der Homöostase bei manifester Immundysfunktion vielversprechende Therapieoptionen nach akzidentellem und chirurgischem Trauma zu sein.

Tabelle 2: Bone-Kriterien des Systemic Inflammatory Response Syndrome

Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)	
Mindestens zwei der folgenden Symptome gleichzeitig	
Herzfrequenz:	> 90 Schläge pro Minute
Atemfrequenz:	> 20 Atemzüge pro Minute oder PaCO ₂ < 32 mmHg
Körpertemperatur:	> 38° oder < 36° Celsius
Leukozytenzahl:	> 12000 oder < 4000 pro ml oder > 10 % unreife Neutrophile

Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Ablaufs von Hyper- und Hypoinflammation nach Trauma; modifiziert nach (van der Poll, 2001)



1.4 Aktiviertes Protein C

1.4.1 Grundlagen

Aktiviertes Protein C, eine Serinprotease, stellt einen natürlichen Gerinnungsinhibitor dar. Als solche führt es zur Inaktivierung der aktivierten Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa. Dabei wird das im Plasma zirkulierende Zymogen Protein C auf der Oberfläche von Endothelzellen durch einen Komplex aus Thrombin und Thrombomodulin gebunden und in die aktivierte Form überführt. Daran beteiligt ist eine membranständige Rezeptorstruktur, welche als *endothelialer Protein C Rezeptor* (EPCR) bekannt ist. Dieser Komplex erhöht die antikoagulatorische Aktivität von aPC in etwa um das 20-fache (Taylor et al., 2001). Nach der Lösung von EPCR erfolgt zusammen mit dem Ko-Faktor Protein S die

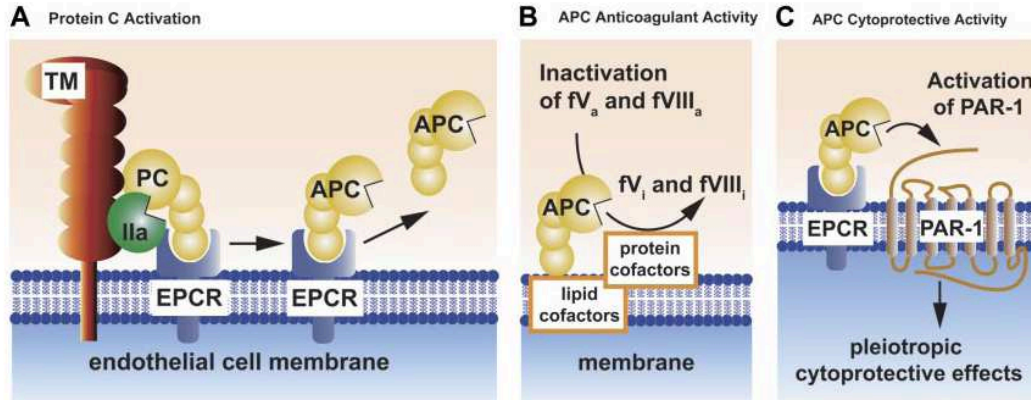
- Einleitung -

irreversible, proteolytische Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren (Dahlback und Villoutreix, 2005).

Neben dieser bekannten antikoagulatorischen Aktivität zeigen jüngere Studienergebnisse auch eine ausgedehnte antiinflammatorische Kompetenz von aPC. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang das Verständnis der voneinander unabhängigen Signalwege. Daher wurde die antiinflammatorische Potenz auf Grund der voneinander differierenden Signalkaskaden auch als sogenannter „cytoprotective Protein C pathway“ bezeichnet (Mosnier et al., 2007). Während der antikoagulatorischen Wirkung also letztendlich die Lösung des Gerinnungsinhibitors vom EPCR zugrunde liegt, kommt es bei bestehender Bindung zu einer *Protease-aktivierter Rezeptor-1* (PAR-1) vermittelten Signaltransduktion ins Zellinnere (*Abbildung 3*). Hierauf erfolgt unter anderem eine Veränderung der zellulären Genexpression mit überwiegend antiinflammatorischer Ausrichtung (Riewald et al., 2002). Die immunologische Bedeutung dieses Signalweges wird dabei durch die Tatsache unterstützt, dass EPCR in seinen strukturellen Eigenschaften den MHC-I Molekülen ähnelt (Oganessian et al., 2002). Interessanterweise führt die Infusion von Endotoxin (via vermehrter Thrombinbildung) zu einer gesteigerten EPCR mRNA Expression (Gu et al., 2000). EPCR findet sich dabei hauptsächlich auf Endothelzellen großer Gefäße (Laszik et al., 1997). Daneben konnte der Rezeptor aber auch auf Monozyten (Galligan et al., 2001), Eosinophilen (Feistritzer et al., 2003) und Neutrophilen (Sturn et al., 2003) nachgewiesen werden. Zusammen erklärt dies das Interesse an aPC als pharmakologischer Substanz zur Restaurierung einer gestörten Immunbalance im Rahmen überschießender inflammatorischer Reaktionen. So wurde bereits im Rahmen der PROWESS-Studie, einer klinischen Phase III Studie, ein Überlebensvorteil für rekombinantes humanes aPC (Drotrecogin alfa) bei Patienten mit schwerer Sepsis nachgewiesen (Bernard et al., 2001; siehe hierzu auch anhängendes Addendum). In einem Mausmodell konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass hierfür vorwiegend die immunologische und nicht die antikoagulatorische Aktivität verantwortlich zu sein scheint (Kerschen et al., 2007).

- Einleitung -

Abbildung 3: Aktivierung (A) und antikoagulatorischer (B) bzw. zytoprotektiver (C) Signalweg von aPC; TM: Thrombomodulin, IIa: Thrombin (Mosnier et al., 2007)



1.4.2 Effekte auf zellulärer Ebene

Wie beschrieben scheint aPC, über den zytoprotektiven Signalweg via EPCR und PAR-1, Zellen in ihren immunologischen Reaktionen beeinflussen zu können. So konnte sowohl für Endothelzellen als auch Monozyten gezeigt werden, dass aPC die Expression und nukleäre Translokation von NF- κ B supprimiert (White et al., 2000, Joyce et al., 2001). Auch die Aktivierung von AP-1 wird in Monozyten via Blockierung sogenannter Mitogen-aktivierter Protein-Kinasen (MAP-Kinasen) behindert (Yuksel et al., 2002). Sowohl NF- κ B als auch AP-1 sind Transkriptionsfaktoren die u.a. in M ϕ eine Reihe proinflammatorischer Genprodukte, allen voran TNF- α , kontrollieren. So überrascht es nicht, dass aPC auch generell in der Lage ist, die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus stimulierten Monozyten zu reduzieren. Bemerkenswerterweise konnte in diesem Zusammenhang jedoch auch gezeigt werden, dass die Fähigkeit der M ϕ zur Phagozytose grampositiver oder -negativer Bakterien durch aPC nicht beeinträchtigt wird (Grey et al., 1994, Stephenson et al., 2006). Daneben supprimiert aPC in Makrophagen die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (u.a. freie Radikale) welche zum Beispiel im akuten Schock gebildet werden und zur Entwicklung einer Gewebsschädigung beitragen können (Yamaji et al., 2005).

Neben dem Einfluss auf die Zytokinfreisetzung reduziert aPC auch die Chemotaxis verschiedener Leukozytensubpopulationen (Feistritzer et al., 2003, Sturn et al.,

- Einleitung -

2003, Nick et al., 2004). In Monozyten führt aPC zu einer geringeren Freisetzung der Chemokine MIP-1- α und MCP-1 (Brueckmann et al., 2004). Daneben supprimiert aPC u.a. die Bildung der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-selectin (Joyce et al., 2001). In funktionellen Untersuchungen konnte wohl nicht zuletzt deswegen eine verminderte Leukozytenaktivierung beziehungsweise endotheliale Adhäsion nach Ischämie/Reperfusion oder Endotoxinämie demonstriert werden (Mizutani et al., 2000, Hoffmann et al., 2004). Insgesamt reduziert aPC so den Endothelschaden nach septischem Stimulus. Zusätzlich stabilisiert aPC die endotheliale Barrierefunktion (Feistritzer und Riewald, 2005, Finigan et al., 2005). Dies ist von besonderer Bedeutung, da Störungen selbiger im Rahmen des septischen Geschehens („capillary leakage“, *disseminierte intravasale Koagulopathie* [DIC], etc.) großen Einfluss auf die Entwicklung von Organfunktionsstörungen haben (Joyce und Grinnell, 2002).

Nicht zuletzt besitzt aPC vielfältige antiapoptotische Eigenschaften. Hierzu zählt u.a. die Supprimierung des Tumorsuppressor-Proteins p53 und des apoptotischen Caspase 3-Signalwegs in ischämischen Endothelzellen. Hier verschiebt es außerdem das Bcl-2 / Bax Verhältnis in Richtung des antiapoptotisch wirkenden Bcl-2 (Cheng et al., 2003). Für Monozyten wurde durch aPC ein Schutz vor induziertem Zelltod durch Zusatz von Camptothecin, einem Topoisomerase-1-Inhibitor, beschrieben (Stephenson et al., 2006).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass aktiviertes Protein C über pleiotrope antiinflammatorische beziehungsweise zytoprotektive Eigenschaften verfügt. Es könnte daher bei überschießenden Immunreaktionen zum Beispiel im Rahmen eines MOV als pharmazeutische Substanz zur Regulierung auf zellulärer Ebene geeignet sein.

1.5 Antithrombin

1.5.1 Grundlagen

Bei Antithrombin handelt es sich um ein einkettiges, im Plasma zirkulierendes, Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 58 kDa. Es existieren zwei Formen, α AT (90%) und das besser an Heparin bindende β AT (10%) (Peterson und

- Einleitung -

Blackburn, 1985). Im Gegensatz zu aPC, einem Zymogen, ist AT ein Serpin, ein Inhibitor anderer Serinproteasen. Als solcher kontrolliert AT als natürlicher Gerinnungsinhibitor die Aktivität von Thrombin sowie verschiedener Gerinnungsfaktoren, insbesondere des Faktors Xa (Roemisch et al., 2002). AT ist damit der wichtigste Regulator des Gerinnungssystems. Pharmazeutisch kann die antikoagulatorische Potenz durch Zugabe von Heparin um ein Vielfaches gesteigert werden (Damus et al., 1973).

Nach Trauma und im septischen Geschehen weisen erniedrigte AT Spiegel prognostisch auf schwere Verläufe hin. Dabei kommt es häufig zur Ausbildung einer DIC. Diese begünstigt u.a. über vermehrte endotheliale Fibrinablagerungen (via unkontrollierter und nicht zuletzt inflammatorischer Thrombinwirkung) die Entstehung von MODS und MOV (Levi und Ten Cate, 1999). Neben freiem AT scheint an endotheliale Oberflächenstrukturen (*Heparansulfat-Proteoglykane*, HSPG) gebundenes AT von Bedeutung für die Aufrechterhaltung der gestörten Mikrozirkulation zu sein. (Bombeli et al., 1997). In einer Reihe von tierexperimentellen als auch humanen Sepsismodellen wurde daher der Einfluss einer Substitution von AT untersucht. Hier konnte zwar mehrheitlich ein protektiver Effekt bezüglich der Entwicklung von Organschäden gezeigt werden. Ein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben ließ sich jedoch nicht durchgängig nachweisen (Wiedermann, 2006, Afshari et al., 2008). Die diesbezüglich wichtigste Arbeit stellt die KyberSept-Studie dar, eine Phase III Studie an 2314 septischen Patienten. Hier konnte durch AT keine Reduktion der Gesamtsterblichkeit erreicht werden (Warren et al., 2001).

Nachdem gewebeprotective Effekte zunächst auf ATs antikoagulatorische Wirkung und insbesondere der Hemmung von Thrombin zurückgeführt wurden, konnte in neueren Arbeiten auch ein ausgeprägtes antiinflammatorisches Potential gezeigt werden (s.u.). Unterstützend konnte gezeigt werden, dass eine alleinige Blockade von Thrombin nicht zu einer Reduktion der inflammatorischen Antwort nach E. coli Infusion führt (Taylor et al., 1991).

1.5.2 Effekte auf zellulärer Ebene

Zur Vermittlung der antiinflammatorischen Wirkung verfügt AT mit Syndecan-4 wie aPC über einen zellulären Rezeptor, der für die Signalweiterleitung ins Zellinnere

- Einleitung -

verantwortlich ist. Bei Syndecan-4 handelt es sich um ein Proteoglykan bei dem der extrazellulären Domäne eines transmembranen Kernproteins mehrere *Glykosaminoglykan* (GAG)-Ketten angeheftet sind. Auf Grund deren Ähnlichkeit zu Heparin wird Syndecan-4 in die Gruppe der Heparansulfat-Proteoglykane eingeordnet (Rapraeger et al., 1985). Die genaue Rolle in vivo kann zwar noch nicht abschließend beurteilt werden, allerdings lässt die beobachtete Anfälligkeit von Syndecan-4 Knock-out Mäusen gegenüber LPS-Infusion eine immunologische Bedeutung vermuten (Ishiguro et al., 2001).

Neben Endothelzellen konnte Syndecan-4 auf einer Reihe von Immunzellen als AT Rezeptor identifiziert werden. So hemmt AT Syndecan-4 vermittelt die Chemotaxis von Lymphozyten und Monozyten (Kaneider et al., 2002), Neutrophilen (Dunzendorfer et al., 2001) sowie Eosinophilen (Feistritzer et al., 2004). Wegweisend für die Funktion von Syndecan-4 als AT-Rezeptor ist, dass durch Zugabe von Heparinase oder Natriumchlorat, beides Substanzen welche die Heparinstrukturen der GAG-Ketten degradieren, der Einfluss auf die Chemotaxis wieder aufgehoben werden konnte. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass AT wie aPC die Aktivität von NF- κ B in Endothelzellen und Monozyten reduziert. Ursächlich scheint dabei eine Hemmung der Phosphorylierung und Degradierung des Inhibitionsfaktors I κ B zu sein. Auf diesem Weg führt AT unter anderem zu einer verringerten Expression von IL-6 und TNF- α . Außerdem wurde gezeigt, dass β AT einen stärkeren Suppressor darstellt als α AT, was die Bedeutung der HSPG unterstreicht (Oelschlager et al., 2002).

Zur Prävention von Organschäden scheint ein wichtiger Faktor die Fähigkeit zur Freisetzung von Prostacyclin (= Prostaglandin I₂) aus Endothelzellen zu sein. So konnte nachgewiesen werden, dass sich auf Grund der durch AT erhöhten Prostacyclin Freisetzung der Ischämie/Reperfusion- bzw. Endotoxin vermittelte Schaden reduziert (Harada et al., 1999, Uchiba et al., 1996). In diesen Studien wurden auch verringerte Spiegel an Myeloperoxidase, einem Enzym aus Leukozyten, gemessen. In späteren funktionellen Untersuchungen konnte dann gezeigt werden, dass AT durch die Prostacyclin Freisetzung Leukozyten „Rolling“ und Adhäsion am Endothel hemmt und so deren Akkumulation verhindert (Hoffmann et al., 2000, Neviere et al., 2001). Auch nach experimentellem Neurotrauma scheint ein solcher Mechanismus dem positiven Einfluss von AT zugrunde zu liegen (Taoka et al., 2004). Ebenfalls von Bedeutung dürfte in diesem

- Einleitung -

Zusammenhang die, durch AT bedingte Suppression der Adhäsionsmoleküle β_2 Integrin auf Monozyten und Neutrophilen sowie E-selectin auf Endothelzellen sein (Gritti et al., 2004, Uchiba et al., 2004).

1.5.3 Einfluss von Heparin auf die antiinflammatorische Potenz von AT

Nachdem in einer Subgruppenanalyse der KyberSept-Studie ein Überlebensvorteil durch Antithrombin für Patienten ohne begleitende Heparin-Therapie beschrieben wurde, entstanden Diskussionen über einen klinisch bedeutsamen, negativen Effekt selbst geringer Heparindosen wie sie zum Beispiel zur Thromboseprophylaxe verwendet werden (Hoffmann et al., 2006, Wiedermann et al., 2006). Da AT über seine Heparin bindenden Domänen mit Syndecan-4 interagiert erscheint eine Beeinflussung durch Heparin wahrscheinlich. Vermutlich tritt dabei Heparin mit den zellulären GAGs in kompetitive Konkurrenz um die Bindungsstellen am AT. Bereits 1995 zeigten Justus *et al.* dass Heparin die Bindung von AT an Endothelzellen behindert (Justus et al., 1995). Pulletz *et al.* konnten dies in weiteren Untersuchungen bestätigen, allerdings wurde hierdurch überraschenderweise die Freisetzung von Prostacyclin nicht behindert (Pulletz et al., 2000). Der in den funktionellen Untersuchungen beobachtete hemmende Einfluss von AT auf die intravasale Leukozytenakkumulation war jedoch durch Gabe von Heparin (sowohl unfraktioniertes als auch LMWH) aufhebbar (Hoffmann et al., 2002). Genauere Untersuchungen eines störenden Heparin Effekts auf die zelluläre Immunmodulation durch AT liegen bisher nicht vor.

1.6 Fragestellungen

Der Einfluss natürlicher Gerinnungsinhibitoren auf die Immunfunktion war in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschungsarbeit. Während jedoch mittlerweile eine große Anzahl von tierexperimentellen und humanen Studien zur systemischen Wirkung dieser Substanzen vorliegt, sind die isolierten Wirkungen auf menschliche Leukozyten noch nicht abschließend geklärt. Bisher erfolgte ein wesentlicher Teil der Untersuchungen an Endothelzellen beziehungsweise

- Einleitung -

standardisierten monozytären Zelllinien und nicht an originär humanen Immunzellen. Als weitere Einschränkung muss außerdem gelten, dass nahezu alle diese Ergebnisse im Rahmen von Modellen generiert wurden, die das Geschehen einer Sepsis oder DIC nachbilden. Andere klinische Zustandsbilder wie etwa schweres Trauma, das bekanntermaßen ebenfalls zu MODS und MOV führen kann, wurden bisher weder *in-vitro* noch *in-vivo* ausreichend erfasst. Auch ist bisher unklar, ob es durch die Kombination der untersuchten Substanzen eventuell zu Synergismen oder Antagonismen kommen kann. Dies ist durchaus denkbar, da es sich bei aPC um eine Serinprotease, bei AT jedoch um einen Serinprotease Inhibitor handelt. Daneben ist der postulierte Effekt, den Heparin auf die beschriebene antiinflammatorische Potenz von AT ausübt insbesondere auf zellulärer Ebene nur unzureichend erforscht. Genau diese Interaktion besitzt jedoch eventuell besondere klinische Bedeutung.

Ziel der vorliegenden kontrollierten *ex-vivo* Studie war daher die Charakterisierung möglicher Auswirkungen von aktiviertem Protein C beziehungsweise Antithrombin auf die Immunfunktion humaner Monozyten und Lymphozyten, denen ein „Priming“ durch Trauma vorausging. Daneben sollte die Frage einer möglichen Wechselwirkung von aPC und AT geklärt werden. Außerdem wurde der Einfluss von Heparin auf die beobachteten immunmodulatorischen Effekte von AT untersucht.

2 Material und Methode

2.1 Patientengut

Nach Zustimmung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München erfolgte im Zeitraum von 1. Dezember 2004 bis 31. März 2007 der Einschluss von zwölf viszeralchirurgischen (OP) sowie neun polytraumatisierten Patienten (PT). Als Vergleichskollektiv dienten zwölf gesunde Probanden (KO), von denen sich vier zusätzlich für die Versuche zur Klärung eines Einflusses von Heparin zur Verfügung stellten.

Fallzahlabeschätzung:

Im Vorfeld des Experiments wurden verschiedene Dosisfindungsexperimente (*Daten nicht abgebildet*) vorgenommen. Dabei wurde die Hypothese zugrundegelegt, dass AT suppressive und aPC eher stimulierende Wirkungen auf Immunzellen zeigt. Auf der Basis des jeweils stärksten Effektes in Abhängigkeit von der jeweiligen eingesetzten AT- oder aPC-Konzentration wurde mit dem Programm Sigma Stat eine Fallzahlberechnung für LPS und OKT3 stimulierte Ansätze vorgenommen. Die Fallzahl zum Erreichen von relevanten Unterschieden wurde aus den Mittelwerten der jeweiligen Zytokine mit $\alpha=0.05$ und $\beta=0.80$ unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichung berechnet. Je nach Zytokin und Stimulus variierte die erforderliche Fallzahl zwischen 2 und 17, wobei in der Regel eine Fallzahl von <10 ausreichte. Die festgelegte Fallzahl von 12 Patienten pro Gruppe stellt daher einen konservativen Ansatz für eine deskriptive Statistik dar.

2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Vor Aufnahme in die Studie erfolgte nach ausführlicher Aufklärung eine schriftliche Einverständniserklärung durch die Studienteilnehmer. Im Falle einer fehlenden Zustimmungsfähigkeit, z.B. bei Polytrauma mit Bewusstlosigkeit wurde eine mündliche und schriftliche Aufklärung der Patientenangehörigen vorgenommen, die entsprechend dem mutmaßlichen Willen des Patienten in die Studienteilnahme

- Material und Methode -

einwilligten. Sobald ein gesetzlicher Betreuer gerichtlich eingesetzt oder aber der Patient die Zustimmungsfähigkeit wieder erlangt hatte, wurde die formaljuristisch gültige Einverständniserklärung nachträglich eingeholt.

Als *gesunde Probanden* (KO) wurden Personen zwischen 18 und 75 Jahren ohne vorbestehende Erkrankungen eingeschlossen.

Als *chirurgische Patienten* (OP) kamen Personen mit ausgedehnten viszeralchirurgischen Operationen in Betracht, bei denen präoperativ keine Anzeichen einer systemischen Hyperinflammation beziehungsweise einer Störungen des Gerinnungssystems vorlagen.

Als *Polytrauma* (PT) galten nach der Definition von Tscherne und Trentz Patienten mit zur selben Zeit erlittenen Verletzungen unterschiedlicher Körperregionen, wobei mindestens eine dieser Verletzungen oder die Kombination der Verletzungen potentiell lebensbedrohlich sein mussten (Trentz et al., 1978). Um eine adäquate Gewebeschädigung unterstellen zu können, wurden nur Polytraumatisierte mit einem *Injury Severity Score* (ISS) von ≥ 16 Punkten entsprechend den Kodierrichtlinien des Traumaregisters der *Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie* (DGU) eingeschlossen. Der ISS ist ein anerkanntes und verlässliches Mittel zur Beurteilung der Verletzungsschwere und korreliert mit dem klinischem Outcome und darüber hinaus mit dem voraussichtlichem Auftreten von Komplikationen (Greenspan et al., 1985, Yates, 1990, Pories et al., 1991, Faist et al., 1988, Ertel et al., 1989). Er basiert auf einer Klassifizierung der einzelnen Verletzungen nach Schweregrad anhand der *Abbreviated Injury Scale* (AIS). Die Berechnung des ISS erfolgt durch Summierung der Quadrate der drei höchsten AIS Werte der jeweiligen Körperregion. Maximal können 75 Punkte erreicht werden (Baker et al., 1974, Baker und O'Neill, 1976).

Einen Überblick über die detaillierten Ein- und Ausschlusskriterien zeigt *Tabelle 3*.

Tabelle 3: Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien:

- Alter ≥ 18 und ≤ 75 Jahre
- Vorliegen einer gültigen Einverständniserklärung
- Polytrauma mit einem ISS ≥ 16 , oder
- Elektive OP in offener Technik:
 - Pankreaskopfresektion nach Whipple-Kaulsch
 - Leberteileresektion oder Hemihepatektomie

- Material und Methode -

- Hemikolektomie
- Abdomino-perineale Rektumexstirpation
- Gastrektomie
- Tiefe anteriore Rektumresektion
- Ösophagektomie

Ausschlusskriterien:

- Alter < 18 oder > 75 Jahre
- Verweigerung oder Rücknahme der Zustimmung durch den Patienten oder seine Angehörige
- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie
- Fehlende oder mangelnde Deutschkenntnisse
- Unterbringung in einer Anstalt auf Grund behördlicher oder gerichtlicher Anordnung
- Laparoskopische Operationen
- Präoperativ Zeichen der Akut-Phase-Reaktion (≥ 2 SIRS-Kriterien)
- Immunsuppressive Therapie
- Präoperativ Keimnachweis bei invasiver Infektion
- Bekannte Koagulopathien
- Chemo- und / oder Strahlentherapie weniger als sechs Wochen vor OP
- Interventionsbedürftige Blutung und / oder Transfusion von Blutprodukten weniger als sechs Wochen vor OP
- Chronische Wunden
- Schwere Stoffwechselentgleisung im Rahmen eines Diabetes mellitus
- Schwere Niereninsuffizienz
- Hämodynamische Instabilität
- Hämoglobingehalt < 7 g / dl, bzw. < 9 g / dl bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit
- Akuter Myokardinfarkt, bzw. instabile Angina pectoris
- Bestehende Schwangerschaft
- Relative Ausschlusskriterien sind Einnahme von Sexualsteroid-Antagonisten, orale Kontrazeption oder Hormonersatztherapie

2.1.2 Verlaufsdokumentation

Für alle Patienten wurde zur Quantifizierung des traumatischen Ereignis auf die physiologische Homöostase der *Simplified Acute Physiology Score II* (SAPS II) innerhalb der ersten 24h nach dem Ereignis bestimmt. Der SAPS II liefert verlässliche Angaben über Erkrankungsschwere und Letalitätsrisiko von Intensivpatienten. In die Berechnung des SAPS II fließen zwölf physiologische Parameter sowie Alter, Aufnahmegrund und drei gegebenenfalls vorliegende Erkrankungsentitäten ein (siehe *Tabelle 4*). Er umfasst Werte von 0 bis 163 (Le Gall et al., 1993).

Klinischer Verlauf und Immunstatus wurden kontinuierlich mit Hilfe standardisierter Dokumentationsbögen erfasst.

- Material und Methode -

Tabelle 4: SAPS II; maßgeblich sind die schlechtesten Werte in einem 24-Stunden-Zeitraum seit dem zur Intensiv-Aufnahme führenden Ereignis

Alter (Jahre)	Punkte bei abnormal niedrigen Werten				„normal“ <40	Punkte bei abnormal hohen Werten				
	<40 7	40-69 12	70-74 15	75-79 16		≥80 18				
Herzfrequenz (pro Min.)		<40 11	40-69 2		70-119	120-159 4	≥160 7			
Blutdruck (syst., mmHg)		<70 13	70-99 5		100-199	≥200 2				
Temperatur (°C)					<39,0	≥39,0 3				
nur bei Beatmung o. Pulmonalis-Katheder PaO ₂ (mmHg) / FiO ₂	<100 11	100-199 9	≥200 6		-					
Urinausscheidung (L/Tag)		<0,5 11	0,5-0,99 4		≥1,0					
Harnstoff (mg/dl) oder Harnstoff-Stickstoff (mg/dl)					<60 <28	60-179 28-83 6	≥180 ≥84 10			
Leukozyten (10 ³ /mm ³)			<1,0 12		1,0-19,9	≥20 3				
Kalium (mmol/L)			<3 3		3,0-4,9	≥5,0 3				
Natrium (mmol/L)			<125 5		125-144	≥145 1				
Serum Bikarbonat (mEq/L)		<15 6	15-19 3		≥20					
Bilirubin (mg/dl)					<4,0	4,0-5,9 4	≥6,0 9			
Glasgow Coma Scale (vor Sedierung)	<6 26	6-8 13	9-10 7	11-13 5	14-15					
Vorerkrankungen					-	metastas. Karzinom 9	maligne hämatolog. Erkr. 10		AIDS 17	
Zuweisung auf ICU					elektiv chirurgisch	medizinisch (ohne OP) 6	ungeplant chirurgisch 8			

2.1.3 Demographische Daten

Das Durchschnittsalter der gesunden Probanden betrug 39 ± 4 Jahre (M:F 1,4) beziehungsweise 34 ± 4 Jahre (M:F 3,0) für die Heparin Versuche.

Das mittlere Alter der operierten Patienten (M:F 1,4) betrug 60 ± 2 Jahre. Der mittlere SAPS II-Score lag bei 28 ± 3 Punkten, die durchschnittliche OP-Dauer betrug 248 ± 26 Minuten. Die Patienten waren im Schnitt 13 ± 1 Tage hospitalisiert, bei einem Aufenthalt von 1 ± 1 Tagen auf der *Intensivstation* (ICU). Ein SIRS trat bei sieben Patienten auf (Dauer 1 ± 1 Tage). Zu septischen Komplikationen und MOV kam es bei einem Patienten. Bei einem Patienten wurde auf Grund einer Nahtdehiszenz am fünften postoperativen Tag ein sekundärer Bauchdeckenverschluss nötig. Eine Patientin schied auf eigenen Wunsch vor der letzten Blutentnahme aus.

Polytraumatisierte Patienten (M:F 3,5) waren im Schnitt 61 ± 7 Jahre alt. Der mittlere ISS Wert lag bei 32 ± 3 Punkten, der durchschnittliche SAPS II-Score betrug 47 ± 5 Punkte. Die Liegezeit lag bei 30 ± 10 Tagen, mit einer Intensivstationsverweildauer von 26 ± 7 Tagen. Die Mortalität lag bei 22 %. Zu

- Material und Methode -

septischen Komplikationen kam es bei sieben Patienten, ein MOV trat bei sechs Patienten auf. Die demographischen Daten der einzelnen Patienten beider Subgruppen zeigen *Tabelle 5* und *Tabelle 6*.

Tabelle 5: Demographische Daten der viszeralchirurgischen Patienten (OP)

OP-Nr.	Alter (Jahre)	Sex (M/W)	Eingriff	SAPS II (Punkte)	OP-Dauer (Min.)	Liegezeit (Tage)	ICU (Tage)	Verlauf
1	67	M	Leberteilresektion	41	264	8	2	regelhaft
2	60	M	Gastrektomie	27	274	11	0	regelhaft
3	67	M	Rektumresektion	33	233	14	0	regelhaft
4	64	M	Ösophagektomie	38	415	16	10	Sepsis, MOV
5	57	F	Hemikolektomie	16	55	15	0	regelhaft
6	55	M	Ösophagektomie	22	281	21	4	Sepsis
7	60	F	Gastrektomie	37	263	15	0	regelhaft
8	75	M	Transversumresektion	12	187	9	0	regelhaft
9	52	F	Gastrektomie	23	219	16	0	regelhaft
10	55	F	Hemihepatektomie	14	240	11	0	regelhaft
11	51	M	Hemihepatektomie	18	294	9	0	regelhaft
12	62	F	Gastrektomie	36	N/A	14	1	regelhaft

N/A: nicht verfügbar

Tabelle 6: Demographische Daten der Polytraumatisierten (PT)

PT-Nr.	Alter (Jahre)	Sex (M/W)	ISS (Punkte)	SAPS II (Punkte)	Liegezeit (Tage)	ICU (Tage)	Verlauf	Tod (Tag)
1	49	M	25	N/A	N/A	18	N/A	nein
2	45	M	34	52	79	54	Sepsis, MOV	nein
3	70	F	34	70	7	7	Sepsis, MOV	7
4	77	F	22	41	61	61	Sepsis, MOV	nein
5	77	M	45	48	28	28	Sepsis, MOV	nein
6	82	M	30	54	3	3	MOV	3
7	65	M	29	22	8	7	Sepsis	nein
8	20	M	48	48	21	21	Sepsis	nein
9	65	M	24	43	35	35	Sepsis, MOV	nein

N/A: nicht verfügbar

2.2 Geräte und Material

2.2.1 Geräte

- Brutschränke: B 5060 EC-CO₂ und KB 600 K CO₂, beide Fa. Heraeus, Hanau.
- Durchflusszytometer: Coulter Epics XL mit Software EXPO32 ADC der Fa. Beckman Coulter, Fullerton (CA), USA.
- Gefrierschrank: UF 85-300 S der Fa. Colora Messtechnik, Lorch.
- Kreisschüttler: VF2 der Fa. IKA-Werke, Staufen.
- Multiplex: Bio-Plex Suspension Array System 100 der Fa. Bio-Rad Laboratories, Hercules (CA), USA.
- Pipetten: Research 10, 100, 1000 sowie elektronische Pipettierhilfe Easypet und Dispenser Multipette plus, alle Fa. Eppendorf, Hamburg.
- Rotor: CMV-1 der Fa. Labortechnik Fröbel, Lindau.
- Schüttler: IKA MTS 2 der Fa. Bachofer, Reutlingen.
- Sicherheitssterilwerkbank: BSB 6, Klasse II der Fa. Flow Laboratories, Meckenheim.
- Vakuum-Pumpe: Fa. Bio-Rad Laboratories, Hercules (CA), USA.
- Zählkammer nach Neubauer: Tiefe 0,1mm, Fläche 0,0025 mm² Kat.-Nr. 718605 der Fa. Brand, Wertheim.
- Zentrifugen: Rotanta 460 R und Rotanta/S, beide Fa. Hettich, Tuttlingen.

2.2.2 Basischemikalien, Puffer und Lösungen

- Ficoll-Medium: Biocoll Separating Solution, endotoxingetestet, Dichte 1,077 g / ml, Kat.-Nr. L 6115 der Fa. Biochrom, Berlin.
- Erythrozyten-LysemEDIUM: Hämolyse-Puffer, pH 7,3 (Ammoniumchlorid 82,90 g, Kaliumhydrogencarbonat 10,00 g, Tetra-Natrium-EDTA 0,37 g, gereinigtes Wasser ad 1000 ml), Apotheke Klinikum Innenstadt, Gebrauchsverdünnung 1:10 in aqua dest.
- Hanks gepufferte Salzlösung (HBSS): GIBCO Hanks' Balanced Salt Solution, Kat.-Nr. 24020-091 der Fa. Invitrogen, Carlsbad (CA), USA.
- Natriumazid (NaN₃), reinst, Kat.-Nr. 106688 der Fa. Merck, Darmstadt.

- Material und Methode -

- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS): PBS-Lösung, pH 7,2 (Natriumchlorid 5,48 g, di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat 10,12 g, Kaliumdihydrogenphosphat 2,28 g, Wasser für Injektionszwecke ad 1000 ml), Apotheke Klinikum Innenstadt.
- Zellkulturmedium: GIBCO AIM V Serum Free Lymphocyte Medium (with L-glutamine, , steril, Kat.-Nr. 12055-091 der Fa. Invitrogen, Carlsbad (CA), USA.

2.2.3 Verbrauchsmaterialien

- Aufbewahrungsröhrchen: Nunc CryoTube Vials 1,0 ml SI, conical bottom, steril, Kat.-Nr. 366656 der Fa. Nunc, Roskilde, DK.
- Gewebekulturplatte: Zellkultur Multiwellplatte, 24 well, steril, mit Abdeckplatte, Kat.-Nr. 662160 der Fa. Greiner Bio-One, Kremsmünster, A.
- Mikrotiterplatte: Fa. Bio-Rad Laboratories, Hercules (CA), USA.
- Monovetten: S-Monovette 7,5 ml Na-Heparin, Kat.-Nr. 01.1613.100, steril der Fa. Sarstedt, Nümbrecht.
- Pipettenspitzen: Pipette mit Spitze 25/10 ml, steril, pyrogenfrei, Kat.-Nr. 760180/607180 der Fa. Greiner Bio-One, Kremsmünster, A; epTIPS 1000/200/20 µl Biopur, steril, pyrogenfrei, Kat.-Nr. 0030.075.064/.021/.005 und epTIPS 1000/200 Standard, Kat.-Nr. 0030.000.919/.870 sowie Combitips plus 10 ml Biopur, steril, pyrogenfrei, Kat.-Nr. 0030.069.463, alle Fa. Eppendorf, Hamburg.
- Rundbodenröhrchen: BD Falcon Polystyrene Round-Bottom Test Tube, 5 ml, steril, Kat.-Nr. 352052 der Fa. BD Biosciences, San Jose (CA), USA.
- Zellkulturröhrchen: BD Falcon Polystyrene Round-Bottom Test Tube, 14 ml, snap cap, steril, Kat.-Nr. 352001 der Fa. BD Biosciences, San Jose (CA), USA.
- Zentrifugenröhrchen: PP-Röhrchen mit konischem Boden, 50 ml, Schraubverschluss, steril, Kat.-Nr. 227261 der Fa. Greiner Bio-One, Kremsmünster, A.

2.3 Probenentnahme

Blutentnahmen erfolgten 24 Stunden (D1), 72 Stunden (D3) und 192 Stunden (D7) nach Trauma bzw. operativem Eingriff. Von elektiv operierten Patienten wurde zusätzlich am Tag vor dem geplanten Eingriff (D-1) Blut entnommen. Von den Probanden wurde jeweils zu einem Zeitpunkt Untersuchungsmaterial gewonnen. Zu jedem Abnahmezeitpunkt erfolgte die Gewinnung von 45 ml Vollblut in Natrium-Heparin Monovetten.

2.4 Gewinnung mononukleärer Leukozyten (PBMC)

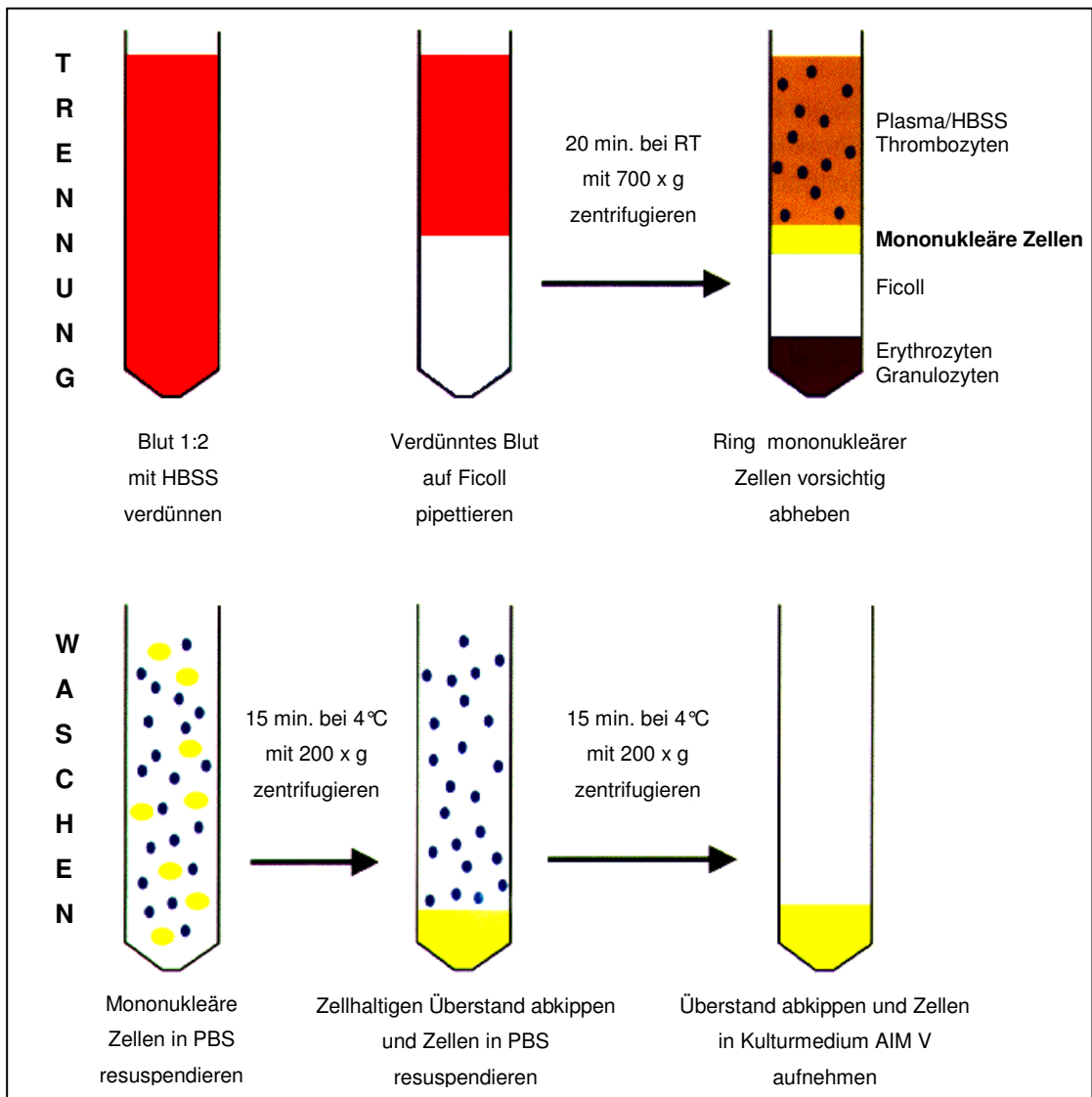
Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC), im Wesentlichen Monozyten und Lymphozyten, wurden mittels Ficoll-Separation gewonnen. Das Prinzip der Ficoll-Trennung beruht auf einer Dichtegradienten-Zentrifugation (Boyum, 1968) welche in *Abbildung 4* veranschaulicht ist.

Blut wurde hierbei zunächst mit *Hanks gepufferter Salzlösung* (HBSS) zu gleichen Teilen verdünnt und im Anschluss auf die Ficoll-Phase in einem Zentrifugenröhrchen geschichtet. Ficoll-Medium besitzt eine spezifische Dichte von 1,077 g / ml. Auf Grund unterschiedlicher Dichtewerte der einzelnen korpuskulären und plasmatischen Blutkomponenten ist mittels Zentrifugation eine Separation mononukleärer Zellen möglich. Diese sammeln sich ringförmig in der sogenannten Interphase zwischen Ficoll-Lösung und plasmatischem Überstand. Erythrozyten und Granulozyten bilden bedingt durch ihre höhere Dichte das Zellsediment. Nach Abpipettieren des Überstands wurde die Interphase vorsichtig abgehoben und in ein neues Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Im folgenden Schritt wurden die PBMC durch Waschen mit *Phosphat gepufferter Salzlösung* (PBS) von Zellresten und zytotoxischem Ficoll-Medium gereinigt. Dazu wurde die PBMC-haltige *Zellsuspension* (ZS) zweimalig mit PBS aufgefüllt, zentrifugiert und die resultierenden Überstände verworfen. Zuletzt erfolgte die Resuspension in 1 ml serumfreies Zellkulturmedium AIM V. Hierzu muss bemerkt werden, dass sich die Zellsuspension auch durch mehrmaliges Waschen nicht völlig von Verschmutzungen befreien lässt. Insbesondere Verunreinigungen durch Erythrozyten werden bei schwer traumatisierten Patienten regelmäßig beobachtet

- Material und Methode -

und können die durchflusszytometrische Messung ungünstig beeinflussen. Daher wurde im Zuge der späteren Oberflächenfärbung ein Erythrozyten-Lysemedium (Hämolyse-Puffer, s.u.) verwendet. Abschließend erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bei zwanzigfacher Verdünnung mit 3 prozentiger Essigsäure. Hiervon ausgehend wurden die PBMC auf eine Konzentration von $1,1 \times 10^6$ Zellen / ml unter Verwendung von AIM V eingestellt.

Abbildung 4: Prinzip der Ficoll-Separation; nach S. Zedler (Zedler, 2003)



RT: Raumtemperatur

2.5 Durchflusszytometrische Bestimmung des Immunstatus

2.5.1 Grundlagen

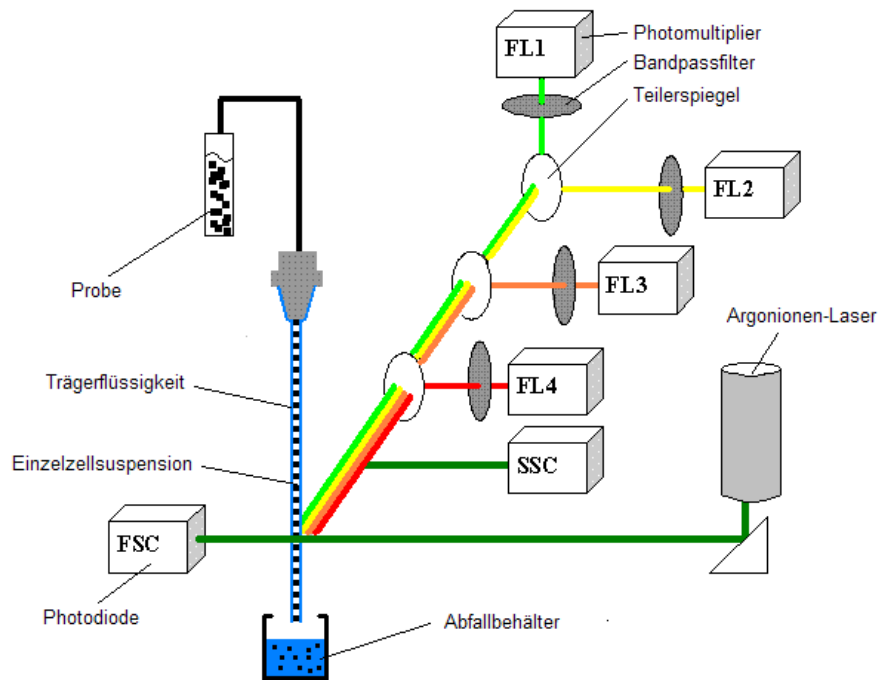
Durchflusszytometrische Verfahren erlauben Untersuchungen auf Einzelzellebene. Es werden hierfür optische Messtechniken eingesetzt die eine Unterscheidung der betrachteten Zellen anhand physikalischer Merkmale und immunbiochemischer Parameter erlauben. Dabei ist eine gleichzeitige (multiparametrische) Analyse von fluoreszenzmarkierten Oberflächenmarkern der einzelnen Zelle zur exakten Differenzierung möglich.

In dem für diese Studie verwendeten Durchflusszytometer werden mittels einer Trägerflüssigkeit die in Suspension befindlichen Zellen der zentralen Messeinheit (Flusszelle) kontinuierlich einzeln zugeführt (hydrodynamische Fokussierung). Die Auflösung liegt bei einem Zelldurchmesser von 0,5 bis 40 μm . In der Flusszelle erfolgt die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) einheitlich mittels gleichphasigem Argonionenlaser bei 488 nm. Durch die Absorption der Lichtenergie kommt es in unmittelbarer Folge zur Abgabe von spezifischen Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome (Stokes'scher shift). Die emittierten Wellenlängen werden mittels dichroter Teilerspiegel und Bandpassfilter entsprechend der unterschiedlichen Frequenzspektren (FITC: 525 nm, PE: 575 nm, ECD: 620 nm, PC5: 675 nm) aufgetrennt und zur Detektion an vier Hochleistungs-Fluoreszenzverstärkerröhren (FL1-4, Empfindlichkeit: 200 – 800 nm) geleitet. Durch kovalente Bindung der Fluorochrome an spezifische Antikörper (Ak-Fluorochrom-Konjugate) gegen zelluläre Oberflächenmarker sind letztere identifizierbar. Darüber hinaus sind durch Registrierung des Streulichtanteils Aussagen über morphologische Eigenschaften der Zelle möglich. Hierfür stehen zwei Photodioden zur Verfügung, welche zum einen vorwärts zur Richtung des Laserstrahls (Forward Scatter, FSC), als auch 90° seitwärts hierzu (Side Scatter, SSC) gestreutes Licht wahrnehmen. Vereinfacht dargestellt erlaubt der FSC Angaben über die Zellgröße, der SSC über die Granularität der Zellen. Hierdurch ist eine Eingrenzung von Leukozytensubpopulationen möglich (Gating). Auf Grund der geringeren Intensität von SSC und Fluoreszenz ist für beide Signale eine Verstärkung nötig. Diese hat in Abhängigkeit der Dynamik (Umfang) des Messbereichs linear oder logarithmisch zu erfolgen. Daneben erfolgt eine Impulskoordination um zeitversetzte Signale durch

- Material und Methode -

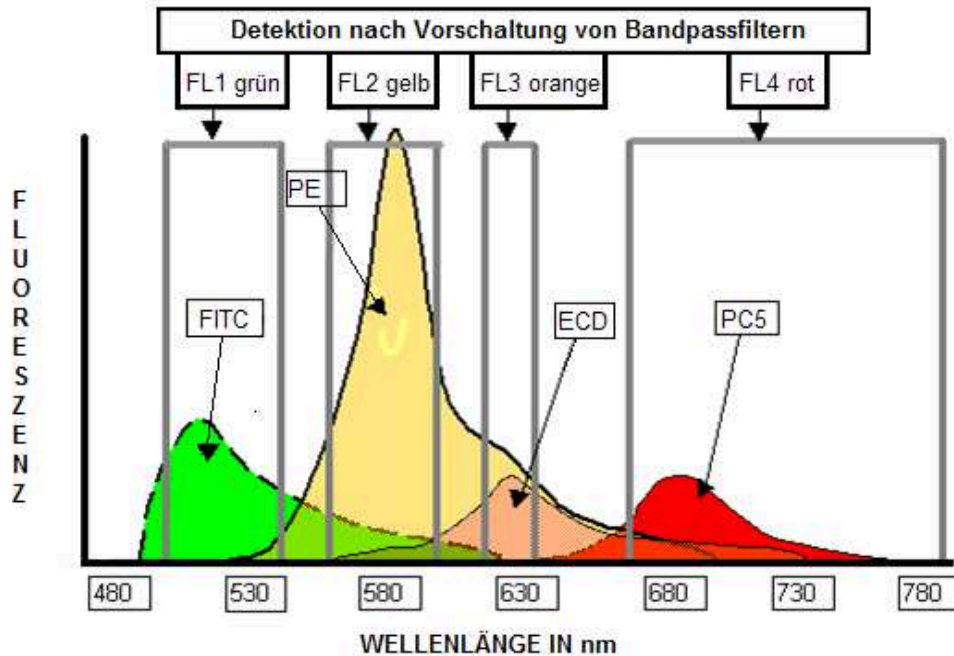
Festlegung von sogenannten Koinzidenzzeiten einer einzelnen Zelle zuordnen zu können. Über einen Analog- / Digitalwandler werden die in Volt gemessenen Impulse dann in Lichtintensitäten umgewandelt. Die Weiterverarbeitung der gewonnenen Daten erfolgt rechnergestützt (Raffael et al., 1994). Einen Überblick über die Funktionsweise des Durchflusszytometers liefern *Abbildung 5* und *Abbildung 6*.

Abbildung 5: Funktionsprinzip des Durchflusszytometers; nach B. J. Holz knecht (Holzknecht, 2003)



- Material und Methode -

Abbildung 6: Diskriminierung der Fluorochrome unter Verwendung von Bandpassfiltern; nach Shapiro (Shapiro, 1995)



2.5.2 Kompensation der Fluoreszenzüberlappung

Wie aus *Abbildung 6* hervorgeht überlappen sich die Emissionsspektren der Fluorochrome trotz Verwendung von Teilerspiegeln und Bandpassfiltern teilweise. Dies macht eine elektronische Kompensation am Durchflusszytometer erforderlich, welche im Wesentlichen aus einer Subtraktion der unerwünscht gemessenen Signalintensität besteht. Ohne diese Korrektur würden „falsch hohe“ Fluoreszenzen registriert werden. Eine fehlerhafte Phänotypisierung der untersuchten Zelle wäre die Folge. Das Ausmaß der Kompensation ist dabei für jede Photoverstärkerröhre getrennt regelbar. Mittels Einstellmöglichkeiten am Durchflusszytometer wird hierfür der Anteil des registrierten Fremdspektrums anhand der Daten des zugehörigen Photomultipliers definiert und vom ursprünglichen Signal subtrahiert. Für die Berechnung der Intensität von FITC beispielsweise $FL1 - \%FL2$ bei linearer Kompensation.

2.5.3 Verwendete Antikörper-Fluorochrom-Konjugate

Bei den durchgeführten Untersuchungen handelt es sich um eine Dreifach- und eine Vierfachfärbung gegen Oberflächenantigene von mononukleären Zellen. *Tabelle 7* zeigt die verwendeten, kommerziell erhältlichen Antikörper sowie deren Konjugate.

Tabelle 7: Für die Untersuchung verwendete Antikörper gegen Oberflächenantigene

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugat	Spezies	Hersteller
CD45	Immu19.2	IgG1	PC5	Maus	Immunotech
CD3	UCHT1	IgG1	PE	Maus	Immunotech
CD14	RMO52	IgG2a	FITC	Maus	Immunotech
CD14	RMO52	IgG2a	ECD	Maus	Immunotech
CD16	3G8	IgG1	FITC	Maus	Immunotech
HLA-DR	Immu357	IgG1	PC5	Maus	Immunotech
TLR4	HTA125	IgG2a	Biotin	Maus	Serotec

Die Dreifachfärbung erfolgte mit CD45-PC5, CD3-PE und CD14-FITC. Für die Vierfachfärbung kamen CD16-FITC, CD14-ECD, HLA-DR-PC5 und TLR4-Biotin zum Einsatz. Biotin (Vitamin B₇ bzw. H; chem. Formel C₁₀H₁₆N₂O₃S) selbst ist kein Fluorochrom sondern wird in einem zusätzlichen Inkubationsschritt von PE-markiertem Streptavidin (STREPTAVIDIN:RPE, Fa. Serotec) gebunden. Streptavidin, ein Tetramer gewonnen aus *Streptomyces avidinii*, besitzt auf Grund seiner molekularen Struktur vier hochaffine Bindungsstellen für Biotin. Da der Primärantikörper (hier Anti-TLR4) mit mehreren Molekülen Biotin beladen ist, wird eine Signalverstärkung und höhere Sensitivität erreicht.

Allen eingesetzten Farbstoffen gemein ist das Exzitationsmaximum nahe 488 nm. Im Falle von FITC (Fluoresceinisothiocyanat) und PE (R-Phycoerythrin) handelt es sich um klassische Fluorochrome. Demgegenüber fanden mit ECD (PE / Texas Red) und PC5 (PE / Cyan 5) zwei sogenannte Tandemkonjugate Verwendung. Bei diesen sind zwei Farbstoffe aneinander gekoppelt, von denen das Emissionsspektrum des Ersten die Absorptionsenergie des Zweiten liefert. Hierdurch erhöht sich der Stokes'sche Shift und das Emissionsmaximum wird

- Material und Methode -

insgesamt in den langwelligeren Bereich verschoben. Einen Überblick der einzelnen Fluorochrome gibt *Tabelle 8*.

Tabelle 8: Spezifität der einzelnen Fluorochrome

Fluorochrom	Emissionsmaximum	Hauptfarbanteil	Photomultiplier
FITC	525 nm	Grün	FL1
PE	575 nm	Orange-Rot	FL2
ECD	613 nm	Rot	FL3
PC5	670 nm	Dunkelrot	FL4

2.5.4 Färbung der leukozytären Oberflächenmarker

Von der auf $1,1 \times 10^6$ Zellen / ml eingestellten Zellsuspension wurden zur Herstellung der beiden Immunfluoreszenzfärbungen jeweils 50 μ l in Rundbodenröhrchen pipettiert. Dem ersten Röhrchen wurden daraufhin jeweils 5 μ l CD45-PC5, CD3-PE und CD14-FITC zugegeben, dem zweiten je 5 μ l CD16-FITC, CD14-ECD, HLA-DR-PC5 sowie TLR4-Biotin. Nach kurzem Schütteln folgte ein erster Inkubationsschritt für 20 Minuten bei 4° Celsius unter Lichtabschluss. Anschließend wurden die Röhrchen mit PBS-NaN₃ (0,1 prozentig) aufgefüllt und für 10 Minuten bei 4° Celsius und 1200 *Umdrehungen pro Minute* (U / min) zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstands wurde der Vierfachfärbung 5 μ l Streptavidin-PE zugegeben, geschüttelt und erneut für 15 Minuten inkubiert. Zur weiteren Reduktion von Verunreinigungen wurde anschließend beiden Ansätzen je 2 ml Hämolyse-Puffer zugesetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur und Abdunkelung inkubiert. Danach erneut Auffüllen mit PBS-NaN₃ und Zentrifugation. Im Anschluss Abkippen, sparsame Zugabe von 0,9 prozentiger Natriumchlorid-Lösung und Schütteln. Abschließend Messung im Durchflusszytometer.

2.5.5 Analyse

Durch entsprechendes Gating erlaubt die Dreifachfärbung die Differenzierung der Leukozytenpopulation und somit Aussagen über die relativen Anteile von

- Material und Methode -

Lymphozyten und Monozyten innerhalb der PBMC-Fraktion. Die Vierfachfärbung gibt Aufschluss über die HLA-DR und TLR4 Expression auf Monozyten. Die dem Zytometer zugehörige Software berechnet hierfür mittels einfacher statistischer Verfahren aus den gemessenen Einzelwerten weiterverwertbare Daten. Als Maß für die Expressionsstärke von HLA-DR und TLR4 wurde bei vorliegender Studie der Median der Einzelwerte herangezogen. Dieser ist zur Erfassung von Unterschieden zwar weniger empfindlich, zeichnet sich aber durch eine gewisse Unempfindlichkeit gegenüber systembedingten „Ausreißern“ aus.

2.6 Herstellung der Versuchsansätze

2.6.1 Präinkubation der PBMC mit aPC und AT

Es wurden 28 Versuchsansätze mit insgesamt sieben unterschiedlichen Konzentrationen der untersuchten Gerinnungsinhibitoren hergestellt. Hierfür wurden zunächst je 900 µl Zellsuspension in 28 Zellkulturröhrchen gefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe definierter Mengen von aktiviertem Protein C (XIGRIS[®], Drotrecogin alfa (aktiviert), 2 mg / ml Aqua dest., Fa. Lilly Pharma, Giessen), Antithrombin (Kybernin[®] HS 500, Antithrombin III, 500 *Internationale Einheiten* (IE) / ml AIM V, Fa. Aventis Behring, Marburg) oder Kombinationen beider Substanzen. Für die Ansätze mit niedrigen Dosen an Gerinnungsinhibitoren war vor Zugabe der Ausgangskonzentrate noch eine Vorverdünnung mit AIM V nötig. Anschließend Auffüllen aller Ansätze mit AIM V auf 1 ml. Hierdurch ergaben sich Endkonzentrationen von 4 beziehungsweise 100 µg pro ml für aPC und 1 beziehungsweise 20 IE pro ml für AT (im Folgenden aPC4 und aPC100 sowie AT1 und AT20). In zwei weiteren Reihen wurden Kombinationen aus aPC4 und AT1 sowie aPC100 und AT20 hergestellt. Eine Versuchsreihe diente als Kontrolle (Ø). Die endgültige Zellzahl lag bei 1×10^6 Zellen pro ml. Das exakte Pipettierschema zeigt *Tabelle 9*. Vor Stimulation wurden die Ansätze für eine Stunde rotierend präinkubiert.

- Material und Methode -

Tabelle 9: Identische Reihen der Versuchsansätze vor Stimulation

aPC4	900 µl ZS + 10 µl aPC (0,4mg/ml) + 90 µl AIM V	900 µl ZS + 10 µl aPC (0,4mg/ml) + 90 µl AIM V	900 µl ZS + 10 µl aPC (0,4mg/ml) + 90 µl AIM V	900 µl ZS + 10 µl aPC (0,4mg/ml) + 90 µl AIM V
aPC100	900 µl ZS + 50 µl aPC (2mg/ml) + 50 µl AIM V	900 µl ZS + 50 µl aPC (2mg/ml) + 50 µl AIM V	900 µl ZS + 50 µl aPC (2mg/ml) + 50 µl AIM V	900 µl ZS + 50 µl aPC (2mg/ml) + 50 µl AIM V
AT1	900 µl ZS + 10 µl AT (100IE/ml) + 90 µl AIM V	900 µl ZS + 10 µl AT (100IE/ml) + 90 µl AIM V	900 µl ZS + 10 µl AT (100IE/ml) + 90 µl AIM V	900 µl ZS + 10 µl AT (100IE/ml) + 90 µl AIM V
AT20	900 µl ZS + 40 µl AT (500IE/ml) + 60 µl AIM V	900 µl ZS + 40 µl AT (500IE/ml) + 60 µl AIM V	900 µl ZS + 40 µl AT (500IE/ml) + 60 µl AIM V	900 µl ZS + 40 µl AT (500IE/ml) + 60 µl AIM V
aPC4 / AT1	900 µl ZS + 10 µl aPC (0,4mg/ml) + 10 µl AT (100IE/ml) + 80 µl AIM V	900 µl ZS + 10 µl aPC (0,4mg/ml) + 10 µl AT (100IE/ml) + 80 µl AIM V	900 µl ZS + 10 µl aPC (0,4mg/ml) + 10 µl AT (100IE/ml) + 80 µl AIM V	900 µl ZS + 10 µl aPC (0,4mg/ml) + 10 µl AT (100IE/ml) + 80 µl AIM V
aPC100 / AT20	900 µl ZS + 50 µl aPC (2mg/ml) + 40 µl AT (500IE/ml) + 10 µl AIM V	900 µl ZS + 50 µl aPC (2mg/ml) + 40 µl AT (500IE/ml) + 10 µl AIM V	900 µl ZS + 50 µl aPC (2mg/ml) + 40 µl AT (500IE/ml) + 10 µl AIM V	900 µl ZS + 50 µl aPC (2mg/ml) + 40 µl AT (500IE/ml) + 10 µl AIM V
∅	900 µl ZS + 100 µl AIM V	900 µl ZS + 100 µl AIM V	900 µl ZS + 100 µl AIM V	900 µl ZS + 100 µl AIM V

Präinkubation 1h

Präinkubation 1h

Präinkubation 1h

Präinkubation 1h



Inkubation 20h
+ LPS

Inkubation 20h
- LPS

Inkubation 72h
+ OKT3

Inkubation 72h
- OKT3

2.6.2 Rationale zur Dosisfindung von aPC und AT

Als Grundlage der oben genannten Konzentrationen dienten die in der Literatur beschriebenen Spiegel bzw. Aktivitäten von aPC und AT. Yan nennt eine physiologische Plasmakonzentration von nicht aktiviertem Protein C um 4 µg pro ml (Yan und Dhainaut, 2001). Aus praktischen Erwägungen sind wir somit von einer maximal möglichen Konzentration von 4 µg pro ml aPC in vivo ausgegangen. Für Antithrombin zeigten Dolan et al. in einer Untersuchung an 9648 gesunden

- Material und Methode -

Blutspendern, dass die physiologische Plasmaaktivität von AT um 1 IE pro ml liegt (Dolan et al., 1994).

Zur Beurteilung von Effekten durch pharmakologisch herbeigeführte, supraphysiologische Dosierungen in diesem Modell wurden für aPC und AT die Konzentrationen entsprechend der im Vorfeld durchgeführten Dosisfindungsexperimente festgelegt. Sie liegen um ein Mehrfaches über den physiologischen Spiegel. Unter dem Einfluss von aPC100 und AT20 zeigten im Vorfeld durchgeführte Dosisfindungsexperimente relevante Effekte auf die Zytokinfreisetzung (Daten nicht gezeigt), ohne jedoch, wie teilweise für noch höhere Konzentrationen beobachtet, zu einer kompletten Immunparalyse zu führen. Anhand der beobachteten Effekte bei den gewählten aPC- und AT-Konzentrationen wurde die Fallzahlschätzung vorgenommen.

2.6.3 Herstellung der Heparin-Ansätze

Mit dem Ziel, den beobachteten AT-Effekt auf die Immunzellen mit Heparin zu antagonisieren, wurde zusätzlich aus dem Vollblut vier gesunder Probanden weitere Versuchsansätze hergestellt. Hierfür wurden aus der nach obiger Beschreibung gewonnenen Zellsuspension zunächst zwei Verdünnungsreihen Heparin hergestellt. In einem zweiten Schritt wurden dann für die Ansätze einer dieser Reihen einheitlich 20 IE Antithrombin pro ml eingestellt. Anschließend wurde analog der oben beschriebenen Versuche für eine Stunde präinkubiert. Die endgültigen Konzentrationsverhältnisse zeigt *Tabelle 10*. Die anschließende Stimulation der insgesamt 14 Proben erfolgte für 20 Stunden mit LPS. Ein zusätzlicher Ansatz diente als Negativkontrolle.

Tabelle 10: Schema des Heparin-Versuchs

+ AT20 H0	+ AT20 H5	+ AT20 H10	+ AT20 H25	+ AT20 H40	+ AT20 H100	+ AT20 H200	1h →	20h + LPS
∅ AT20 H0	∅ AT20 H5	∅ AT20 H10	∅ AT20 H25	∅ AT20 H40	∅ AT20 H100	∅ AT20 H200	1h →	20h + LPS
∅ AT20 H0							1h →	20h - LPS

H: Heparin in IE / ml

2.6.4 Induktion der inflammatorischen Antwort

2.6.4.1 Stimulation der monozytären Zelllinie mit Lipopolysaccharid (LPS)

Den zu stimulierenden Ansätzen wurden jeweils 10 µl Lipopolysaccharid (LPS, 1 mg / ml HBSS, 0127:B8, Lot: 104K4036, Fa. Sigma-Aldrich, Saint Louis (MO), USA) zugegeben, sodass eine Endkonzentration von 10 µg LPS pro ml resultierte (siehe auch Abschnitt 1.2.3). Anschließend wurden die Ansätze zusammen mit einer nicht stimulierten Reihe für 20 Stunden rotierend im Brutschrank inkubiert.

2.6.4.2 Aktivierung der lymphozytären Zelllinie mit OKT3

Zur Aktivierung der lymphozytären Zelllinie wurden zunächst sieben innenliegende Vertiefungen einer 24-well-Gewebekulturplatte mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD3 (OKT3) gecoated (siehe auch Abschnitt 1.2.3). Hierzu wurden je 300 µl OKT3-Lösung in die Wells pipettiert und dann zunächst für eine Stunde vorinkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Lösung vorsichtig abgezogen und abschließend zweimal mit PBS sowie einmal mit AIM V gewaschen. In die so präparierten Wells wurden dann die einzelnen Ansätze pipettiert und für 72 Stunden in einem zweiten Brutschrank inkubiert. Analog zur LPS-Stimulation dienten Proben in einer nicht gecoateden Kulturplatte als Kontrollen.

2.6.5 Separation der zellfreien Überstände

Nach Abschluss der Inkubation wurden die Proben in Rundbodenröhrchen umgefüllt und bei 1200 U / min und 4° C für 20 Minuten zentrifugiert. Die resultierenden zellfreien Überstände wurden zu zehn Einzelproben à 80 µl aliquotiert. Diese wurden bis zur endgültigen Messung bei Minus 80° C kryogelagert.

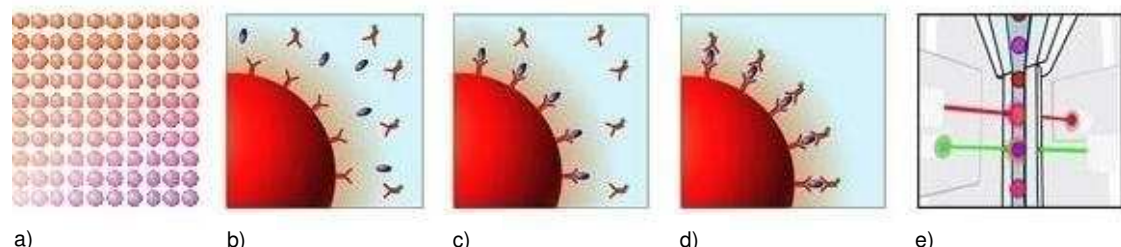
2.7 Messung mit dem Multiplex-Zytokin-Assay

2.7.1 Funktionsweise des Multiplex-Systems

Die von uns untersuchten Zytokine wurden mit dem Bio-Plex Suspension Array System der Firma Bio-Rad gemessen. Dieses arbeitet nach dem Prinzip eines modifizierten Sandwich-Immunoassays (siehe *Abbildung 7*), wodurch die simultane Messung von bis zu 100 Analysaten aus einer einzelnen Kavität einer 96-well-Mikrotiterplatte ermöglicht wird.

Hierfür sind zytokinspezifische monoklonale Antikörper an unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Polystyrolkugeln, sogenannte Beads (a), kovalent gebunden (b). Dies ermöglicht die charakteristische Bindung der Beads an das jeweils zugehörige Zytokin (c). In einem zweiten Schritt bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper an Epitope der zu messenden Zytokine (d). Nach Zugabe von Streptavidin-PE und Ausbildung einer Streptavidin-Biotin-Bindung erfolgt die Messung nach dem durchflusszytometrischen Prinzip (e). Die zytokinbesetzten Beads werden in einem automatisierten Prozess der Flusszelle im Multiplex-System einzeln zugeführt. Hier erfolgt die Klassifikation der Beads mit Hilfe eines roten Lasers (635nm), während die Fluoreszenz des gebundenen Sekundärantikörpers unter Verwendung eines grünen Lasers (532nm) bestimmt wird. Die Kombination ermöglicht die Erkennung und Quantifizierung der untersuchten Zytokine.

Abbildung 7: Prinzip des modifizierten Sandwich-Immunoassays; Quelle: Bio-Rad Laboratories



- Material und Methode -

2.7.2 Protokoll der Multiplex-Messung

Bei LPS stimulierten Proben wurden mittels eines 2-Plex die Spiegel der beiden Zytokine TNF- α und IL-10 gemessen. Für OKT3 aktivierte Zellüberstände wurde ein 3-Plex durchgeführt und die Konzentrationen von IL-6, IL-13 sowie IFN- γ bestimmt. Sämtliche Messungen erfolgten mit Reagenzien aus kommerziell erhältlichen Standard-Kits der Fa. Bio-Rad. Diese enthielten entsprechend dem Messvorhaben zusammengestellte „Bead-Solutions“ (Anti-Human TNF- α und IL-10 beziehungsweise IL-6, IL-13 und IFN- γ conjugated beads) sowie „Zytokin-Standards“. Die Durchführung der Multiplex-Messungen erfolgte gemäß den Hersteller-Anweisungen. Sie unterscheiden sich für die beiden Stimulationsarten (LPS respektive OKT3) nur in der Art der verwendeten Beads sowie Standards. Das Verfahren wird im Folgenden protokollarisch dargestellt:

- Resuspendieren des lyophilisierten Zytokin-Standards in 500 μ l AIM V und Inkubation für 30 min auf Eis.
- Herstellung einer Standard-Verdünnungsreihe (1:4).
- Verdünnung von 240 μ l „25x Stock Beads“ in 5760 μ l Bio-Plex Assay Buffer bei vollständiger Verwendung einer 96-well-Mikrotiterplatte.
- Zweimaliges Befeuchten und Absaugen von 100 μ l Assay Buffer je Well der Mikrotiterplatte mittels Vakuum-Pumpe bei permeablem Plattenboden.
- Zugabe von 50 μ l verdünnter Bead-Solution pro Well.
- Absaugen der flüssigen Phase (Beads verbleiben in den Wells).
- Zweimaliges Waschen mit je 100 μ l Bio-Plex Wash Buffer.
- Auftragen von 50 μ l der Standardverdünnungen beziehungsweise der Proben.
- Lichtgeschützte Inkubation auf dem Schüttler für zunächst 30 Sekunden bei 1100 U / min und anschließend für 30 Minuten bei 300 U / min.
- Anschließend dreimaliges Waschen (s.o.).
- Verdünnung von 300 μ l „10 x Stock Detection Antibody“ in 2700 μ l Detection Antibody Diluent A (für 96 Wells).
- Auftragen von 25 μ l der Detektionsantikörper je Well.
- Erneute Inkubation (s.o.).
- Dreimaliges Waschen (s.o.)

- Material und Methode -

- Verdünnung von 60 µl Streptavidin-PE (100x) in 5940 µl Assay Buffer.
- 50 µl der Streptavidin-PE-Lösung in jedes Well pipettieren.
- Inkubation für insgesamt 10 Minuten (analog oben).
- Dreimaliges Waschen (s.o.)
- 125 µl Assay Buffer je Well zugeben.
- Bis zur Messung Aufbewahrung im Dunkeln. Unmittelbar vor dem Messen Mikrotiterplatte für 30 Sekunden bei 1100 U / min schütteln.

2.8 Statistische Auswertung

Ergebnisse sind prinzipiell als Median \pm den *Standardfehler* (SF) angegeben. Unterschiede zwischen den Stichproben wurden für nicht parametrische Daten mit der Kruskal-Wallis Varianzanalyse (ANOVA für Ränge) getestet. Die minimal geforderte Signifikanz für die anschließend durchgeführten Mehrfachvergleiche nach Dunn (Gerinnungsinhibitoren versus Referenz [Ø]) war für $p < 0,05$ definiert. Analog wurde für die Expressionsstärke von TLR4 und HLA-DR (posttraumatisch versus D-1 oder KO) verfahren. Präsentiert werden die Ergebnisse in einem Achsensystem, wobei die y-Werte die gemessene Konzentration des jeweiligen Zytokins beziehungsweise die Expressionsstärke des Oberflächenmarkers darstellt. Die x-Achse zeigt die eingesetzten Substanzen respektive den zeitlichen Verlauf. Die grafische Darstellung erfolgt teilweise über so genannte Boxplots, die den Median (schwarze Linie in der Box), den Mittelwert (grüne Linie) und, sofern sinnvoll, die Quartile und die Extremwerte anzeigen. Die Box stellt den Interquartilbereich mit 50% der Werte dar, die von der Box ausgehenden Linien führen bis zur 5. respektive 95. Perzentile. Maximalwerte werden als Einzelpunkte ausgegeben. Alternativ kommen Linienplots mit Angabe des SF zur Anwendung.

2.9 Qualitätssicherung

Die vorliegende Studie wurde in der Abteilung für „Experimentelle Forschung Chirurgie“ der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern durchgeführt. Dieser

- Material und Methode -

Bereich ist seit Januar 2008 vom TÜV Süd gemäß DIN EN ISO 9001 zertifiziert. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten auch vor diesem Zeitpunkt unter Verwendung standardisierter Protokolle.

Die Beschränkung der elektiv versorgten Patienten auf abdominalchirurgische Fälle geschah unter der Vorstellung größtmöglicher Homogenität. Bei Einschluss polytraumatisierter Patienten mit führendem neurotraumatologischem Verletzungsmuster wurde auf eine ausreichende Schwere des Weichteilschadens geachtet.

Zur Berücksichtigung der zirkadianen Rhythmik erfolgten die Blutentnahmen regelmäßig in den Morgenstunden. Sämtliche Tätigkeiten am Patienten wurden hierbei unter sterilen Kautelen durchgeführt. Vom Zeitpunkt der Abnahme bis zur labortechnischen Weiterverarbeitungen galt ein maximales Intervall von einer Stunde.

Um eine Aggregation der Zellen, insbesondere der Monozyten, zu vermeiden wurden alle Arbeitsschritte beginnend mit der Separation der mononukleären Zellen bis einschließlich der Aktivierung der Leukozyten-Suspension auf Eis beziehungsweise gekühlt durchgeführt. Daneben wurde zur Vermeidung einer ungewollten Aktivierung der Zellen auf pyrogenfreies Material zurückgegriffen.

Konnte bei zu geringer Gesamtzellzahl eine PBMC Konzentration von 1,1 Millionen Zellen pro ml AIM V nicht erreicht werden, so wurde die maximal mögliche Konzentration eingestellt. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte dann unter Verwendung eines entsprechenden Korrekturfaktors.

Vor Beginn der Studie wurde am Durchflusszytometer die spektrale Überlappung der eingesetzten Fluorochrome kompensiert. Hierfür wurden standardmäßig gefärbte Zellen gesunder Personen, bei denen es sich nicht um Studienteilnehmer handelte, verwendet. Eine Veränderung der Verstärkerröhrenspannung wurde nach diesem Zeitpunkt nicht mehr vorgenommen. Da die eingesetzten Fluorochrome stark lichtempfindlich sind erfolgte die Verwendung bei größtmöglicher Verdunkelung.

Die Chargen der verwendeten Gerinnungsinhibitoren wurden fortlaufend dokumentiert um eventuelle Störgrößen identifizieren zu können. Als Toleranz für sämtliche Inkubationszeiten galten zehn Prozent Abweichung.

Die Multiplex-Messungen wurden gemäß „Instruction Manual“ der Fa. Bio-Rad (06-0143 0305 Sig 1205) durchgeführt. Vor jeder Messung erfolgte eine Kalibrierung

- Material und Methode -

des Geräts. Grundsätzlich erlaubt das Bio-Plex System die Kalibrierungen „High“ oder „Low“. Für die Messungen wurde die Low-Kalibrierung verwendet, da diese bei hohen Analysat-Werten, die überwiegend vorlagen, exaktere Ergebnisse liefert. Grundsätzlich wurden für jeden Messtag zwei Standardreihen pipettiert und die resultierenden Standardkurven entsprechend des Manuals nachträglich von „Ausreißern“ bereinigt. Wurden mehr als eine Mikrotiterplatte in Folge gemessen, so wurde zwischen den einzelnen Platten das Waschprogramm des Systems durchgeführt.

- Material und Methode -

3 Ergebnisse

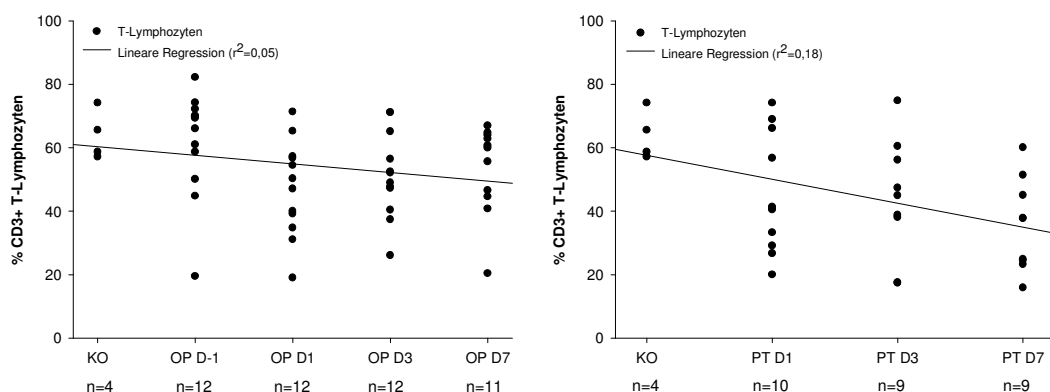
3.1 Immunstatus

3.1.1 Relativer Lymphozyten- und Monozytenanteil

Der relative Anteil der T-Lymphozyten an der PBMC-Fraktion nimmt nach Gewebetrauma im Vergleich zu gesunden Personen ($62,15 \pm 3,88 \%$) tendenziell ab (siehe *Abbildung 8*). Der niedrigste Wert zeigt sich bei operierten Patienten am ersten ($48,70 \pm 4,35 \%$), bei polytraumatisierten Patienten am siebten posttraumatischen Tag ($37,80 \pm 4,90 \%$).

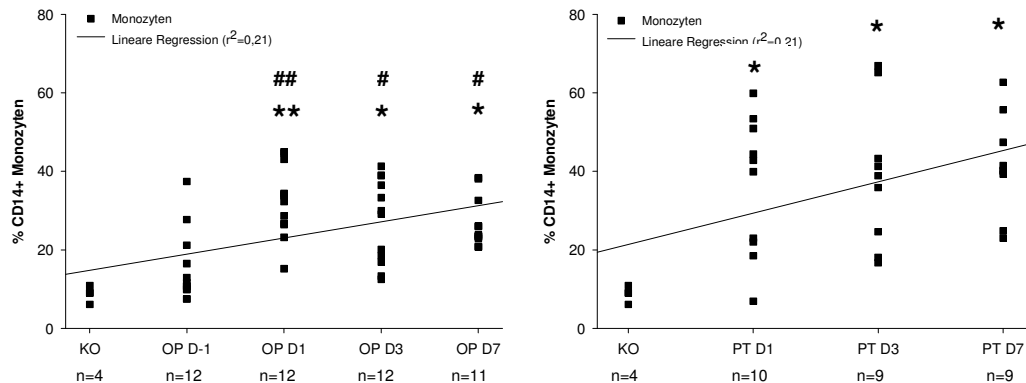
Dagegen kommt es zu einer signifikanten Zunahme des relativen Monozytenanteils gegenüber Gesundheitskontrollen ($9,05 \pm 0,99 \%$) sowie den präoperativ bestimmten Werten ($11,20 \pm 2,64 \%$). Die größte Zunahme der Monozytenpopulation findet sich am ersten posttraumatischen Tag (OP $33,05 \pm 2,60 \%$; PT $41,35 \pm 5,52 \%$; siehe *Abbildung 9*).

Abbildung 8: Abnahme des relativen Anteils CD3+ T-Lymphozyten nach Trauma



- Ergebnisse -

Abbildung 9: Zunahme des relativen Monozytenanteils nach Trauma; *p<0,05 / **p<0,01 vs. KO, #p<0,05 / ##p<0,01 vs. OP D-1



3.1.2 Expression von HLA-DR und TLR4

Nach Trauma kommt es zu einer, an allen Zeitpunkten signifikanten, Abnahme der *Mittleren Fluoreszenzintensität* (MFI) von HLA-DR auf Monozyten. Der für Gesundkontrollen bestimmte Referenzwert beträgt $12,15 \pm 5,45$. Es zeigt sich ein maximaler Abfall der HLA-DR Expression auf $0,45 \pm 0,56$ am ersten postoperativen, beziehungsweise mit einem MFI von $0,40 \pm 0,29$ am dritten posttraumatischen Tag. Am siebten Tag kommt es zu einer geringfügigen Erholung auf $1,00 \pm 1,16$ (OP) respektive $0,50 \pm 1,13$ (PT). Darüber hinaus zeigt sich im Vergleich zwischen OP-Gruppe und gesunder Kontrollgruppe eine bereits präoperativ bestehende, nicht signifikante, Verminderung der HLA-DR Dichte (MFI $2,70 \pm 1,81$) auf den CD14 positiven Monozyten der OP-Gruppe. Trotzdem erreicht der für den ersten postoperativen Tag gemessene Abfall der Expressionsstärke gegenüber dem präoperativen Wert statistische Signifikanz (siehe *Abbildung 10*).

Die MFI von TLR4 auf Monozyten ist in *Abbildung 11* dargestellt. Die gemessene Expressionsdichte unterscheidet sich hierbei im Verlauf nicht von der Gesundkontrolle ($5,25 \pm 0,21$) und, bei operierten Patienten, auch nicht von D-1 ($5,75 \pm 0,55$). Die postoperativen Werte schwanken in einem Bereich von $5,05 \pm 0,99$ (D3) bis $6,20 \pm 0,83$ (D7). Nach Polytrauma wird TLR4 mit einer MFI von $4,50 \pm 0,76$ (D3) bis $5,70 \pm 1,24$ (D7) auf Monozyten exprimiert.

- Ergebnisse -

Abbildung 10: HLA-DR Expression im Verlauf nach Trauma; * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ OP vs. KO, §§ $p < 0,01$ PT vs. KO, # $p < 0,05$ OP vs. D-1

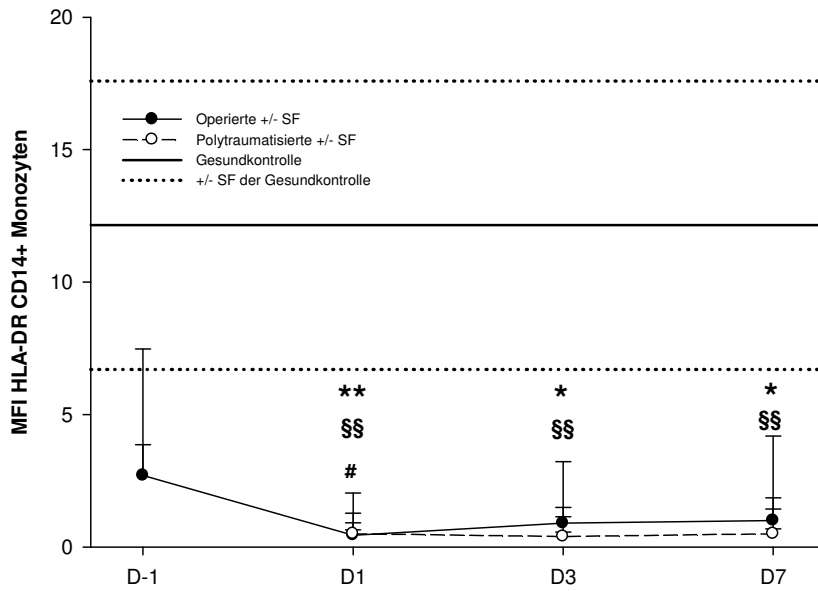
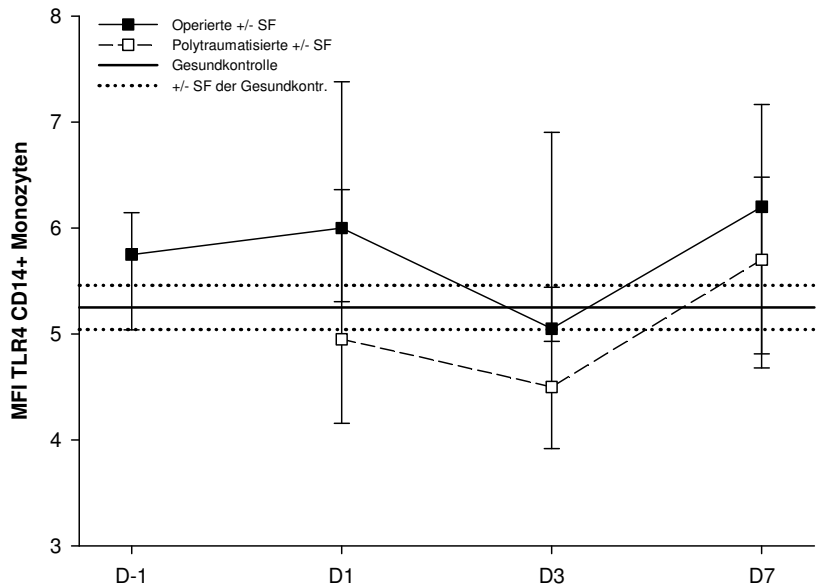


Abbildung 11: Keine Veränderung der TLR4-Expression auf Monozyten nach Trauma



3.2 Zytokin-Freisetzung im LPS-Ansatz

3.2.1 IL-10

Im Vergleich zum Referenzwert von 784 ± 101 pg / ml führen AT20 (162 ± 47 pg / ml) und die Kombination aus aPC100 und AT20 (108 ± 56 pg / ml) in den Proben gesunder Probanden zu einer signifikanten Reduktion der IL-10 Spiegel nach LPS-Stimulation (siehe *Abbildung 12*). Mit Werten zwischen 743 ± 100 (aPC4) und 935 ± 149 (aPC100) pg / ml kommt es in den übrigen Ansätzen zu keiner relevanten Änderung der Zytokinfreisetzung.

Abbildung 13 zeigt, dass bei den elektiv operierten Patienten der Effekt von AT20 und aPC100/AT20 präoperativ tendenziell vorhanden ist und nach Operation zumindest teilweise erhalten bleibt. So führt, bei einem präoperativen Kontrollwert von 1014 ± 284 pg / ml, der Zusatz von AT20 oder aPC100/AT20 zu einer Reduktion der IL-10 Freisetzung auf 549 ± 148 (AT20) beziehungsweise 479 ± 104 (aPC100/AT20) pg / ml. Postoperativ reichen diese Werte von 1025 ± 223 (D3; aPC100/AT20) bis 1773 ± 280 (D1; aPC100/AT20) pg / ml bei Normwerten von 1506 ± 233 (D7) bis 1632 ± 365 (D1) pg / ml. Daneben zeigt sich unter aPC100 ein Trend zu erhöhten IL-10 Spiegeln. Diese liegen mit im Mittel 2094 pg / ml an allen vier Tagen über den Werten der Vergleichsgruppe mit gemittelten 1415 pg / ml.

In der PT-Gruppe zeigt sich ein den OP-Patienten ähnliches Bild (siehe *Abbildung 14*). Auch hier liegen die einzelnen Werte zu allen drei Zeitpunkten unter (AT20 und aPC100/AT20) beziehungsweise über (aPC100) der jeweiligen Kontrolle.

Sowohl in der OP- als auch der PT-Gruppe ist dagegen eine Änderung der Zytokinfreisetzung in den übrigen Untersuchungsansätzen nicht erkennbar.

- Ergebnisse -

Abbildung 12: IL-10 Spiegel nach Stimulation mit LPS und Zugabe der Gerinnungsinhibitoren bei gesunden Probanden; **p<0,01 vs. Ø

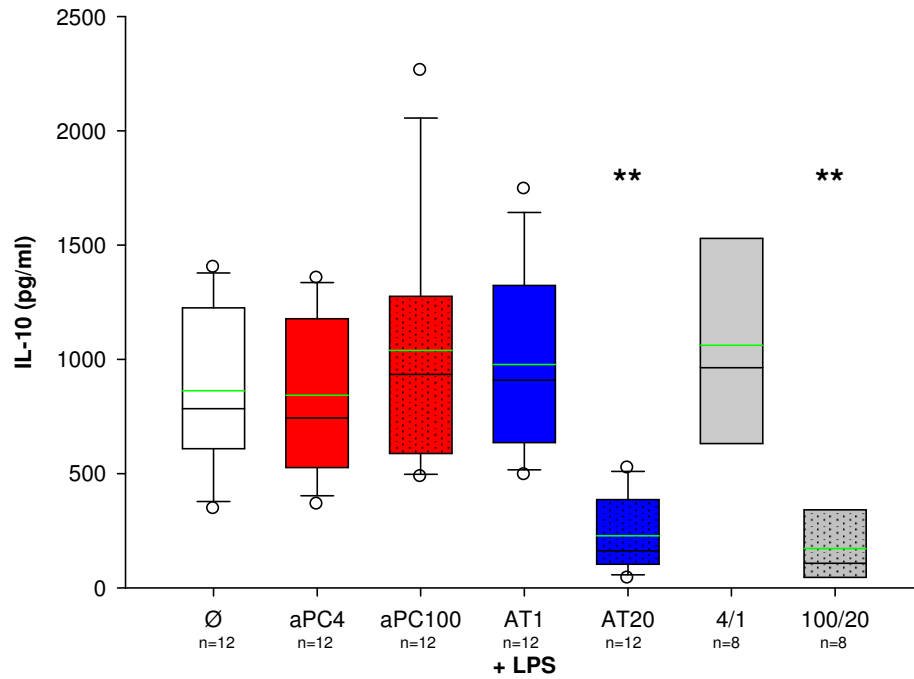
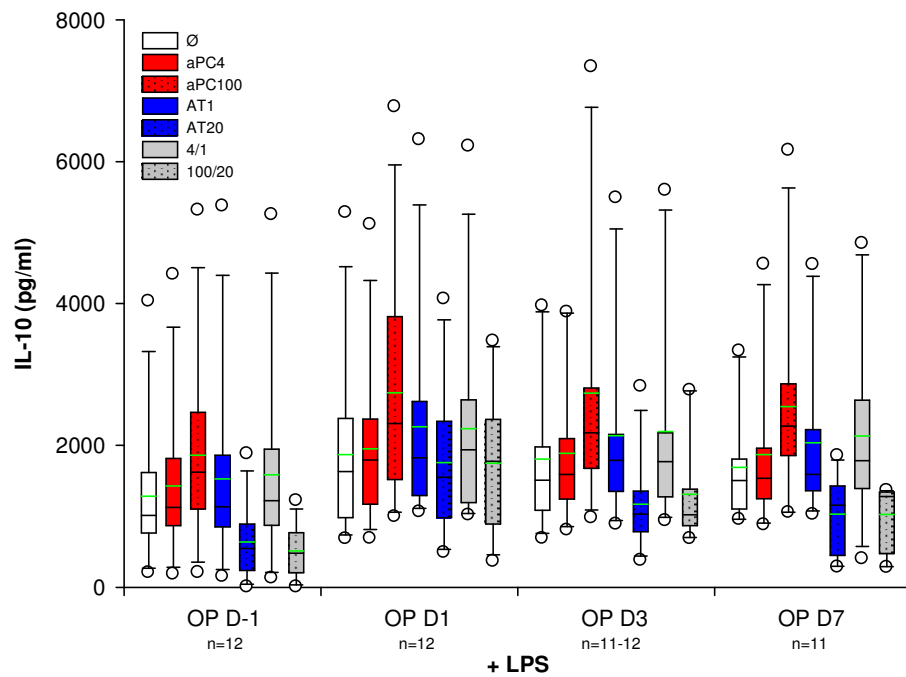


Abbildung 13: Effekt von AT20 und aPC100/AT20 vor und nach Operation



- Ergebnisse -

Abbildung 14: IL-10 Spiegel nach Polytrauma; **p<0,01 vs. Ø

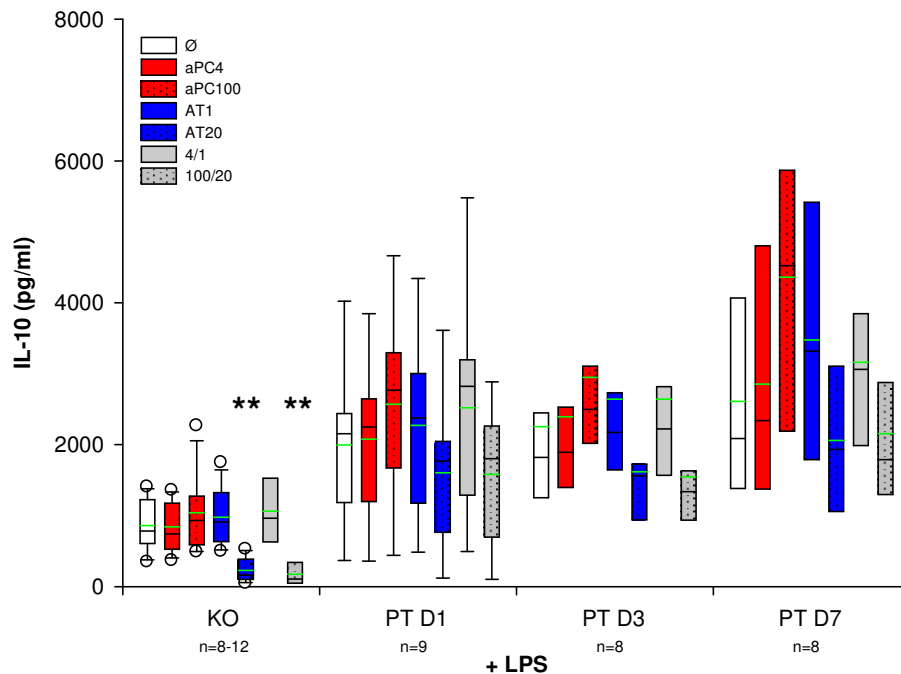


Abbildung 15 zeigt, dass es in Proben gesunder Probanden ohne die Stimulation mit LPS zu keiner relevanten IL10-Freisetzung kommt. Die Auswertung der Negativkontrolle zeigt einen IL-10 Spiegel in Höhe von 4 ± 1 pg / ml. Mit minimal gemessenen 3 ± 1 (AT20) beziehungsweise maximal 6 ± 1 (aPC1) pg / ml sind Abweichungen in den Untersuchungsansätzen nicht erkennbar.

In den Tagen nach Operation beziehungsweise Trauma kommt es durch Zugabe von AT20 und teilweise aPC100/AT20 zu einem Anstieg der IL-10 Freisetzung gegenüber den unbehandelten Ansätzen (Abbildung 16 und Abbildung 17). Auf Grund der im Median nur gering von den unbehandelten Kontrollen differierenden Ergebnissen kann hier jedoch weder ein relevanter Effekt angenommen noch ausgeschlossen werden.

- Ergebnisse -

Abbildung 15: Konzentration von IL-10 in Überständen gesunder Probanden ohne LPS-Stimulation

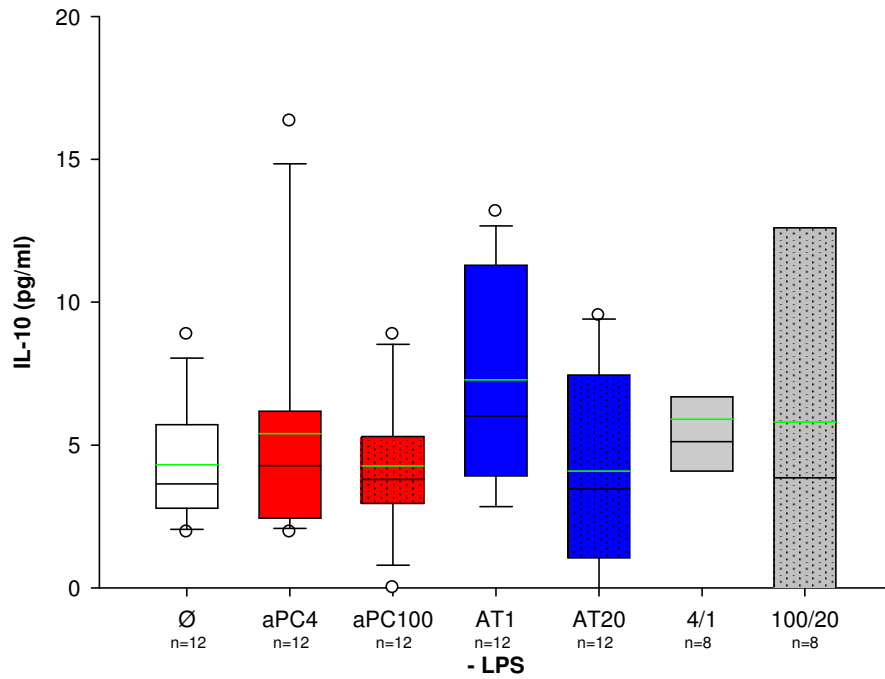
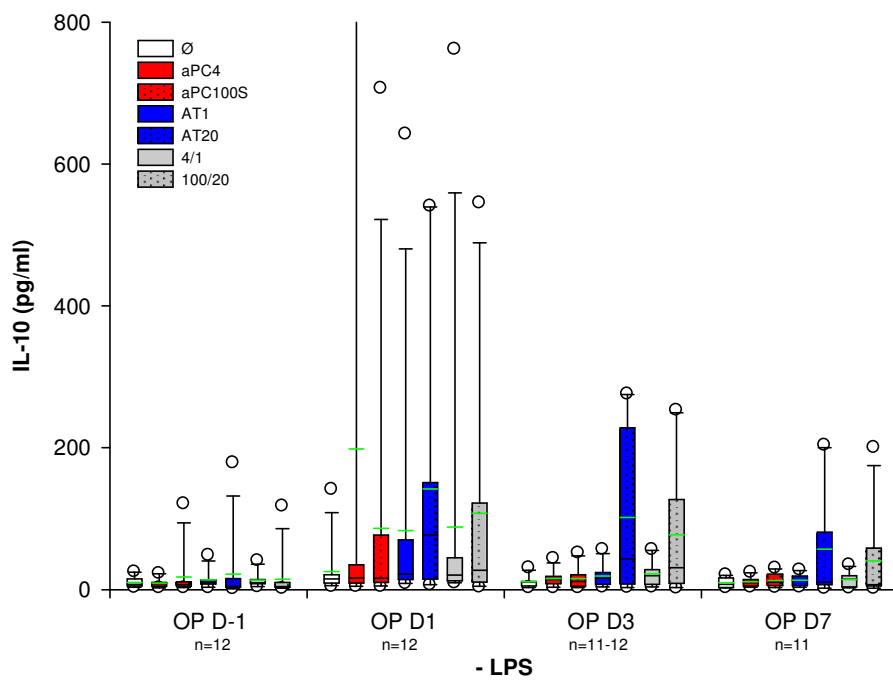
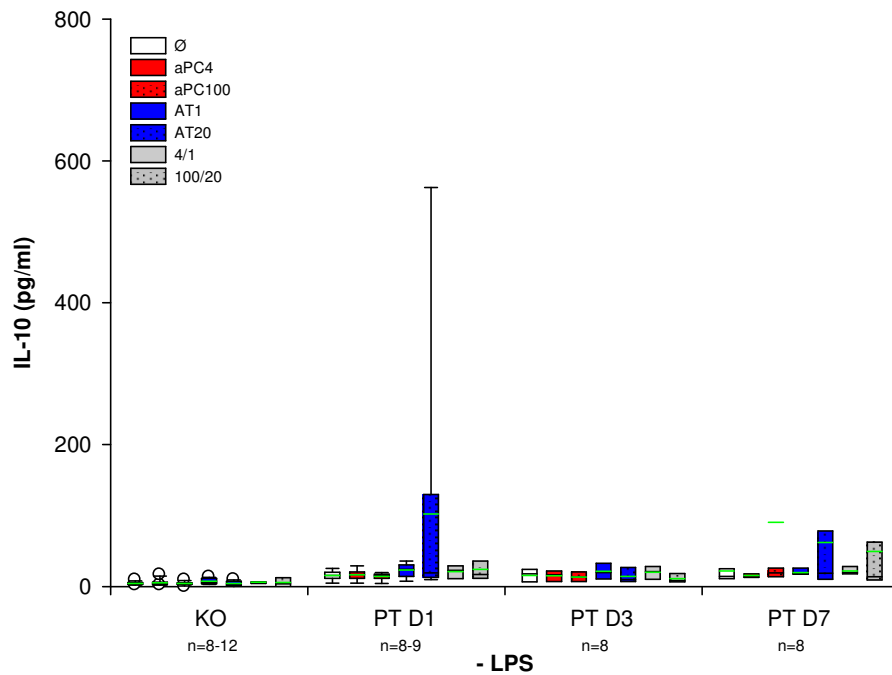


Abbildung 16: Anstieg der IL-10 Spiegel in den nicht stimulierten Proben operierter Patienten



- Ergebnisse -

Abbildung 17: Anstieg der IL-10 Freisetzung nach Polytrauma ohne Ko-Stimulation mit LPS



3.2.2 TNF- α

Der Referenzwert der TNF- α Freisetzung lag für LPS-stimulierte Proben gesunder Probanden bei 3926 ± 769 pg / ml. Unter Zugabe von AT20 sank dieser Wert signifikant auf 484 ± 109 pg / ml. Bei Verwendung von aPC100 in Kombination mit AT20 wurden 364 ± 114 pg / ml gemessen. Dies stellte ebenfalls eine hochsignifikante Reduktion gegenüber den unbehandelten Proben dar (siehe *Abbildung 18*). In den weiteren Ansätzen konnten wie bereits für IL-10 keine Veränderungen festgestellt werden.

Wie *Abbildung 19* und *Abbildung 20* zeigen, bleibt der Effekt von AT20 und aPC100/AT20 in den mit LPS stimulierten Proben vor und nach operativem sowie akzidentellem Trauma erhalten. Mit Ausnahme von PT D7 erreicht die Reduktion der detektierten Zytokinspiegel auch hier das geforderte Signifikanzniveau.

- Ergebnisse -

Abbildung 18: TNF- α Freisetzung in LPS stimulierten Proben gesunder Probanden; **p<0,01 vs. \emptyset

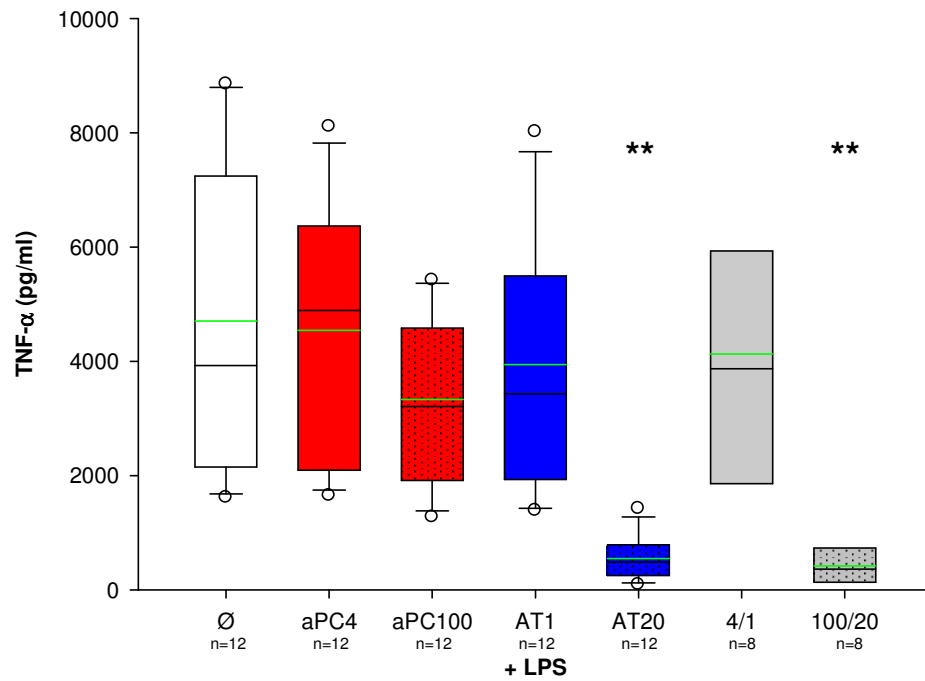
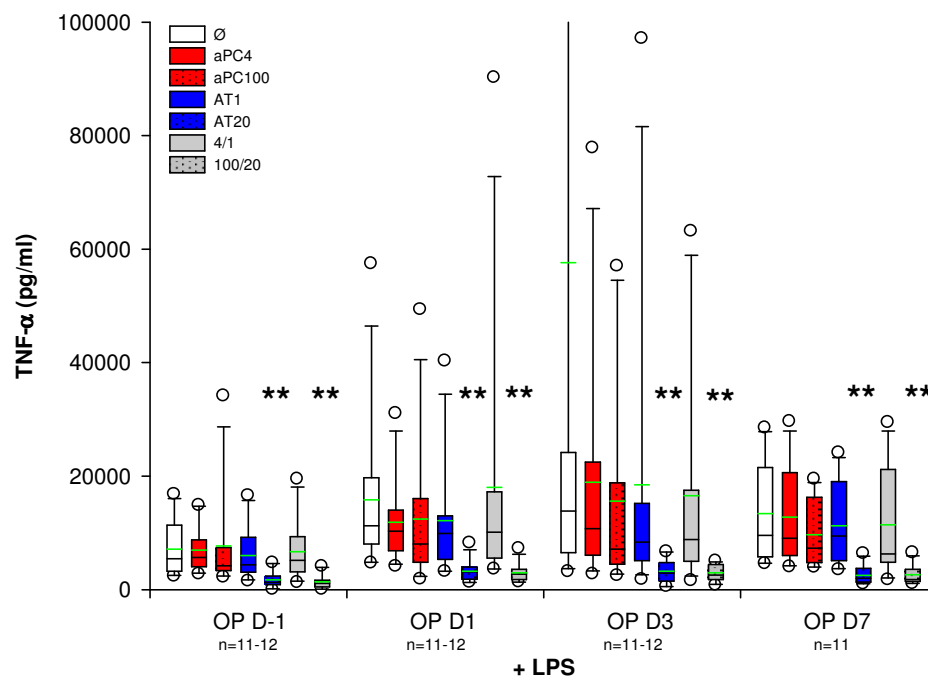
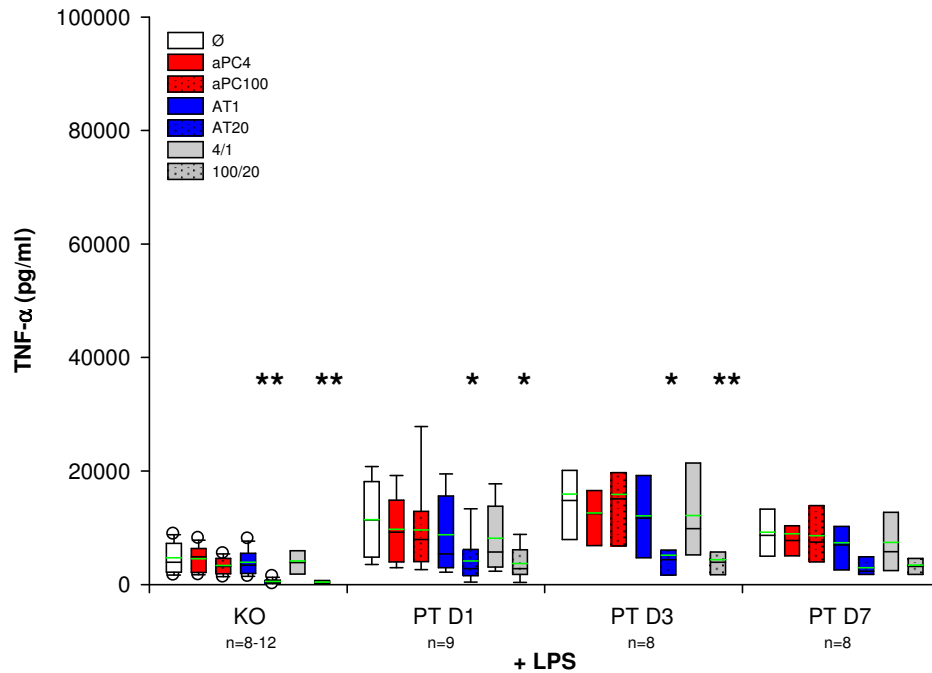


Abbildung 19: Verminderte TNF- α Freisetzung durch AT 20 und aPC100/AT20 bei operierten Patienten; **p<0,01 vs. \emptyset



- Ergebnisse -

Abbildung 20: Konsistente Resultate in der LPS-stimulierten PT-Subgruppe;
* $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ vs. \emptyset



In den aPC100/AT20 enthaltenden, unstimulierten Proben der Gesundheitskontrolle wurden im Median TNF- α Spiegel von 46 ± 16 pg / ml gemessen. Dies stellt eine signifikante Erhöhung im Vergleich zum Referenzwert von 6 ± 23 pg / ml dar. In der AT20 Subgruppe kam es zu einer nicht signifikanten Zunahme auf 21 ± 5 pg / ml (siehe *Abbildung 21*).

Abbildung 22 zeigt, dass es auch bei den operierten Patienten zu einer Steigerung der TNF- α Freisetzung unter AT20 sowie aPC100/AT20 kommt. Diese erreichen an den Tagen drei und sieben postoperativ statistische Signifikanz.

Auch in der Gruppe der Polytraumatisierten kommt es analog zu einem signifikanten Anstieg an den Tagen eins und drei nach dem Unfallereignis (siehe *Abbildung 23*).

Wie schon für die stimulierten Ansätze gezeigt werden konnte, besitzen die übrigen Konzentrationen an Gerinnungsinhibitoren keinen Einfluss auf die TNF- α Freisetzung aus unstimulierten Proben.

- Ergebnisse -

Abbildung 21: TNF- α Spiegel ohne LPS-Stimulation und ohne Vorliegen eines Gewebetraumas; * $p < 0,05$ vs. \emptyset

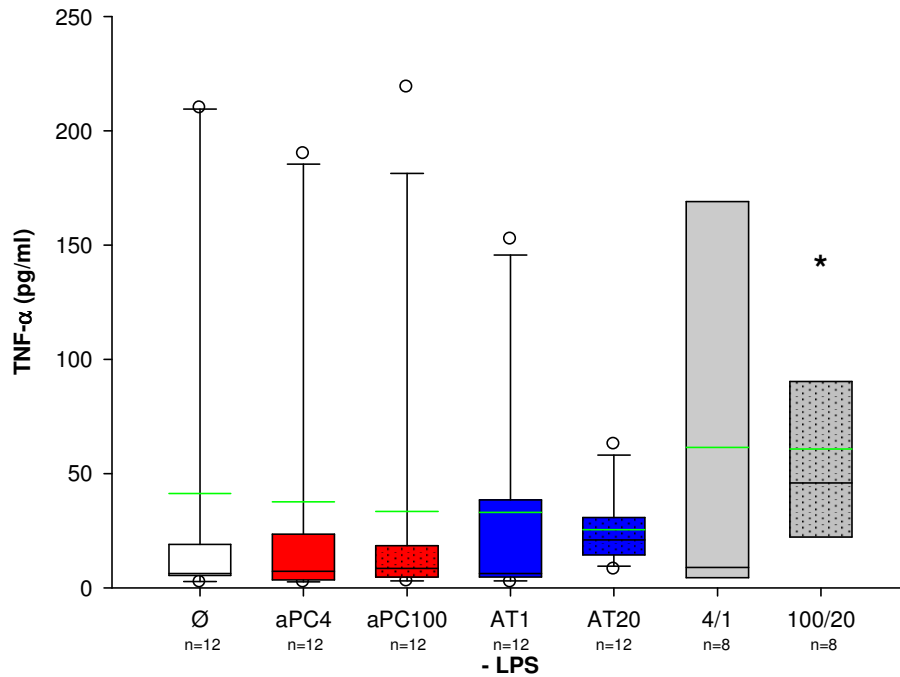
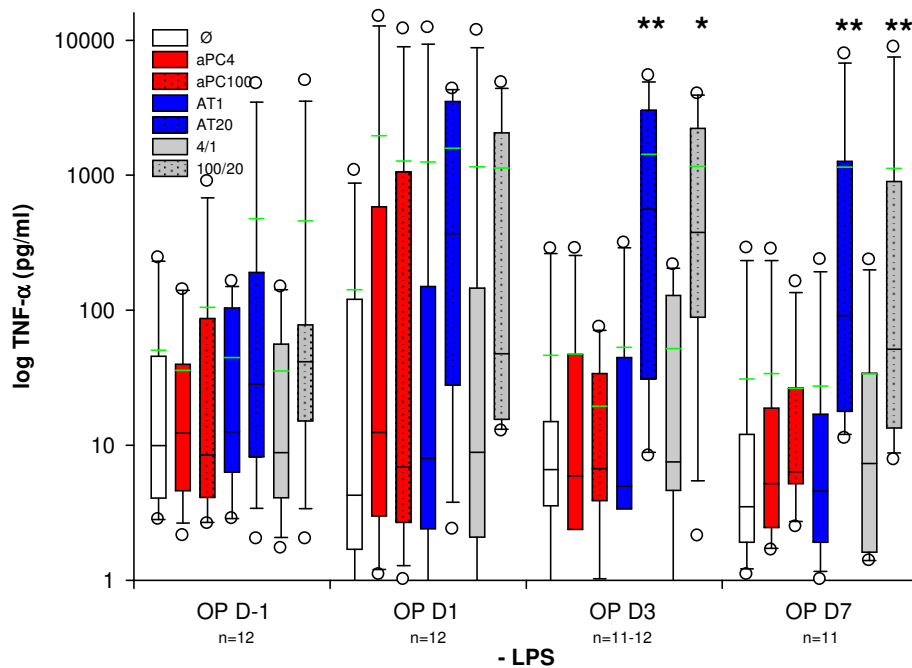
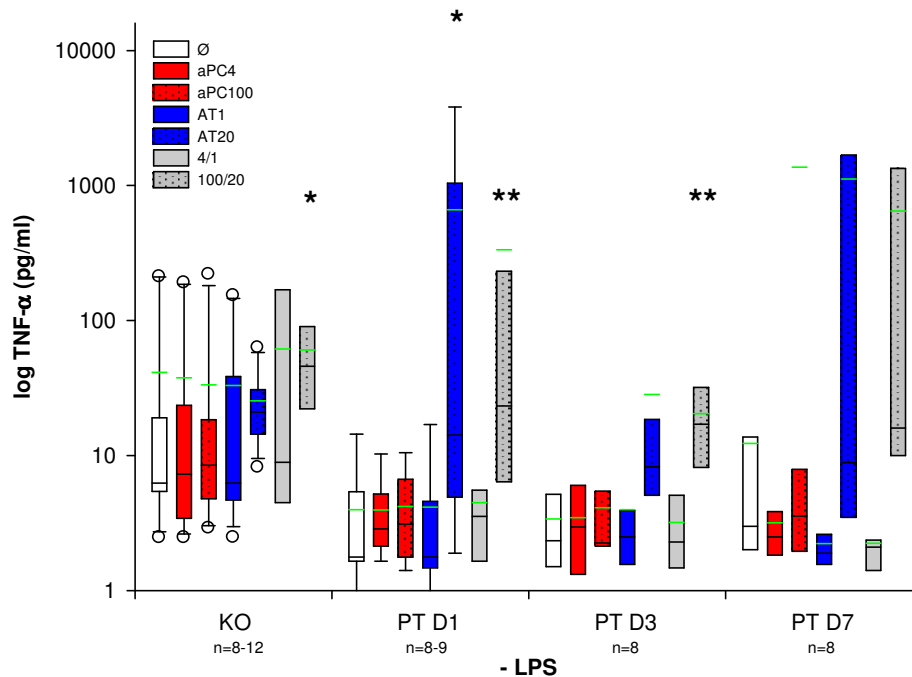


Abbildung 22: Steigerung der TNF- α Freisetzung durch AT20 und aPC100/AT20 im postoperativen Verlauf; * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ vs. \emptyset (logarithmische y-Achse)



- Ergebnisse -

Abbildung 23: Erhöhte TNF- α Freisetzung durch AT20 bzw. aPC100/AT20; * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ vs. \emptyset (logarithmische y-Achse)



3.3 Zytokin-Freisetzung im OKT3-Ansatz

3.3.1 IL-6

Die Auswertung der IL-6 Messungen zeigt nach Aktivierung mittels OKT3 bei gesunden Probanden einen Referenzwert von 175 ± 79 pg / ml. Proben denen aPC100 zugesetzt war weisen mit 2280 ± 995 pg / ml signifikant erhöhte Spiegel an IL-6 auf. In den AT20 enthaltenden Ansätzen wurden mit im Median 4897 ± 2155 pg / ml nochmals deutlich erhöhte Spiegel registriert ($p < 0,01$; siehe *Abbildung 24*).

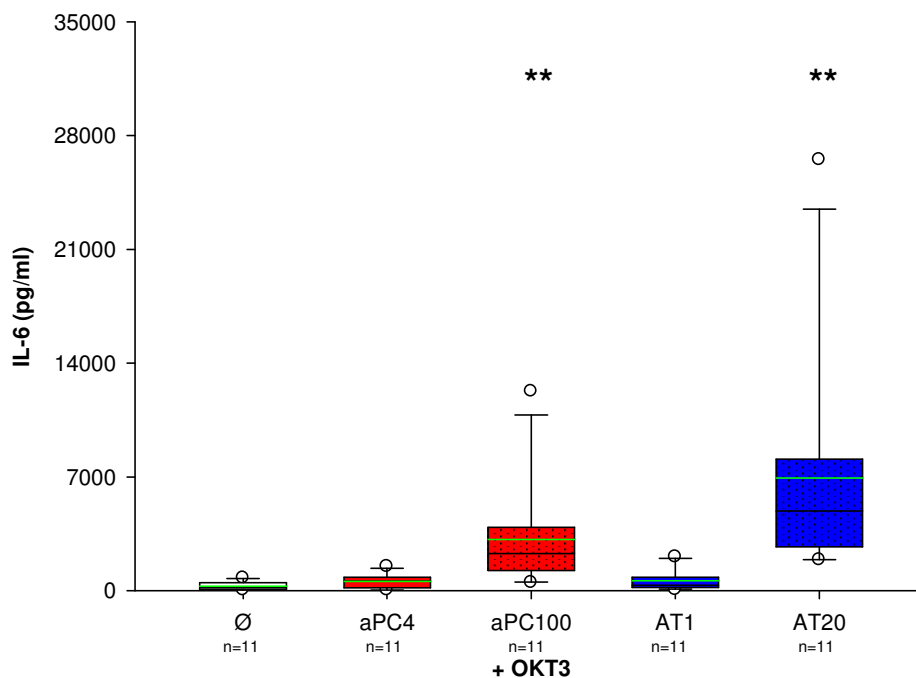
Wie aus *Abbildung 25* ersichtlich ist, sind diese Ergebnisse bei operierten Patienten, sowohl prä- als auch postoperativ, konstant. Mit 12451 ± 2712 pg / ml zeigt sich in der aPC100 Subgruppe der stärkste Anstieg am ersten postoperativen Tag, während sich nach Zugabe von AT20 mit 17237 ± 2709 pg / ml der höchste Wert am siebten postoperativen Tag bestimmen lässt.

- Ergebnisse -

Bei Betrachtung der Polytraumagruppe führt nur AT20 an den Tagen drei (11640 ± 2215 versus 875 ± 410 pg / ml) und sieben (12089 ± 2375 versus 458 ± 138 pg / ml) zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6 Spiegel in den mit OKT3 aktivierten Ansätzen. Die am ersten posttraumatischen Tag gemessenen IL-6 Spiegel liegen aber mit 11529 ± 2745 pg / ml in den AT20 Ansätzen ebenfalls deutlich über dem diesbezüglichen Referenzwert von 636 ± 1177 pg / ml. Auch aPC100 führt an allen drei Tagen zu einer Erhöhung der IL-6 Freisetzung. Die beobachteten Unterschiede sind quantitativ gewaltig. Im Mittel über alle drei Messpunkte kann eine 7,8-fache Steigerung der Zytokinausschüttung beobachtet werden. Aufgrund der enormen Streubreite der Daten wird jedoch zu keinem Zeitpunkt statistische Signifikanz erreicht (siehe *Abbildung 26*).

Wie schon für die Zytokine im LPS-Ansatz gezeigt, findet sich nach OKT3-Aktivierung kein Einfluss von aPC4 und AT1 auf die Mediatorfreisetzung.

Abbildung 24: Gesteigerte IL-6 Freisetzung durch aPC100 und AT20 bei gesunden Probanden nach Aktivierung durch OKT3; **p<0,01 vs. Ø



- Ergebnisse -

Abbildung 25: aPC100 und AT20 erhöhen die IL-6 Freisetzung in OKT-3 aktivierten Ansätzen von operierten Patienten; *p<0,05 / **p<0,01 vs. ∅

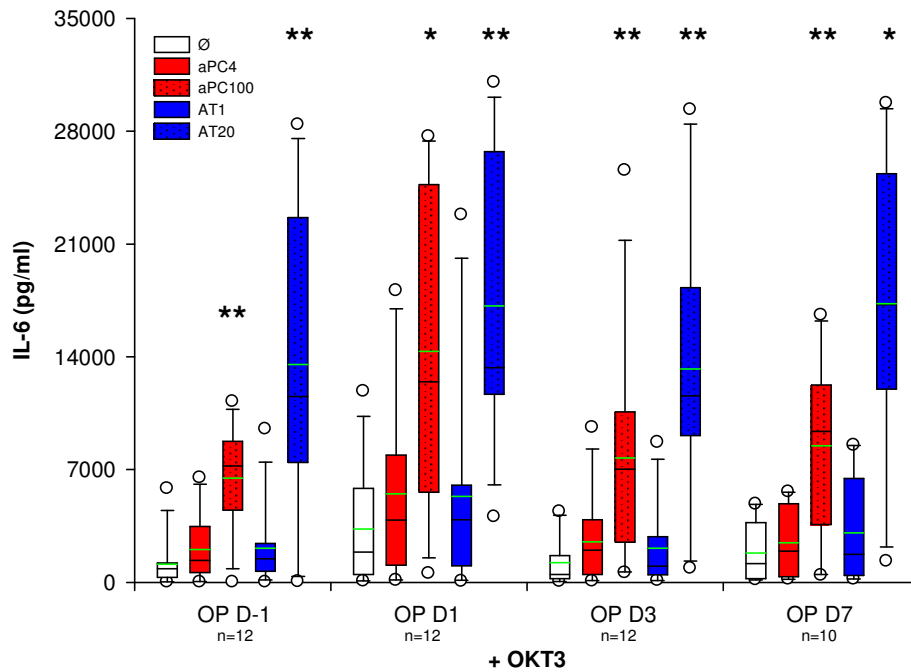
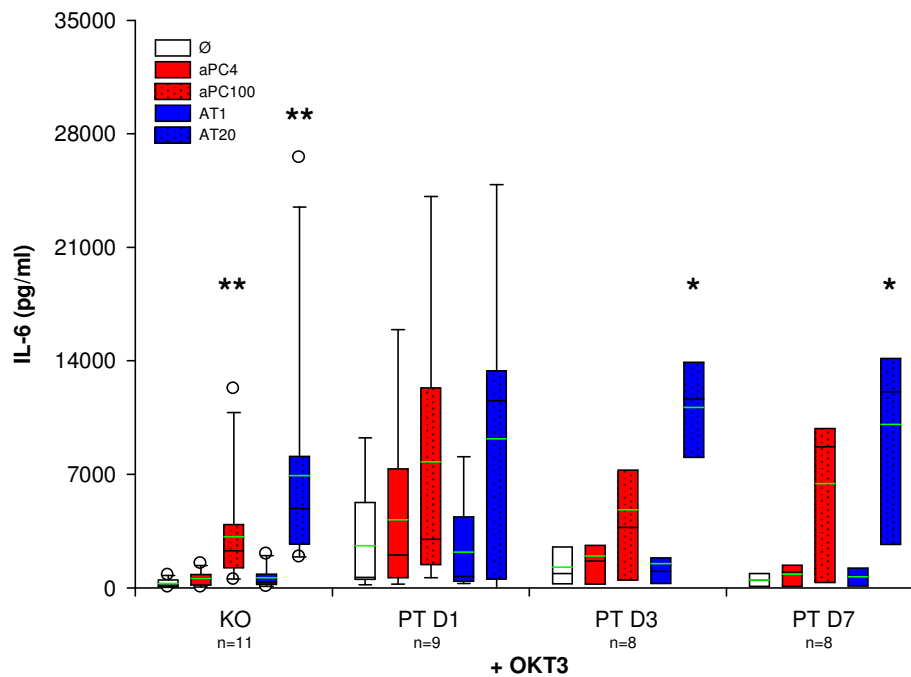


Abbildung 26: IL-6 Messung bei polytraumatisierten Patienten; *p<0,05 / **p<0,01 vs. ∅



- Ergebnisse -

Die für die OKT3-aktivierten Ansätze beschriebenen Effekte von aPC100 und AT20 sind in den unstimulierten Proben der Gesundheitskontrolle nur bei Zugabe von AT20 nachweisbar. Die absolute Menge an freigesetztem IL-6 liegt mit im Median 150 ± 3235 pg / ml zwar deutlich unter dem Wert der OKT3-aktivierten Proben. Dennoch stellt dies eine signifikante Erhöhung gegenüber der Negativkontrolle in Höhe von 10 ± 12 pg / ml dar. Dagegen kommt es mit 13 ± 24 pg / ml im aPC100 Ansatz nicht zu vermehrter IL-6 Freisetzung (siehe *Abbildung 27*).

In der Analyse der operierten Patienten zeigen sich diese Ergebnisse bestätigt. Neben dem präoperativen Tag (5368 ± 2821 versus 38 ± 171 pg / ml; $p < 0,05$) wird auch an den Tagen drei und sieben nach Operation statistische Signifikanz erreicht ($p < 0,01$; siehe *Abbildung 28*). Am ersten postoperativen Tag wird dagegen, trotz einer Steigerung der IL-6 Ausschüttung von 254 ± 3046 auf 14586 ± 3548 pg / ml, das Signifikanzniveau verfehlt. Dies dürfte auf die an diesem Tag beobachtete hohe interindividuelle Varianz der Zytokinfreisetzung über alle Ansätze hinweg zurückzuführen sein.

Auf Grund der Messresultate kann auch für die Polytrauma-Gruppe von einem Einfluss durch AT20 ausgegangen werden (siehe *Abbildung 29*). Allerdings wird, auch hier bedingt durch eine große Varianz im Ansprechen auf AT20, an keinem der Untersuchungstage statistische Signifikanz erreicht.

- Ergebnisse -

Abbildung 27: IL-6 Spiegel in Überständen gesunder Probanden ohne vorherige Aktivierung; * $p < 0,05$ vs. \emptyset (logarithmische y-Achse)

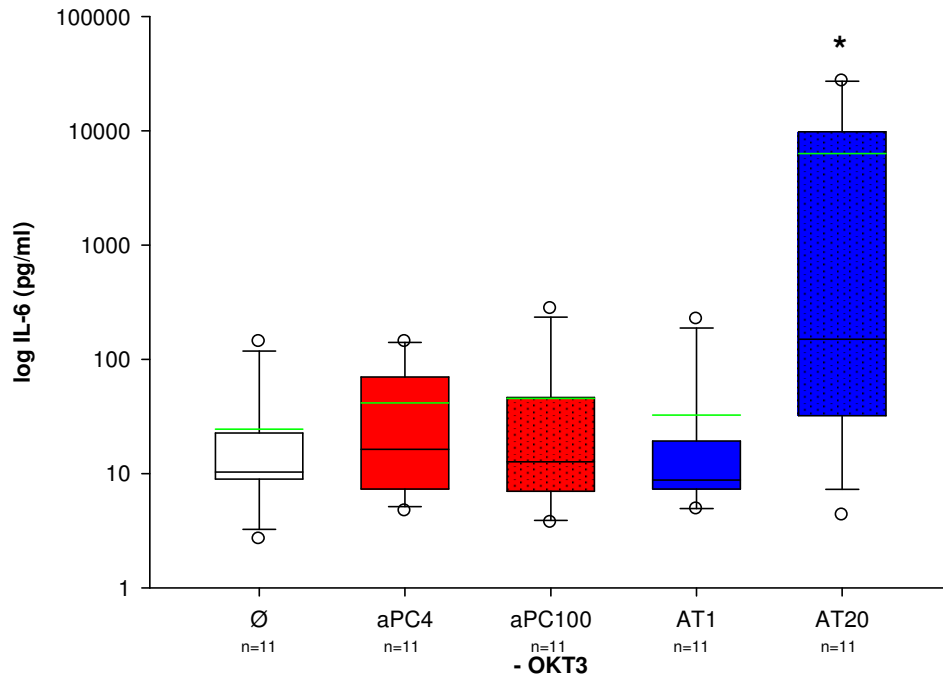
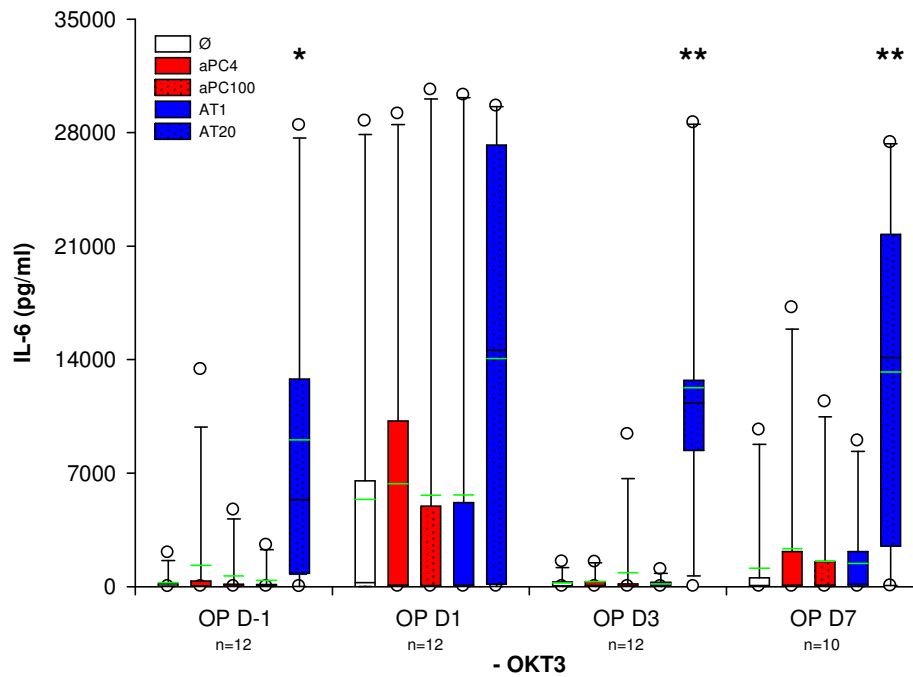
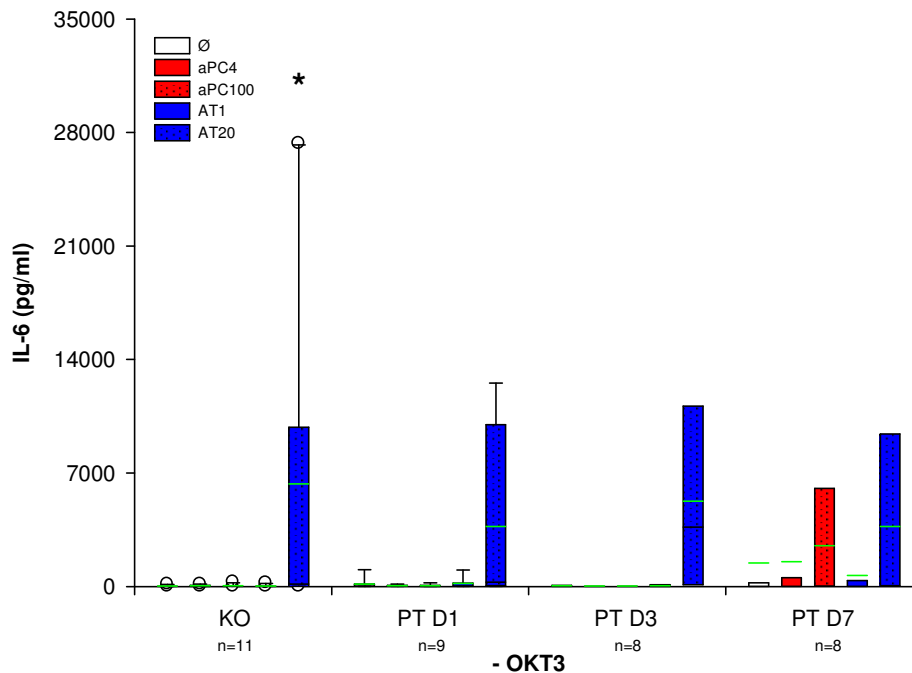


Abbildung 28: Erhöhung der IL-6 Freisetzung durch AT20 bleibt nach Operation signifikant erhalten; * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ vs. \emptyset



- Ergebnisse -

Abbildung 29: Nicht signifikante Erhöhung der IL-6 Spiegel durch AT20 in der unstimulierten Polytrauma-Gruppe; * $p < 0,05$ vs. \emptyset



3.3.2 IL-13

Mit im Median 20 ± 21 pg / ml führt AT20 bei den OKT-3-aktivierten Ansätzen der Gesundkontrolle zu einer signifikanten Abnahme der IL-13 Spiegel im Vergleich zum Referenzwert von 1229 ± 540 pg / ml. Physiologische Konzentrationen an AT zeigen dagegen mit 1771 ± 564 pg / ml keinen Einfluss auf die Zytokinfreisetzung (siehe *Abbildung 30*). Auch in den übrigen Versuchsansätzen findet sich kein Anhalt für eine immunmodulatorische Wirkung.

In der Gruppe der operierten Patienten zeigt die Analyse der Messdaten, dass es mit Werten von 411 ± 1019 (D-1) bis 691 ± 547 (D3) pg / ml ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung der IL-13 Ausschüttung durch AT20 kommt. Ohne die Zugabe von Gerinnungsinhibitoren werden in den aktivierten Proben Kontrollwerte von 1365 ± 276 pg / ml (D1) bis 2445 ± 240 pg / ml (D3) gemessen (siehe *Abbildung 31*).

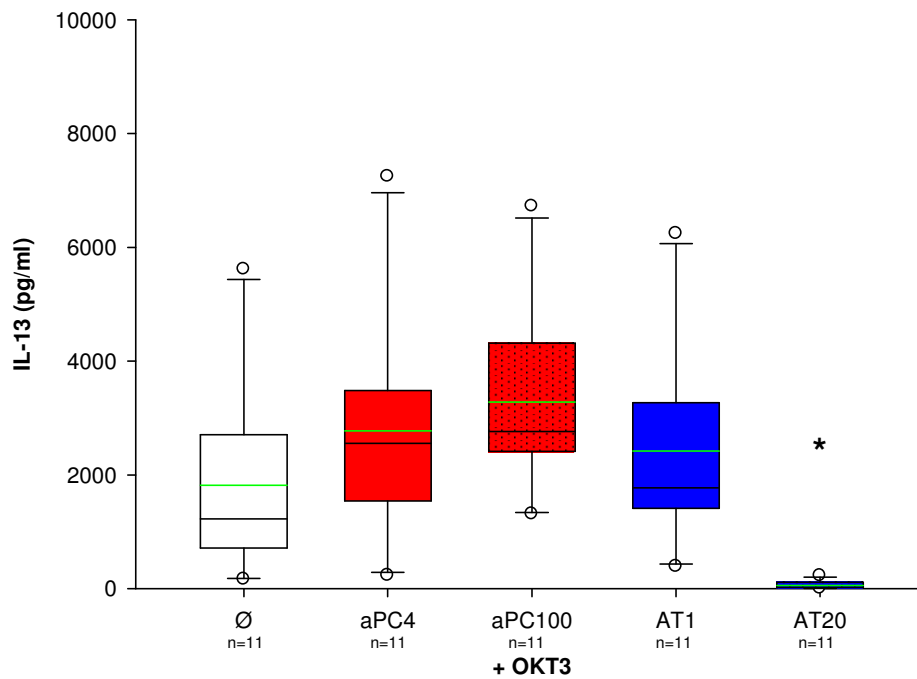
Abbildung 32 zeigt, dass der AT20 Effekt auch bei polytraumatisierten Patienten nachweisbar ist. Am ersten posttraumatischen Tag verringert sich unter AT20 die IL-13 Ausschüttung von 1944 ± 539 auf 77 ± 160 pg / ml signifikant ($p < 0,05$). Mit

- Ergebnisse -

$p=0,051$ (D3) und $p=0,091$ (D7) wird das geforderte Signifikanzniveau an den Tagen drei und sieben allerdings knapp verfehlt.

Daneben zeigt sich in den OKT3-stimulierten Ansätzen für aktiviertes Protein C eine, teilweise dosisabhängige (ausgenommen OP D-1 und PT D7), Zunahme der IL-13 Freisetzung. Diese Erhöhung erreicht jedoch weder bei Probanden noch bei Patienten statistische Signifikanz.

Abbildung 30: Durch AT20 verminderte IL-13 Freisetzung aus Zellen gesunder Probanden nach OKT3-Aktivierung; * $p<0,05$ vs. \emptyset



- Ergebnisse -

Abbildung 31: Signifikante Reduktion der IL-13 Freisetzung aus OKT3 aktivierten Ansätzen operierter Patienten; *p<0,05 / **p<0,01 vs. Ø

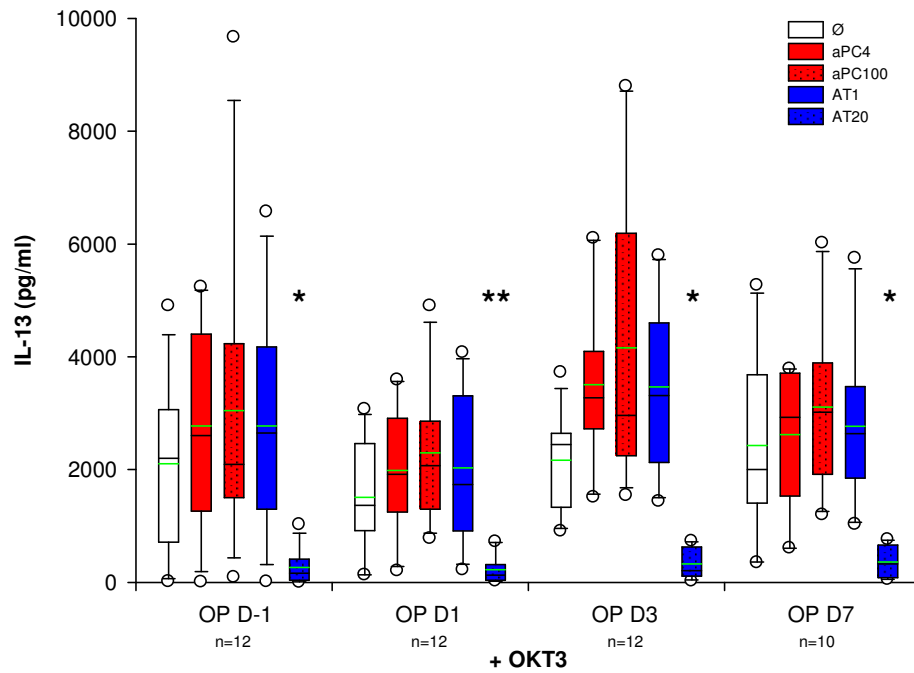
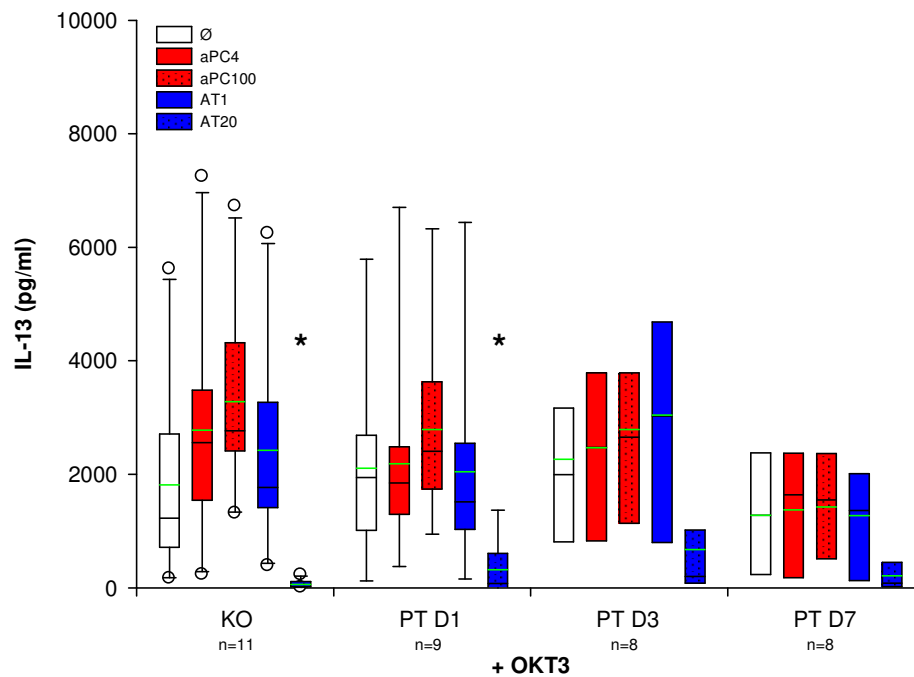


Abbildung 32: AT20 führt auch bei polytraumatisierten Patienten zu einer Reduktion der IL13 Freisetzung; *p<0,05 vs. Ø

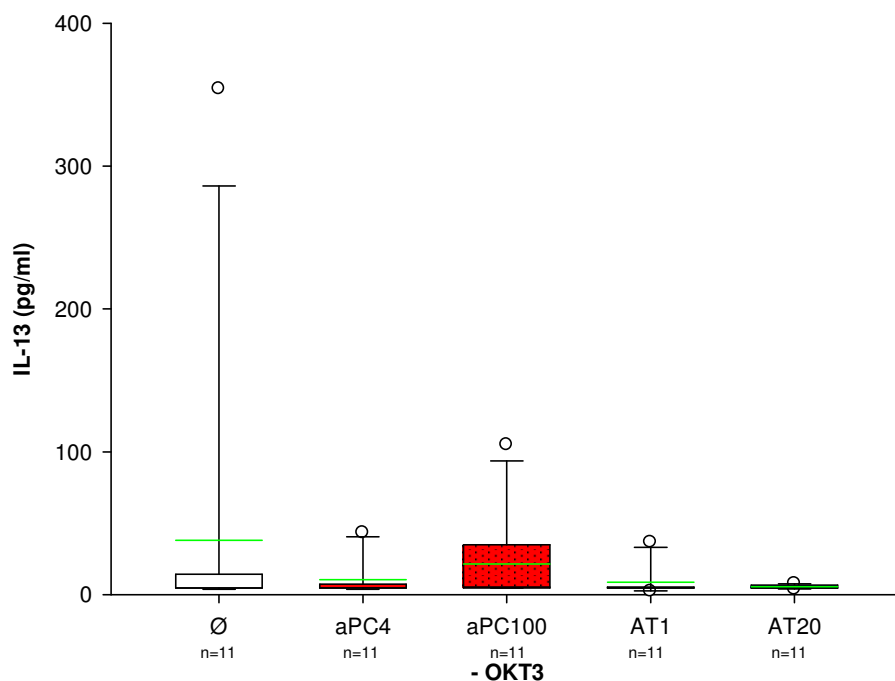


- Ergebnisse -

Ohne die Aktivierung mit OKT3 zeigt sich im Fall von IL13 zunächst keine nennenswerte Zytokin-Freisetzung. Für gesunde Kontrollen wurden im Median 5 ± 32 pg / ml gemessen. Die in den OKT3-aktivierten Ansätzen beobachtete Erhöhung der IL-13 Spiegel durch aktiviertes Protein C scheint jedoch bei nicht stimulierter KO- und OP-Gruppe ebenfalls vorzuliegen. Diese eventuelle Stimulation der IL-13 Freisetzung durch aPC100 liegt mit maximal 18 ± 11 pg / ml (OP D7) allerdings auf einem äußerst niedrigen Niveau. Hier ist der Umfang der Stichprobe zur Erkennung von Unterschieden keinesfalls geeignet. In

Abbildung 33, Abbildung 34 und Abbildung 35 sind die jeweiligen Zytokinmuster für gesunde Probanden, operierte sowie polytraumatisierte Patienten graphisch dargestellt. Signifikante Veränderungen fanden sich in keinem der Untersuchungsansätze.

Abbildung 33: IL13 Spiegel gesunder Probanden bei fehlender Aktivierung



- Ergebnisse -

Abbildung 34: Keine signifikanten Veränderungen der IL-13 Spiegel bei Operierten

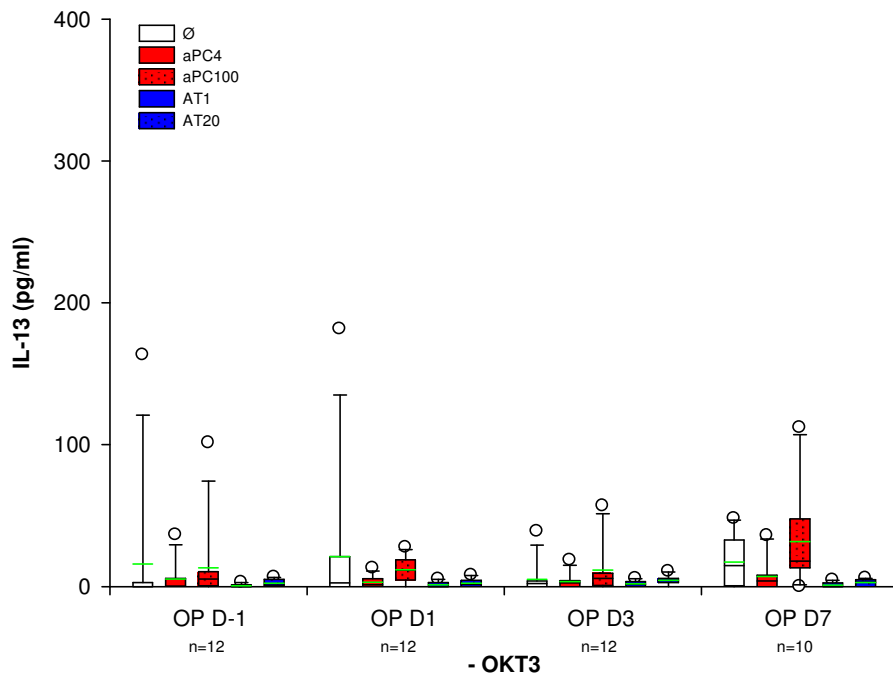
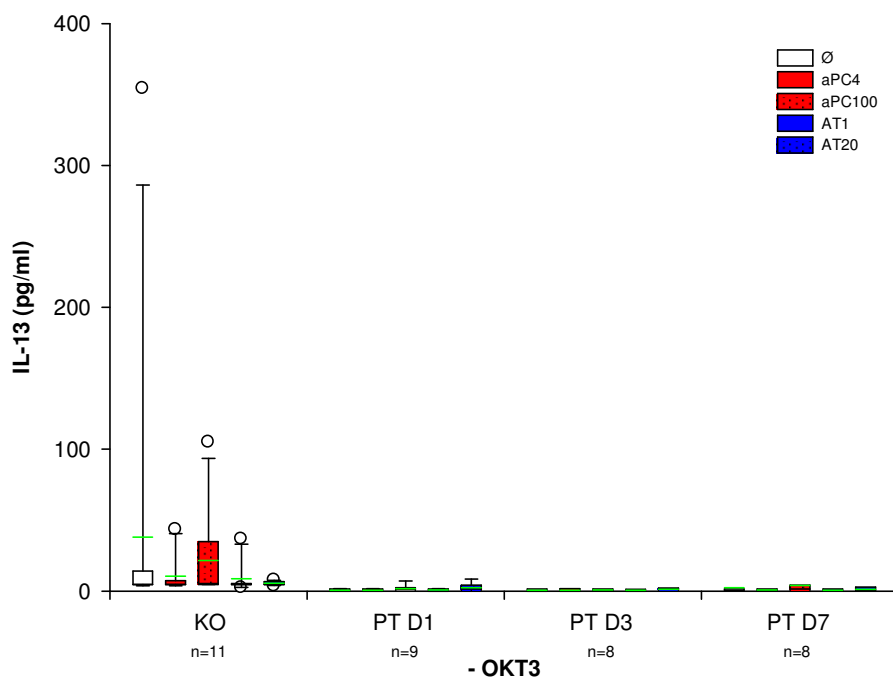


Abbildung 35: Kein Anstieg der IL-13 Freisetzung bei Polytraumatisierten



- Ergebnisse -

3.3.3 IFN- γ

In den OKT3-aktivierten Proben gesunder Probanden kommt es ohne Zugabe von aPC oder AT zu einer IFN- γ Freisetzung von im Median 9449 ± 3788 pg / ml. aPC100-vermittelt zeigt sich ein signifikanter Anstieg auf 41223 ± 5526 pg / ml. Auch aPC4 führt zu einer, statistisch nicht signifikanten, Erhöhung der IFN- γ Spiegel auf 16350 ± 5163 pg / ml. Demgegenüber zeigen sich mit 913 ± 718 pg / ml unter AT20 deutlich, jedoch nicht signifikant, verminderte Werte (siehe *Abbildung 36*).

Diese Effekte werden auch bei operierten Patienten beobachtet (siehe *Abbildung 37*). Während präoperativ mit 54564 ± 8741 (aPC100) respektive 3988 ± 897 (AT20) pg / ml die Veränderung gegenüber dem an diesem Tag gemessenen Referenzwert von 31290 ± 5745 pg/ ml noch keine statistische Signifikanz besitzt, so ist dies für aPC100 an den postoperativen Tagen eins (51251 ± 6773 versus 17253 ± 4311 pg / ml) und drei (66694 ± 24333 versus 13530 ± 9602 pg / ml) der Fall. In der AT20-Subgruppe erreicht der bereits in der Gesundheitskontrolle verzeichnete Abfall an den postoperativen Tagen eins (3350 ± 968 pg / ml) und sieben (2993 ± 1240 versus 29474 ± 15935 pg / ml) das geforderte Signifikanzniveau. Daneben zeigen sich unter aPC4 analog zur Kontrollgruppe für alle Tage tendenziell erhöhte IFN- γ Spiegel, mit einem Maximalwert von 53689 ± 8060 pg / ml (D-1).

In der Gruppe der polytraumatisierten Patienten lässt sich das beschriebene Zytokinmuster über alle Tage hinweg nachverfolgen (siehe *Abbildung 38*), erreicht jedoch in keinem der Versuchsansätze statistische Signifikanz.

- Ergebnisse -

Abbildung 36: Einfluss von aPC100 und AT20 auf die IFN- γ Synthese aktivierter Zellen gesunder Probanden; * $p < 0,05$ vs. \emptyset

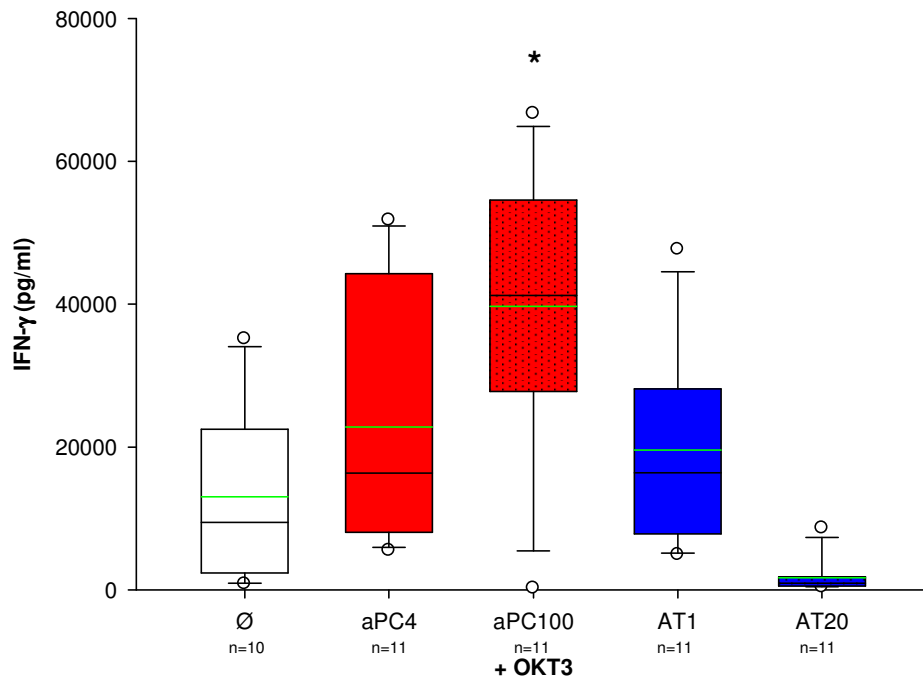
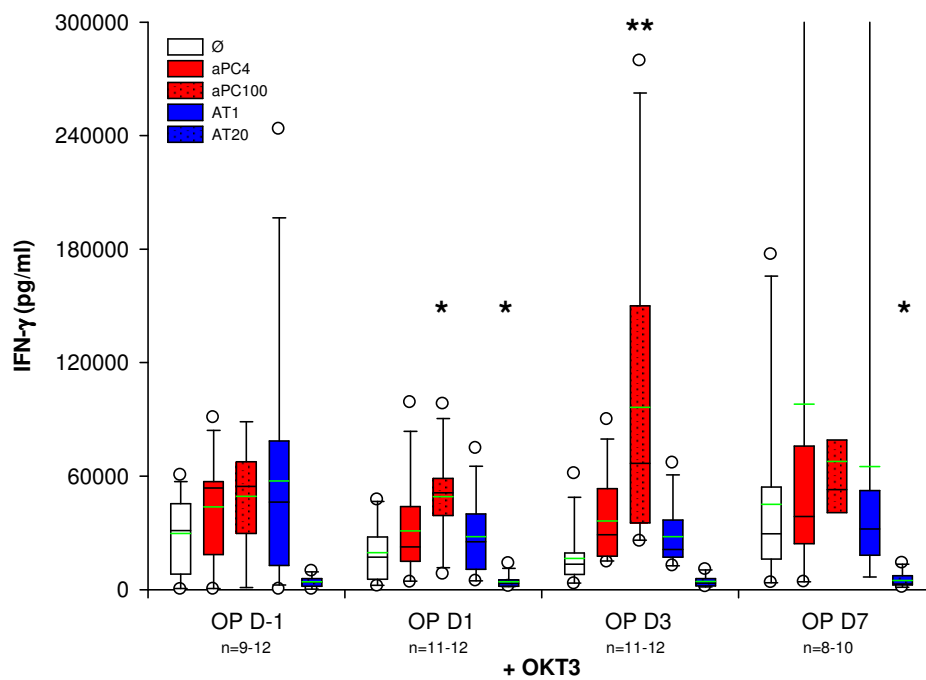
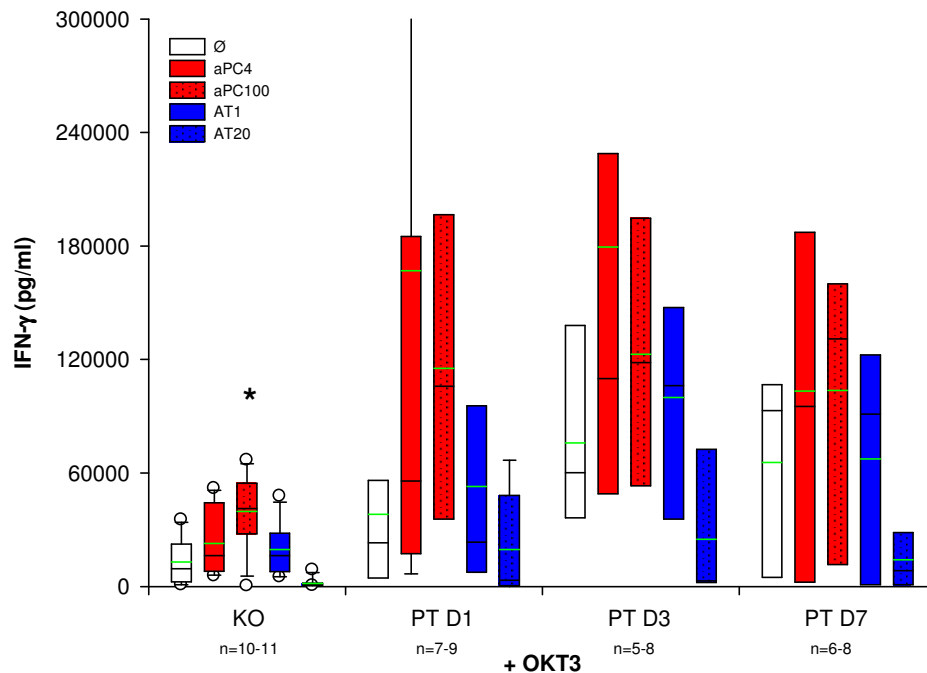


Abbildung 37: Effekte von aPC100 und AT20 auf die IFN- γ Spiegel sind auch bei Operierten nachweisbar; * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ vs. \emptyset



- Ergebnisse -

Abbildung 38: Die Wirkung von aPC100 und AT20 auf die IFN- γ Freisetzung ist in der PT-Gruppe nicht signifikant; * $p < 0,05$ vs. \emptyset



Wie schon für IL-6 beobachtet kommt es in unstimulierten Proben zu einer vermehrten Freisetzung von IFN- γ durch AT20. Während der Referenzwert der Gesundkontrolle bei 7 ± 56 pg / ml liegt, steigt der IFN- γ Spiegel durch Zugabe supraphysiologischer AT-Konzentrationen auf 458 ± 307 pg / ml signifikant an (siehe *Abbildung 39*).

Auch in der Gruppe der elektiv operierten Patienten führt AT20 zu einer, mit Ausnahme von D1 (988 ± 209 versus 30 ± 119 pg / ml), signifikanten Erhöhung der IFN- γ Liberation aus unstimulierten Ansätzen (siehe *Abbildung 40*). Dabei wurden die höchsten Werte mit im Median 1348 ± 261 pg / ml versus 18 ± 21 pg / ml am dritten postoperativen Tag gemessen.

Ein vergleichbares Bild zeigt die Analyse der PT-Gruppe. Die Unterschiede erreichen zwar für die einzelnen Tage kein Signifikanzniveau. Aber vor allem am dritten Tag nach Trauma liegen die für AT20 registrierten Werte mit im Median 669 ± 273 pg / ml deutlich über den 18 ± 21 pg / ml der unbehandelten Probe (siehe *Abbildung 41*). Für die übrigen Versuchsansätze konnte dagegen keine relevante Veränderung der Zytokinsynthese gezeigt werden.

- Ergebnisse -

Abbildung 39: Steigerung der IFN- γ Freisetzung aus dem unstimulierten AT20-Ansatz bei gesunden Probanden; * $p < 0,05$ vs. \emptyset

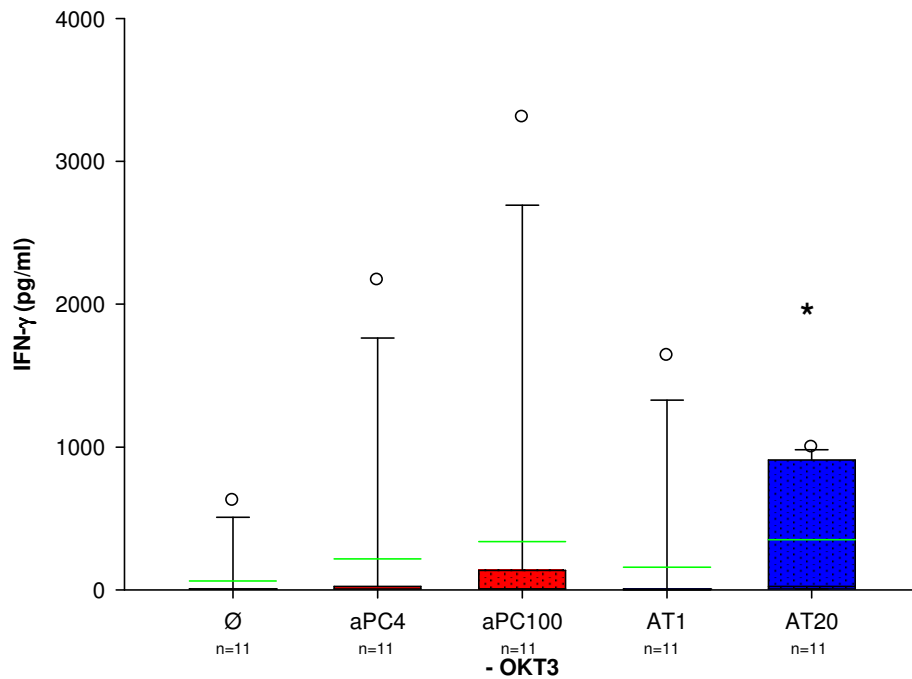
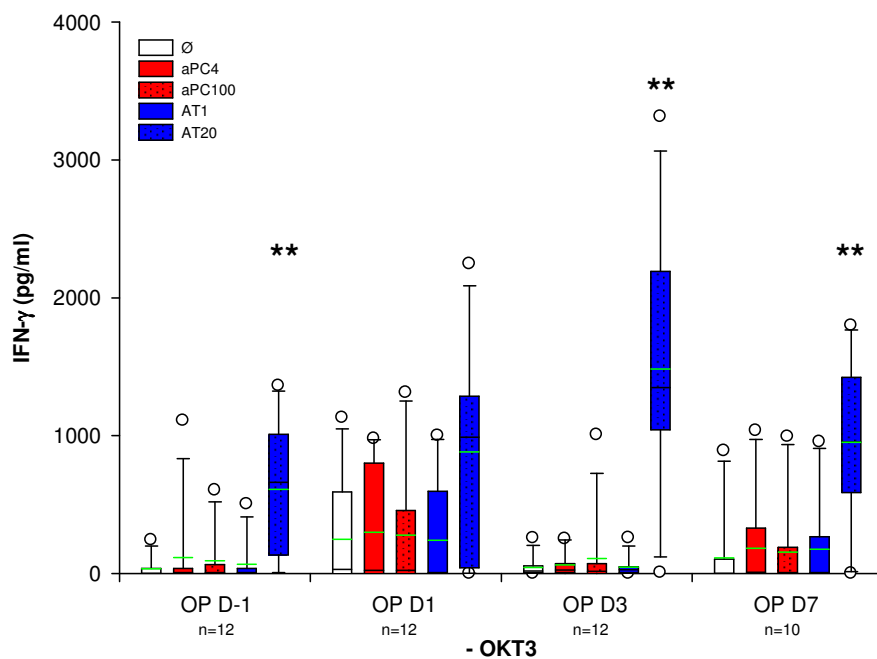
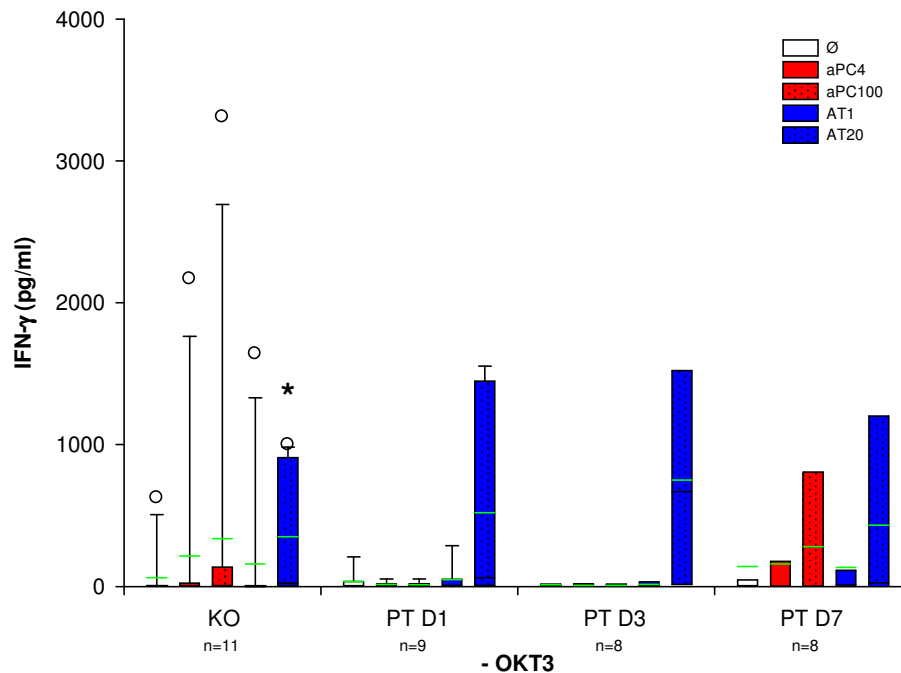


Abbildung 40: Erhöhung der IFN- γ Spiegel in nicht aktivierten AT20-Anätzen bei operierten Patienten; ** $p < 0,01$ vs. \emptyset



- Ergebnisse -

Abbildung 41: Nicht signifikante Erhöhung von IFN- γ durch AT20 nach Polytrauma;
* $p < 0,05$ vs. \emptyset



3.3.4 Probatorische Messungen von IL-4 und TNF- α

Zusätzlich zu den vorgenannten Untersuchungen erfolgten probatorische Messungen zur Wirkung von aktiviertem Protein C auf die OKT-induzierte Zytokinfreisetzung von IL-4 und TNF- α . Die Messungen beschränken sich allerdings lediglich auf Proben von elektiv operierten Patienten mit einer deutlich reduzierten Stichprobengröße (siehe auch Abschnitt 4.3).

Hier fand sich jedoch kein Einfluss von aPC auf die IL-4 Freisetzung (siehe *Abbildung 42*). Dagegen führt die Vorbehandlung mit aPC am Tag 1 nach Operation zu einem signifikanten Anstieg der TNF- α Spiegel (siehe *Abbildung 43*). Dieser Effekt konnte auch an Zellen von gesunden Probanden beobachtet werden (siehe *Abbildung 44*).

- Ergebnisse -

Abbildung 42: Kein Einfluss von aPC auf die Freisetzung von IL-4 bei operierten Patienten nach OKT3-Stimulation

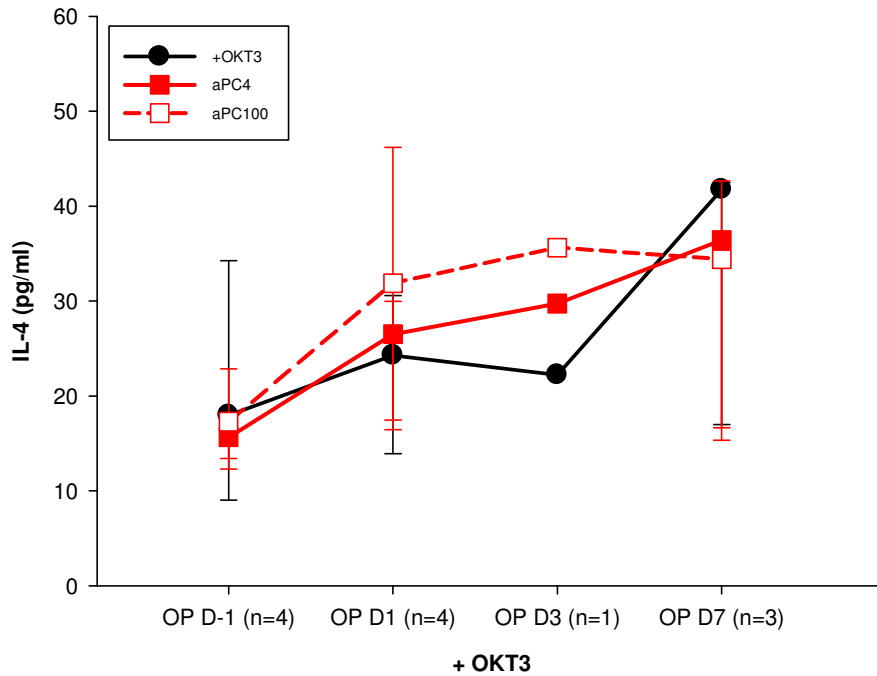
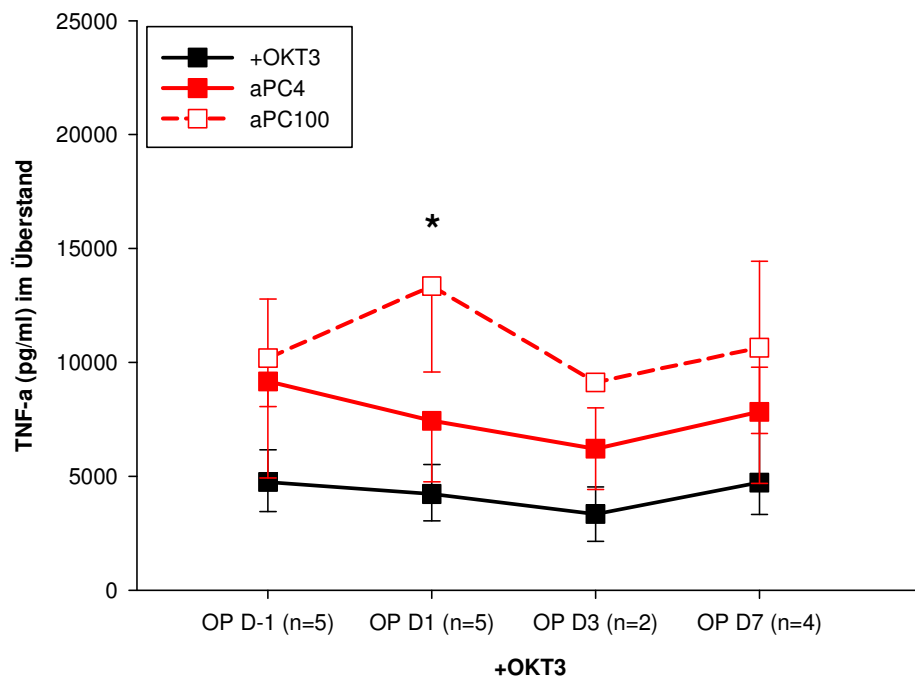
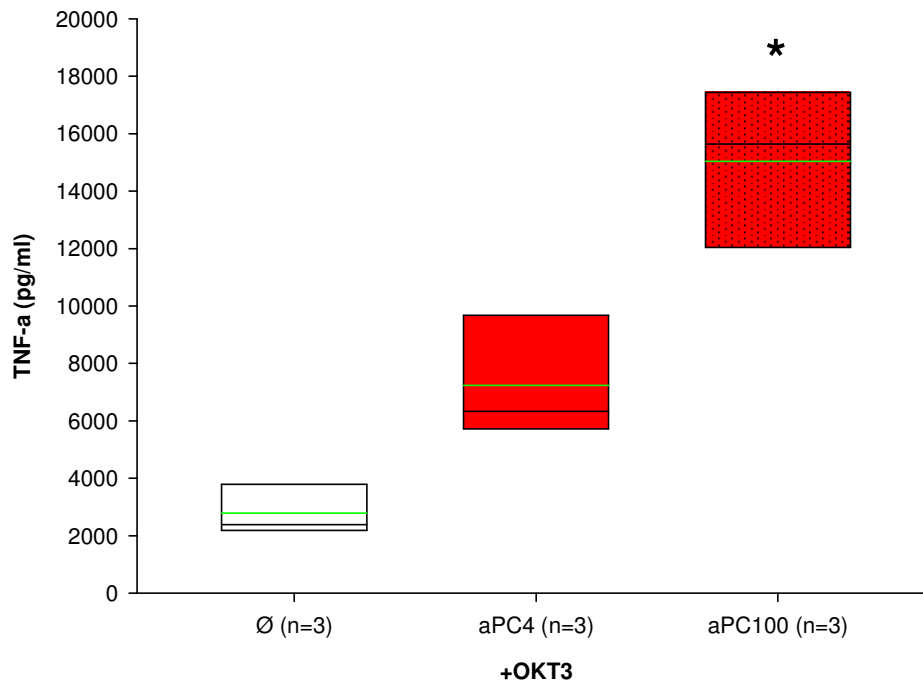


Abbildung 43: Gesteigerte TNF- α Freisetzung bei operierten Patienten durch aPC nach OKT3-Stimulation; * $p < 0,05$ vs. +OKT3



- Ergebnisse -

Abbildung 44: Signifikante Steigerung der TNF- α Freisetzung nach OKT3-Stimulation durch aPC100 bei gesunden Probanden; * $p < 0,05$ vs. \emptyset



3.4 Einfluss von Heparin

Die Auswertung der Messergebnisse zeigt keinen Einfluss von Heparin auf die supprimierende Wirkung von AT in supraphysiologischer Konzentration auf die LPS-induzierten Immunantwort von PBMCs gesunder Probanden.

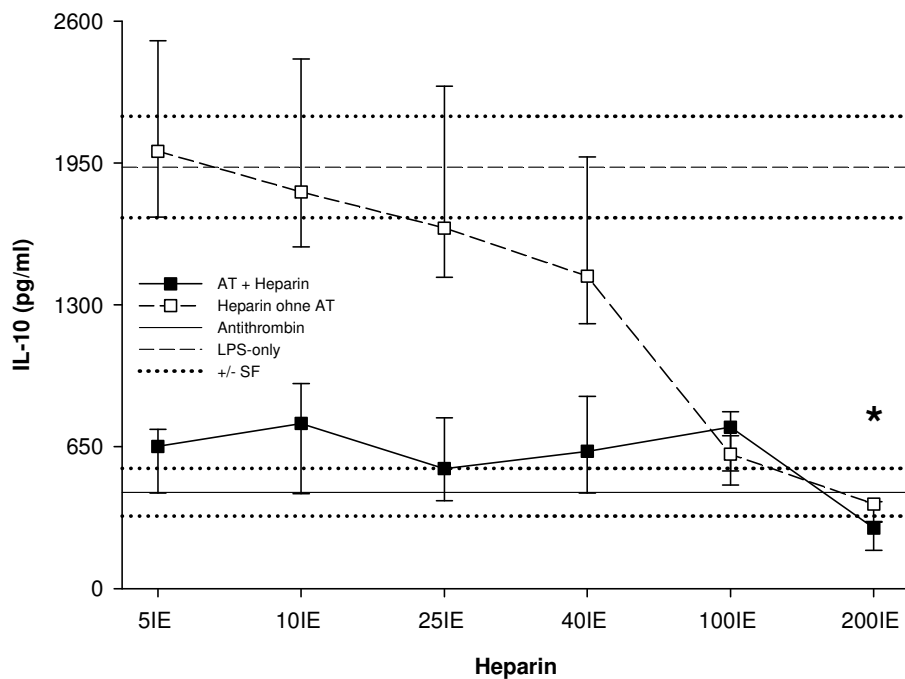
Die Analyse bestätigt zunächst, trotz des geringen Umfangs der Stichprobe ($n=4$), die zuvor gezeigten Effekte von AT20. Sowohl bei IL-10 (441 ± 109 versus 1931 ± 232 pg / ml) als auch bei TNF- α (483 ± 175 versus 4404 ± 834 pg / ml) kommt es durch Antithrombin zu einer signifikant reduzierten Zytokinfreisetzung (beide $p=0,029$, Mann-Whitney-Test). Die zusätzliche Gabe ansteigender Konzentrationen an Heparin zeigt dagegen weder Abschwächung noch Verstärkung dieses Effektes. Die gemessenen IL-10 Spiegel reichen hier von 277 ± 67 (200IE Heparin) bis 756 ± 252 (10IE) pg / ml. Die für TNF- α registrierten Werte liegen im Median zwischen 414 ± 85 (200IE) und 658 ± 204 (10IE) pg / ml. Damit unterscheiden sich die Zytokinspiegel statistisch nicht von der alleinigen Antithrombin-Gabe.

- Ergebnisse -

Einen eigenen Effekt auf die Zytokinfreisetzung zeigt Heparin in den Proben, welche nicht mit Antithrombin versetzt sind. Die alleinige Heparin-Zugabe führt hier zu einer dosisabhängigen Verminderung der Spiegel von IL-10 und TNF- α . Bei 5IE Heparin wurden für IL-10 im Median noch 2004 ± 404 pg / ml gemessen. Dieser Wert sinkt mit steigender Heparin-Konzentration. Bei 200IE Heparin werden nur noch 388 ± 47 pg / ml registriert ($p < 0,05$). Die TNF- α Spiegel verhalten sich vergleichbar. Beginnend mit 3189 ± 898 pg / ml bei 5IE fallen die Werte kontinuierlich bis auf 1793 ± 244 pg / ml bei 200IE.

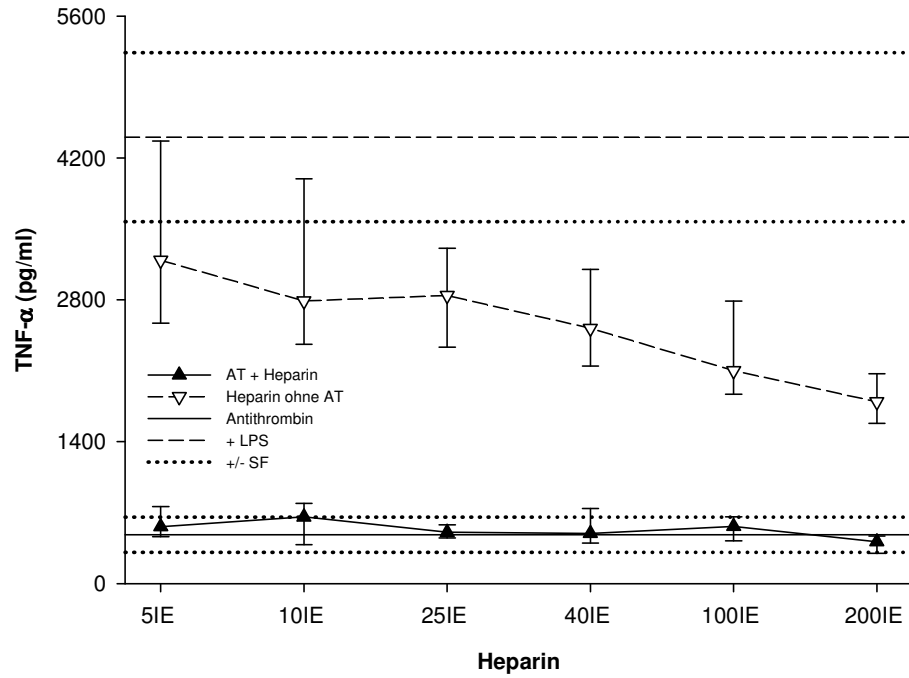
Die Ergebnisse sind in den *Abbildungen 45* und *46* dargestellt.

Abbildung 44: Verlauf der IL-10 Spiegel unter Heparin-Zugabe mit und ohne AT Zusatz; * $p < 0,05$ für Heparin 200IE ohne AT vs. LPS-only



- Ergebnisse -

Abbildung 45: TNF- α Verlauf unter Einwirkung von Antithrombin und Heparin



4 Diskussion

4.1 Immunstatus

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigt einen tendenziellen Abfall des relativen Lymphozytenanteils nach Trauma. Dies steht im Einklang mit früheren Ergebnissen sowohl der eigenen Arbeitsgruppe als auch weiterer Studien (O'Mahony et al., 1985, Zedler, 2003). Gleichzeitig konnte eine signifikante Zunahme der relativen Monozytenpopulation an allen Tagen nach Gewebetrauma gezeigt werden. Auch dies wurde bereits in vergleichbaren Untersuchungen unter Anderem für elektiv operierte Patienten nachgewiesen (Franke et al., 2009). Als Ausdruck der veränderten Immunlage ist die signifikante Abnahme der HLA-DR Expression auf Monozyten zu werten. Dabei wird dieser Abfall als einer der Gründe für die vermehrte Anfälligkeit der Patienten für septische Komplikationen angesehen.

Im Einklang mit den Ergebnissen von Lendemans *et al.* kam es zu keiner Änderung der TLR4 Expression auf Monozyten, was auf eine untergeordnete Bedeutung im Rahmen der immunologischen Antwort auf Gewebetrauma und dem damit assoziierten MOV oder einer Sepsis hindeutet (Lendemans et al., 2007).

Diese immunologischen Veränderungen zeigen vor allem, dass in dem verwendeten Modell durch das vorangehende unfallbedingte oder operative Trauma ein adäquates „Priming“ der Zellen angenommen werden kann. Bezüglich der erhobenen durchflusszytometrischen Parameter unterscheiden sich dabei die Zellen polytraumatisierter nicht von denen operierter Patienten.

Eine Polytraumatisierung bringt für den Organismus jedoch eine deutlich höhere Belastung mit sich, die zu einer stärkeren Auslenkung der physiologischen Homöostase führt. Diese Auslenkung ist mittels SAPS II Score messbar. So ist der SAPS II Wert bei Polytraumatisierten rund doppelt so hoch, was die erhöhte Inzidenz von MOV und Sepsis sowie die beobachtete Mortalität erklärt.

4.2 Patientenkollektiv

Bezüglich der Patientenauswahl erfolgte kein Matching der Patienten bezüglich Geschlecht oder Alter. Als kritisch anzusehen ist hierbei die Prädominanz männlicher Probanden innerhalb der Polytrauma-Gruppe. Bekanntermaßen zeigen weibliche Unfallopfer eine geringere Letalität bei vergleichbarer Unfallschwere. Dies scheint auf einer Beeinflussung der zellulären Immunfunktion durch regulative Wirkung von Sexualhormonen zu beruhen (Choudhry et al., 2007). Andererseits entspricht die Geschlechterverteilung der klinischen Realität mit überwiegend männlichen Unfallopfern. Bezüglich der Altersverteilung besteht zwischen den Patientengruppen Ausgeglichenheit, während die gesunden Probanden im Mittel jünger sind.

4.3 Aktiviertes Protein C

Unsere Daten zeigen, dass physiologische Konzentrationen von aktiviertem Protein C, mit Ausnahme einer möglicherweise dosisabhängigen Wirkung auf die Freisetzung von Interferon- γ , keinen Einfluss auf die LPS- bzw. OKT3-induzierten Spiegel der hier untersuchten Zytokine besitzen. Dies deckt sich insofern mit Beobachtungen anderer Autoren, die bei vergleichbaren Dosierungen ebenfalls keine Effekte nachweisen konnten (White et al., 2000, Yuksel et al., 2002).

Allerdings konnten wir auch für supraphysiologische Gaben von aPC keine Veränderung der TNF- α und IL-10 Spiegel nach Stimulation der Monozyten mit LPS nachweisen. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist die Tatsache, dass für unsere Studie originär humane PBMC, also mononukleäre Immunzellen Verwendung fanden. Bei den beiden Patientengruppen ging ein Priming durch Gewebetrauma voraus. Im Unterschied hierzu zeigten bisherige Untersuchungen einen antiinflammatorischen Einfluss von aPC unter anderem auf Endothelzellen (Joyce et al., 2001, Franscini et al., 2004), Eosinophile (Feistritzer et al., 2003) oder neutrophile Granulozyten (Sturn et al., 2003, Nick et al., 2004). Studien an mononukleären Immunzellen erfolgten dagegen zumeist an kommerziell entwickelten (monozytären) Zelllinien oder an Monozyten, welche aus dem Blut septischer Patienten isoliert wurden (Grey et al., 1994, White et al., 2000, Brueckmann et al., 2004). Interessanterweise konnte letztgenannte Arbeit analog zu

- Diskussion -

unseren Ergebnissen keinen Einfluss von aPC auf die Freisetzung der Chemokine MIP-1- α und MCP-1 aus mononukleären Zellen gesunder Spender (wohl aber aus Zellen septischer Patienten sowie einer monozytären Zelllinie) zeigen. Im Gegensatz zu unseren Daten und den Ergebnissen von Brueckmann zeigten jedoch zwei Arbeiten eine Reduktion der Zytokinfreisetzung aus stimulierten Monozyten gesunder Spender (Stephenson et al., 2006, Yuksel et al., 2002). Es muss in diesem Zusammenhang angemerkt werden, dass es sich bei unserem Studienprotokoll allerdings um ein serumfreies Modell handelt. Die Rationale hierzu liegt eben genau darin, die unbemerkte Zugabe von gerinnungsaktiven Mediatoren, die physiologischer Weise im Serum enthalten sind, zu vermeiden, um unbemerkte Einflüsse zu unterbinden. Alle aufgeführten Arbeiten an mononukleären Zellen, also auch die beiden zuletzt genannten, verwendeten im Gegensatz dazu ausnahmslos serumhaltige Ansätze. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die postulierten antiinflammatorischen Eigenschaften von aPC an derzeit nicht bekannte, im Serum zirkulierende, Ko-Faktoren gebunden sein könnten. Kurioserweise beobachteten Schmidt-Supprian und Mitarbeiter einen exakt gegenteiligen Effekt von Serum in ihren Versuchsansätzen. Bei Zugabe von fetalem Kälberserum war die beobachtete Reduktion der Zytokinfreisetzung aus einer monozytären Zelllinie durch aPC nicht mehr nachweisbar (Schmidt-Supprian et al., 2000). Während diese divergierenden Ergebnisse die Bedeutung von passenden Umgebungsbedingungen für die Wirkung von aPC unterstreichen, bleiben die genauen Einflussfaktoren nach wie vor unklar und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Darüber hinaus kann die in der Literatur postulierte Reduktion der Zytokinfreisetzung durch aPC noch keineswegs als grundsätzlich gesichert gelten. So konnte in zwei humanen Endotoxämie-Modellen weder durch rekombinantes aPC noch durch die Gabe des Protein C Proenzym eine Reduktion der Zytokinspiegel in vivo erreicht werden (Derhaschnig et al., 2003, Spiel et al., 2005). Auch konnte im Rahmen einer Auswertung der Daten der PROWESS-Studie letztlich keine Reduktion der IL-6 Spiegel durch aPC gezeigt werden (Dhainaut et al., 2003). Diese Diskrepanz zwischen in-vitro und in-vivo Ergebnissen bedarf ebenfalls der weiteren Klärung.

- Diskussion -

Im Gegensatz zur LPS-Stimulation kommt es unter Aktivierung der Lymphozyten mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD3 (OKT3) zu einer Erhöhung der Zytokinfreisetzung durch supraphysiologische Konzentrationen von aPC. Diese Steigerung ist im Fall von IL-6 bei gesunden Spendern und operierten Patienten an allen Tagen hochsignifikant. Die Erhöhung der IFN- γ Spiegel zeigt ein vergleichbares Bild, erreicht aber nur in der Probandengruppe und an den Tagen eins und drei nach Operation das geforderte Signifikanzniveau. Dagegen scheint hier der Effekt möglicherweise dosisabhängig zu sein und bereits bei physiologischen Konzentrationen von aPC aufzutreten. Da die beobachtete Erhöhung der IL-6 und IFN- γ Spiegel bei Probanden und operierten Patienten aus unserer Sicht statistisch äußerst belastbar ist und dieser Trend in der Polytraumagruppe klar nachvollziehbar ist, gehen wir hier, bezüglich des verfehlten Signifikanzniveau, von einer zu geringen Stichprobe aus. Für IL13 zeigt sich durch aPC in der Konzentration 100 μg pro ml ein inkonstanter Trend zur erhöhten Freisetzung sowohl in aktivierten als auch inaktivierten Ansätzen. Statistische Signifikanz wird hier jedoch zu keinem Zeitpunkt erreicht, so dass ein relevanter Einfluss zumindest fraglich erscheint.

Unsere Ergebnisse stehen somit im Widerspruch zu einer Reihe von Arbeiten die für aPC antiinflammatorische Wirkung postulieren (s.o.). Allerdings erfolgte in keiner der genannten Untersuchungen, sofern überhaupt mononukleäre Zellen Verwendung fanden, eine Aktivierung der lymphozytären Zellen. Die Studienprotokolle sahen hier mehrheitlich eine Stimulation mit LPS und damit der Monozyten (-Fraktion) vor. Eine gesteigerte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen durch aPC wurde nach unserem Kenntnisstand bisher nur von Hooper *et al.* beschrieben (Hooper *et al.*, 1998). Diese Untersuchungen erfolgten jedoch ausschließlich an Endothelzellen und zeigten neben einer erhöhten IL-6 und IL-8 Freisetzung keine Beeinflussung einer Reihe weiterer pro- sowie antiinflammatorischer Zytokine (u.a. IFN- γ). Einschränkend zu erwähnen ist jedoch, dass unser Modell keine streng isolierte Betrachtung der einzelnen Zellpopulationen zulässt, da in den Ansätzen sämtliche mononukleären Zellen in der Suspension enthalten sind.

Unsere Ergebnisse zeigen somit nur die vermehrte Freisetzung von INF- γ , welches allerdings als Leitzytokins der T_H1-Antwort gilt., Mit Ausnahme von IL-6 kommt es dagegen offensichtlich zu keiner Beeinflussung der maßgeblichen T_H2-Zytokine

- Diskussion -

(u.a. IL-13), soweit dies bei dem schmalen untersuchten Zytokinprofil beurteilbar wird. Allerdings kann man davon ausgehen, dass die Freisetzung von IL-6 aus T_H2 Zellen quantitativ nur von untergeordneter Bedeutung ist. Wichtigster Produzent von IL-6 sind bekanntermaßen aktivierte Monozyten und TNF- α stellt hierfür einen der stärksten Stimuli dar. In einer probeweisen Messung von TNF- α in den Überständen OKT3-stimulierter Zellen zeigte nach Zugabe von aPC eine dosisabhängige, teils signifikante, Erhöhung der Freisetzung von TNF- α aus Zellen operierten Patienten. Vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen ist es daher durchaus vorstellbar, dass es durch die scheinbar vermehrte Freisetzung von TNF- α zu einer Aktivierung der Monozyten im Ansatz kommt und diese die eigentliche Quelle der beobachteten IL-6 Anstiege darstellen. Unterstützend sei in diesem Zusammenhang die Arbeit von Yuda *et al.* genannt. Diese konnten in einem Mausmodell nachweisen, dass aPC nach Asthmainduktion die Freisetzung von T_H2-Zytokinen aus Lymphozyten supprimiert und deren Spiegel in bronchoalveolärer Flüssigkeit reduziert. Umgekehrt erhöht es die Spiegel von IFN- γ (Yuda et al., 2004).

Auch die probatorische Messung von IL-4, dem T_H2-Leitzytokin, in den Kulturüberständen OKT3-stimulierter Lymphozyten zeigte jedenfalls keine Veränderungen., so dass wir in der Zusammenschau unsere Ergebnisse somit den Schluss ziehen, dass aPC in einem serumfreien ex-vivo Modell vor allem ein Aktivator der T_H1-Antwort in humanen PBMC ist. Dies ist umso erstaunlicher, da ein Nachweis von EPCR auf Lymphozyten zumindest bisher noch aussteht. Dagegen konnte eine direkte Beeinflussung der Zytokinfreisetzung aus Monozyten beziehungsweise T_H2-Zellen nicht nachgewiesen werden. Der nicht zuletzt durch die PROWESS-Studie belegte Überlebensvorteil nach Gabe von rekombinantem aktiviertem Protein C (Bernard et al., 2001; siehe hierzu auch anhängendes Addendum) könnte daher weit mehr als bisher vermutet auf einer Restauration der Immunbalance und weniger auf einer rein antiinflammatorischen Wirkung beruhen.

4.4 Antithrombin

Unsere Ergebnisse zeigen, dass, vergleichbar zu aktiviertem Protein C, physiologische Konzentrationen von Antithrombin keine Wirkung auf die Freisetzung

- Diskussion -

der untersuchten Zytokine entfalten. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Oelschläger *et al.* die für physiologische Konzentrationen an AT (1 IE pro ml) keinen Effekt auf die NF- κ B Aktivität sowie TNF- α Freisetzung zeigen konnten (Oelschläger *et al.*, 2002). Auch Komura *et al.* konnten signifikant reduzierte TNF- α Spiegel erst ab Konzentration von 3 IE pro ml zeigen (Komura *et al.*, 2008). Interessanterweise konnten Souter und Kollegen nachweisen, dass bei Verwendung von Vollblut im Unterschied zu Monozytenkulturen bereits physiologische Konzentrationen an AT genügen, um eine Reduktion der Zytokinfreisetzung zu erreichen (Souter *et al.*, 2001). Sie schlossen daraus, dass möglicherweise auf Grund von Zellinteraktionen die Wirkung von AT potenziert wird.

Für supraphysiologische Konzentrationen an AT konnten wir dagegen nachweisen, dass dieses bei in-vitro Stimulation von PBMC mit Endotoxin zu teils hochsignifikant reduzierten Spiegeln des proinflammatorischen Zytokins TNF- α führt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der beiden oben genannten Arbeiten von Oelschläger und Komura, die diesen Effekt für isolierte Monozyten gesunder Probanden bereits beschrieben haben und erweitert die Gültigkeit nun auch auf durch Trauma geprägte Immunzellen. Desweiteren konnten wir eine hochsignifikante Reduktion der Freisetzung von IL-10 aus Proben gesunder Probanden beobachten. Die Messung von IL-10 in stimulierten Ansätzen von operierten und polytraumatisierten Patienten zeigt ebenfalls einen eindeutigen Trend zu erniedrigten Spiegeln, so dass wir hier von einer Bestätigung der Ergebnisse bei gesunden Probanden ausgehen und annehmen dürfen, dass der suppressive Effekt auf die Funktion der Immunzellen unter dem Einfluss von ausgedehntem Gewebetrauma nach operativem Eingriff oder schwerer Unfallverletzung erhalten bleibt. Da es sich bei IL-10 um ein antiinflammatorisches Zytokin handelt, welches zwar vornehmlich von T_H2-Zellen aber auch von Monozyten synthetisiert wird, ist die genaue Bedeutung dieses Ergebnisses derzeit noch unklar. Denkbar ist sowohl ein direkter Einfluss von AT auf Monozyten und Lymphozyten, als auch eine Hemmung der Freisetzung im Sinne eines negativen Feedbacks durch die reduzierten TNF- α Spiegel.

Überraschenderweise kommt es demgegenüber in unstimulierten Ansätzen zu einer, teils signifikanten, Erhöhung der TNF- α Freisetzung durch Zugabe von AT. Zwar ist eine unspezifische Stimulation der PBMC durch supraphysiologische Konzentrationen an AT nicht ausgeschlossen. Da aber zytotoxische Effekte von AT sowohl durch Oelschläger und Komura für isolierte Monozyten als auch durch Zuo

- Diskussion -

et al. für die auch von uns verwendeten PBMC bereits geprüft und ausgeschlossen wurden, ist dies eher unwahrscheinlich (Zuo et al., 2001). Eine mögliche Erklärung könnte jedoch die im OKT3-Modell beobachtete, durch AT ausgelöste, Steigerung der IFN- γ Freisetzung aus OKT3-freien, unstimulierten Proben sein (s.u.). In den PBMC könnte es so zu einer, wenn auch geringen, Stimulation der Monozyten durch das überwiegend aus T_H1-Lymphozyten stammende IFN- γ kommen.

In humanen PBMC supprimiert Antithrombin nach Aktivierung der Lymphozyten durch OKT3 die Freisetzung von IL-13 sowohl in gesunden Probanden, als auch nach vorhergehendem Gewebetrauma. Mit Ausnahme der Tage drei ($p=0,051$) und sieben ($p=0,091$) nach Polytrauma ist dieses Ergebnis durchgehend signifikant. Auch die Spiegel von IFN- γ werden nach Aktivierung der Lymphozyten in allen drei Subgruppen durch AT reduziert, Signifikanz wird dagegen nur in zwei Ansätzen operierter Patienten erreicht. Dies bestätigt Ergebnisse der bereits erwähnten Studie von Zuo. So konnte diese Gruppe für Lymphozyten, die aus einer Rattenmilz isoliert wurden, eine nahezu komplette Inhibition der mRNA Expression von IFN- γ und IL-4 durch AT nachweisen. Außerdem konnten wir zeigen, dass es sowohl in aktivierten als auch nicht aktivierten Ansätzen zu einer teils hochsignifikanten Steigerung der IL-6 Liberation kommt. Dieses unerwartete Ergebnis steht nicht zuletzt in Widerspruch zu den Arbeiten von Oelschläger und Souter, welche durch AT signifikant reduzierte IL-6 Spiegel nachwiesen. Diese Untersuchungen erfolgten jedoch an LPS-stimulierten Monozyten und nicht an OKT3-aktivierten PBMC. Zuo und Mitarbeiter fanden dagegen bezüglich der Genexpression in Lymphozyten keine Reduktion der IL-6 mRNA Expression. Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Freisetzung von IL-6 in unseren OKT3-aktivierten PBMC ist die starke Supprimierung von IL-13, einem hochpotenten Inhibitor der IL-6 Synthese in Monozyten (Kim et al., 1995). Möglicherweise führt dies zu einer ungehemmten Freisetzung von IL-6 aus den Monozyten der Zellsuspension. Warum AT in einem solchen Szenario jedoch nicht in der Lage ist, eine monozytäre IL-6 Freisetzung in der von anderen Autoren beschriebenen Weise zu supprimieren bleibt unklar und bedarf der weiteren Klärung.

In den nicht stimulierten Ansätzen fanden wir neben der bereits beschriebenen Erhöhung der TNF- α und IL-6 Spiegel auch eine, überwiegend signifikante, Erhöhung der IFN- γ Spiegel durch supraphysiologische AT Dosen. Bezüglich einer

- Diskussion -

unspezifischen Stimulation durch hohe Konzentrationen an AT besitzen die schon für TNF- α gemachten Ausführungen unverändert Gültigkeit. Die vermehrte Sekretion von TNF- α und IL-6 ist jedoch möglicherweise direkte Folge der gesteigerten IFN- γ Freisetzung, da IFN- γ zur Aktivierung von Monozyten und damit zu einer Zytokinfreisetzung führen kann. Möglicherweise kommt es hierdurch zu einer „basalen“ Sekretion, welche auch durch hohe AT Konzentrationen nicht weiter reduziert werden kann.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Antithrombin in-vitro mit Ausnahme von IL-6 und im Unterschied zu aPC zu einer breiten Suppression der Zytokinfreisetzung aus stimulierten PBMC führt. Diese geringe Spezifität der Wirkung ist eventuell für die wenig befriedigenden Ergebnisse verantwortlich, die sowohl in der KyberSept Studie, der bisher umfangreichsten klinischen Prüfung, an septischen Patienten (Warren et al., 2001), als auch im Rahmen einer Phase II Studie an polytraumatisierten Patienten festgestellt wurden (Waydhas et al., 1998).. Da eine generelle Immunsuppression in Abhängigkeit des klinischen Verlaufs und des Zeitpunkts einer möglichen Administration unter Umständen deletäre Folgen hätte, erscheint eine supportive Anwendung in Anbetracht der von uns gezeigten Effekte auf die zelluläre Immunfunktion zumindest schwierig.

4.5 Kombination von aPC und AT

Im Rahmen der originären Versuchsplanung stellte sich die Frage nach den Effekten, die aus der Kombination der Substanzen AT und aPC erwachsen könnten. Da eine gemeinsame Gabe von aktiviertem Protein C und Antithrombin unseres Wissens bisher nicht Gegenstand von Untersuchungen war, prüften wir in unserem LPS-Modell mögliche wechselseitige Beeinflussungen der beiden Gerinnungsinhibitoren. Da die antikoagulatorische Potenz von AT nicht zuletzt auf seiner Rolle als Serpin, also der Inhibition von Serinproteasen beruht, erschien eine Wechselwirkung mit aktiviertem Protein C nicht ausgeschlossen. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass in humanen PBMC zumindest nach LPS Stimulation diese Kombination keine weiteren relevanten Effekte zu Tage förderte. Der suppressive Effekt von AT setzte sich in diesem Fall durch. Da aPC im LPS Modell selbst keinen

- Diskussion -

Einfluss auf die Zytokinfreisetzung zeigte, kann diesbezüglich über eine Hemmung von aPC durch AT keine Aussage getroffen werden.

Aus wirtschaftlichen Zwängen heraus musste auf die vollständige Auswertung der Kombinationsansätze unter Stimulation mit OKT3 bedauerlicher Weise verzichtet werden. Eine Zwischenauswertung die sich auf n=3 zufällig ausgewählte Proben beschränkte zeigte jedoch keine relevanten Abweichung zwischen AT20 und aPC100 / AT20 Subgruppen. Aus diesen Messungen ließ sich ableiten, dass auch hier wahrscheinlich der suppressive Effekt von AT überwiegt (Daten nicht gezeigt).

In den Kombinationsansätzen gemessene Änderungen der Zytokinspiegel sind somit auf den Einfluss von AT in supraphysiologischer Konzentration zurückzuführen. Ob dies mit einer direkten Hemmung der aPC Wirkung durch AT gleichbedeutend ist oder einem rein quantitativen Überwiegen des AT Effektes entspricht muss offen bleiben. Sollte sich zukünftig ein Interesse an der kombinierten Verwendung beider Substanzen ergeben, bedarf dieser Umstand der weiteren Klärung.

4.6 Einfluss von Heparin

In der Diskussion der Ergebnisse aus der KyberSept-Studie wurde das Ausbleiben eines verbesserten Überlebens unter AT-Therapie im Wesentlichen auf die teilweise begleitende Gabe von Heparin zurückgeführt. Daher untersuchte eine Reihe von Forschergruppen den vermuteten Einfluss von Heparin auf die antiinflammatorische Potenz von Antithrombin. Die entsprechenden Arbeiten zeigten eine Aufhebung antiinflammatorischer Effekte von Antithrombin durch Heparin (Hoffmann *et al.*, 2002, Wiedermann, 2006). Als Rationale hierfür gilt die strukturelle Verwandtschaft des Syndecan-4-Rezeptors mit Heparin. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von AT an Endothelzellen durch Heparin blockiert und der protektive Effekt bezüglich Leukozyten Rolling und Adhäsion aufgehoben wird (siehe 1.5.3).

Diese Ergebnisse unterstreichen zwar die Bedeutungen dieses Effektes auf die AT-Wirkung am Endothel, lassen jedoch noch keine Rückschlüsse auf die immunmodulatorischen Fähigkeiten der Substanz zu. Unsere eigenen Untersuchungen zeigen nun erstmals, dass Heparin zumindest im serumfreien ex-

- Diskussion -

vivo Modell keinen Einfluss auf die durch Antithrombin supprimierte Zytokinfreisetzung aus LPS-stimulierten mononukleären Zellen besitzt. So gelang es auch für hohe Heparindosen nicht, eine Erhöhung der durch AT supprimierten Spiegel von IL-10 und TNF- α in Richtung Ausgangswert nachzuweisen.

Desweiteren fanden wir in unseren Ansätzen den bekannten, dosisabhängigen, suppressiven Effekt von Heparin auf die Freisetzung von Zytokinen aus LPS stimulierten Monozyten (Anastase-Ravion et al., 2003) bestätigt.

Wir vermuten daher, dass die in-vivo beobachtete, negative Auswirkung einer gleichzeitigen Heparinabgabe auf einer Störung des Einflusses von Antithrombin auf Endothelzellen oder durch Heparin selbst und eher nicht auf einer Störung der Wirkung auf Immunzellen beruht. Diese Erkenntnis wäre somit bei der Interpretation der klinischen Studienergebnisse im Rahmen der KyberSept Studie zu berücksichtigen.

5 Zusammenfassung

Sowohl aktiviertem Protein C (aPC) als auch Antithrombin (AT) werden neben ihrer Bedeutung als physiologische Gerinnungsinhibitoren immunmodulatorische Potenz zugeschrieben. Sie scheinen daher geeignet, die gestörte Immunfunktion wie sie beispielsweise nach Trauma beobachtet wird, günstig zu beeinflussen. Dies könnte der Entstehung von septischen Komplikationen durch eine gestörte Infektabwehr entgegen wirken oder die Organsysteme vor den Folgen überschießender systemischer Entzündungsreaktionen schützen. Während jedoch mittlerweile eine große Anzahl klinischer und experimenteller Arbeiten zur Anwendung dieser Substanzen vorliegt, sind die Wirkungen auf humane Immunzellen nach wie vor nicht abschließend geklärt. Ziel dieser Studie war daher die Charakterisierung möglicher Effekte von aPC und AT auf die zelluläre Immunfunktion unter Berücksichtigung eines sogenannten „Priming“ der Zellen durch vorausgehendes Gewebetrauma (Operation oder schwere Unfallverletzung). Daneben sollte auch die Frage einer möglichen Wechselwirkung von aPC und AT geklärt werden. Außerdem wurde der Einfluss von Heparin auf ein immunmodulatorisches Potential von AT untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden kontrollierten ex-vivo Studie erfolgte der Einschluss von zwölf viszeralchirurgischen sowie neun polytraumatisierten Patienten. Als Vergleichskollektiv dienten zwölf gesunde Probanden. An mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), die mittels Ficoll-Separation an den Tagen 1, 3 und 7 nach Trauma gewonnen wurden, untersuchten wir den Einfluss von physiologischen (aPC 4 µg / ml, AT 1 IE / ml) oder supraphysiologischen (aPC 100 µg / ml, AT 20 IE / ml) Konzentrationen der Gerinnungsinhibitoren. Bei operierten Patienten erfolgte präoperativ eine zusätzliche Abnahme. Gesunde Probanden spendeten einmalig Blut und dienten als Referenzgruppe. PBMC wurden in serumfreiem Medium kultiviert und mit aPC bzw. AT (allein oder zusammen) für 60 Minuten präinkubiert. Der entzündliche Stimulus erfolgte mit LPS bzw. OKT3. Zellkulturen wurden dann mit oder ohne Stimulus für 20 Stunden (LPS) oder 72 (OKT3) Stunden inkubiert. Für die Zugabe ansteigender Heparindosen erfolgte die analoge Herstellung von LPS-stimulierten Ansätzen mit supraphysiologischer AT

- Zusammenfassung -

Konzentration. Die Messung der Zytokinspiegel erfolgte mit dem Bioplex Suspension Array System aus den Zellkulturüberständen.

Bei gesunden Probanden konnten wir unter LPS-Stimulation in Gegenwart von AT (20 IE / ml) signifikante Abfälle sowohl von TNF- α als auch IL-10 beobachten. Im Patientenkollektiv zeigte sich für TNF- α der gleiche Effekt. Für IL-10 zeigte sich ebenfalls der bei gesunden Probanden beobachtete Abfall der LPS-induzierten IL10-Spiegel, hier jedoch ohne statistische Signifikanz. In unstimulierten Proben führte AT (20 IE / ml) zu einer signifikanten Erhöhung der TNF- α Spiegel. Ein Effekt von AT in der Konzentration 1IE / ml konnte nicht gezeigt werden. Für aPC konnte im LPS-Model kein Einfluss auf die Immunantwort von PBMC unter serumfreien Bedingungen nachgewiesen werden.

Nach Aktivierung mit OKT3 kam es durch AT (20 IE / ml) zu einem teils signifikanten Abfall von IFN- γ , und IL-13, wohingegen aPC (100 μ g / ml) zu einem Anstieg beider Zytokine führte. Sowohl AT als auch aPC führten zu signifikant erhöhten IL-6 Spiegeln in OKT3-stimulierten Ansätzen. Allerdings erhöhte nur AT signifikant die Freisetzung von IL-6 und IFN- γ in unstimulierten Ansätzen.

Bei gleichzeitiger Gabe von aPC und AT zeigten sich mit AT 20 IE / ml vergleichbare Spiegel. In Ansätzen die Heparin enthielten zeigte AT (20 IE / ml) eine unveränderte Reduzierung der IL-10 und TNF- α Spiegel.

Unsere Ergebnisse zeigen somit für beide Substanzen eine immunmodulatorische Potenz in supraphysiologischen Konzentrationen. Antithrombin führt ex-vivo mit Ausnahme von IL-6 und im Unterschied zu aPC zu einer breiten Suppression der Zytokinfreisetzung aus stimulierten PBMC. Mit Heparin in Dosierungen bis 200IE konnte dieser Effekt nicht antagonisiert werden. Demgegenüber ist aPC in einem serumfreien ex-vivo Modell ein Aktivator der lymphozytären T_H1-Antwort in humanen PBMC, hat also entgegen häufig postulierter Vorstellungen klare proinflammatorische Effekte, zumindest auf humane Immunzellen.

Die klinische Bedeutung dieser Beobachtungen und die zugrunde liegenden Mechanismen bedürfen der weiteren Klärung.

6 Literaturverzeichnis

- AFSHARI, A., WETTERSLEV, J., BROK, J. & MOLLER, A. M. (2008) Antithrombin III for critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev*, CD005370.
- ALZONA, M., JACK, H. M., FISHER, R. I. & ELLIS, T. M. (1995) IL-12 activates IFN-gamma production through the preferential activation of CD30+ T cells. *J Immunol*, 154, 9-16.
- ANASTASE-RAVION, S., BLONDIN, C., CHOLLEY, B., HAEFFNER-CAVAILLON, N., CASTELLOT, J. J. & LETOURNEUR, D. (2003) Heparin inhibits lipopolysaccharide (LPS) binding to leukocytes and LPS-induced cytokine production. *J Biomed Mater Res A*, 66, 376-84.
- ANGELE, M. K. & FAIST, E. (2002) Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care*, 6, 298-305.
- ASANO, S., OKANO, A., OZAWA, K., NAKAHATA, T., ISHIBASHI, T., KOIKE, K., KIMURA, H., TANIOKA, Y., SHIBUYA, A., HIRANO, T. & ET AL. (1990) In vivo effects of recombinant human interleukin-6 in primates: stimulated production of platelets. *Blood*, 75, 1602-5.
- ASKEW, D., GATEWOOD, J., OLIVAS, E., HAVENITH, K. & WALKER, W. S. (1995) A subset of splenic macrophages process and present native antigen to naive antigen-specific CD4+ T-cells from mice transgenic for an alpha beta T-cell receptor. *Cell Immunol*, 166, 62-70.
- AYALA, A., PERRIN, M. M., MELDRUM, D. R., ERTEL, W. & CHAUDRY, I. H. (1990) Hemorrhage induces an increase in serum TNF which is not associated with elevated levels of endotoxin. *Cytokine*, 2, 170-4.
- BAKER, S. P. & O'NEILL, B. (1976) The injury severity score: an update. *J Trauma*, 16, 882-5.
- BAKER, S. P., O'NEILL, B., HADDON, W., JR. & LONG, W. B. (1974) The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J Trauma*, 14, 187-96.
- BARDENHEUER, M., OBERTACKE, U., WAYDHAS, C. & NAST-KOLB, D. (2000) Epidemiologie des Schwerverletzten. Eine prospektive Erfassung der präklinischen und klinischen Versorgung. AG Polytrauma der DGU. *Unfallchirurg*, 103, 355-63.
- BERNARD, G. R., VINCENT, J. L., LATERRE, P. F., LAROSA, S. P., DHAINAUT, J. F., LOPEZ-RODRIGUEZ, A., STEINGRUB, J. S., GARBER, G. E., HELTERBRAND, J. D., ELY, E. W. & FISHER, C. J., JR. (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, 344, 699-709.
- BIEWENER, A., ASCHENBRENNER, U., RAMMELT, S., GRASS, R. & ZWIPP, H. (2004) Impact of helicopter transport and hospital level on mortality of polytrauma patients. *J Trauma*, 56, 94-8.
- BOMBELI, T., MUELLER, M. & HAEBERLI, A. (1997) Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost*, 77, 408-23.
- BONE, R. C. (1996) Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*, 24, 1125-8.
- BONE, R. C., BALK, R. A., CERRA, F. B., DELLINGER, R. P., FEIN, A. M., KNAUS, W. A., SCHEIN, R. M. & SIBBALD, W. J. (1992) Definitions for sepsis and

- Literaturverzeichnis -

- organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101, 1644-55.
- BOYUM, A. (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 97, 77-89.
- BRUECKMANN, M., HOFFMANN, U., DE ROSSI, L., WEILER, H. M., LIEBE, V., LANG, S., KADEN, J. J., BORGGREFE, M., HAASE, K. K. & HUHLE, G. (2004) Activated protein C inhibits the release of macrophage inflammatory protein-1-alpha from THP-1 cells and from human monocytes. *Cytokine*, 26, 106-13.
- CASTELL, J. V., GOMEZ-LECHON, M. J., DAVID, M., HIRANO, T., KISHIMOTO, T. & HEINRICH, P. C. (1988) Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett*, 232, 347-50.
- CHENG, T., LIU, D., GRIFFIN, J. H., FERNANDEZ, J. A., CASTELLINO, F., ROSEN, E. D., FUKUDOME, K. & ZLOKOVIC, B. V. (2003) Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med*, 9, 338-42.
- CHOUDHRY, M. A., BLAND, K. I. & CHAUDRY, I. H. (2007) Trauma and immune response--effect of gender differences. *Injury*, 38, 1382-91.
- COULIE, P. G., CAYPHAS, S., VINK, A., UYTENHOVE, C. & VAN SNICK, J. (1987) Interleukin-HP1-related hybridoma and plasmacytoma growth factors induced by lipopolysaccharide in vivo. *Eur J Immunol*, 17, 1217-20.
- DAHLBACK, B. & VILLOUTREIX, B. O. (2005) Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 1311-20.
- DAMUS, P. S., HICKS, M. & ROSENBERG, R. D. (1973) Anticoagulant action of heparin. *Nature*, 246, 355-7.
- DECKER, D., SCHONDORF, M., BIDLINGMAIER, F., HIRNER, A. & VON RUECKER, A. A. (1996) Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 T-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell-mediated and up-regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma. *Surgery*, 119, 316-25.
- DERHASCHNIG, U., REITER, R., KNOBL, P., BAUMGARTNER, M., KEEN, P. & JILMA, B. (2003) Recombinant human activated protein C (rhAPC; drotrecogin alfa [activated]) has minimal effect on markers of coagulation, fibrinolysis, and inflammation in acute human endotoxemia. *Blood*, 102, 2093-8.
- DHAINAUT, J. F., LATERRE, P. F., LAROSA, S. P., LEVY, H., GARBER, G. E., HEISELMAN, D., KINASEWITZ, G. T., LIGHT, R. B., MORRIS, P., SCHEIN, R., SOLLET, J. P., BATES, B. M., UTTERBACK, B. G. & MAKI, D. (2003) The clinical evaluation committee in a large multicenter phase 3 trial of drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis (PROWESS): role, methodology, and results. *Crit Care Med*, 31, 2291-301.
- DOLAN, G., NEAL, K., COOPER, P., BROWN, P. & PRESTON, F. E. (1994) Protein C, antithrombin III and plasminogen: effect of age, sex and blood group. *Br J Haematol*, 86, 798-803.

- Literaturverzeichnis -

- DUNZENDORFER, S., KANEIDER, N., RABENSTEINER, A., MEIERHOFER, C., REINISCH, C., ROMISCH, J. & WIEDERMANN, C. J. (2001) Cell-surface heparan sulfate proteoglycan-mediated regulation of human neutrophil migration by the serpin antithrombin III. *Blood*, 97, 1079-85.
- DURHAM, R. M., MORAN, J. J., MAZUSKI, J. E., SHAPIRO, M. J., BAUE, A. E. & FLINT, L. M. (2003) Multiple organ failure in trauma patients. *J Trauma*, 55, 608-16.
- ERTEL, W., FAIST, E., NESTLE, C., SCHUEBEL, I., STORCK, M. & SCHILDBERG, F. W. (1989) Dynamics of immunoglobulin synthesis after major trauma. Influence of recombinant lymphokines. *Arch Surg*, 124, 1437-41; discussion 1441-2.
- ERTEL, W., KEEL, M., BONACCIO, M., STECKHOLZER, U., GALLATI, H., KENNEY, J. S. & TRENTZ, O. (1995) Release of anti-inflammatory mediators after mechanical trauma correlates with severity of injury and clinical outcome. *J Trauma*, 39, 879-85; discussion 885-7.
- FAIST, E., BAUE, A. E., DITTMER, H. & HEBERER, G. (1983) Multiple organ failure in polytrauma patients. *J Trauma*, 23, 775-87.
- FAIST, E. & KIM, C. (1998) Therapeutic immunomodulatory approaches for the control of systemic inflammatory response syndrome and the prevention of sepsis. *New Horiz*, 6, S97-102.
- FAIST, E., MEWES, A., STRASSER, T., WALZ, A., ALKAN, S., BAKER, C., ERTEL, W. & HEBERER, G. (1988) Alteration of monocyte function following major injury. *Arch Surg*, 123, 287-92.
- FAIST, E. & WICHMANN, M. W. (1997) Immunologie bei Schwerverletzten. *Chirurg*, 68, 1066-70.
- FEISTRITZER, C., KANEIDER, N. C., STURN, D. H. & WIEDERMANN, C. J. (2004) Syndecan-4-dependent migration of human eosinophils. *Clin Exp Allergy*, 34, 696-703.
- FEISTRITZER, C. & RIEWALD, M. (2005) Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood*, 105, 3178-84.
- FEISTRITZER, C., STURN, D. H., KANEIDER, N. C., DJANANI, A. & WIEDERMANN, C. J. (2003) Endothelial protein C receptor-dependent inhibition of human eosinophil chemotaxis by protein C. *J Allergy Clin Immunol*, 112, 375-81.
- FINIGAN, J. H., DUDEK, S. M., SINGLETON, P. A., CHIANG, E. T., JACOBSON, J. R., CAMP, S. M., YE, S. Q. & GARCIA, J. G. (2005) Activated protein C mediates novel lung endothelial barrier enhancement: role of sphingosine 1-phosphate receptor transactivation. *J Biol Chem*, 280, 17286-93.
- FIorentino, D. F., BOND, M. W. & MOSMANN, T. R. (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170, 2081-95.
- FRANKE, A., LANTE, W., KOLLIG, E. & MARKEWITZ, A. (2009) A comparison of monocyte counts and ex vivo and in vitro monocyte cytokine production after major surgical trauma. *J Surg Res*, 154, 91-8.
- FRANCINI, N., BACHLI, E. B., BLAU, N., LEIKAUF, M. S., SCHAFFNER, A. & SCHOEDON, G. (2004) Gene expression profiling of inflamed human endothelial cells and influence of activated protein C. *Circulation*, 110, 2903-9.

- Literaturverzeichnis -

- FRY, D. E., PEARLSTEIN, L., FULTON, R. L. & POLK, H. C., JR. (1980) Multiple system organ failure. The role of uncontrolled infection. *Arch Surg*, 115, 136-40.
- GALLIGAN, L., LIVINGSTONE, W., VOLKOV, Y., HOKAMP, K., MURPHY, C., LAWLER, M., FUKUDOME, K. & SMITH, O. (2001) Characterization of protein C receptor expression in monocytes. *Br J Haematol*, 115, 408-14.
- GORIS, R. J., TE BOEKHORST, T. P., NUYTINCK, J. K. & GIMBRERE, J. S. (1985) Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Arch Surg*, 120, 1109-15.
- GREENSPAN, L., MCLELLAN, B. A. & GREIG, H. (1985) Abbreviated Injury Scale and Injury Severity Score: a scoring chart. *J Trauma*, 25, 60-4.
- GREY, S. T., TSUCHIDA, A., HAU, H., ORTHNER, C. L., SALEM, H. H. & HANCOCK, W. W. (1994) Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN-gamma, or phorbol ester. *J Immunol*, 153, 3664-72.
- GRITTI, D., MALINVERNO, A., GASPARETTO, C., WIEDERMANN, C. J. & RICEVUTI, R. (2004) Attenuation of leukocyte beta 2-integrin expression by antithrombin-III. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 17, 27-32.
- GU, J. M., KATSUURA, Y., FERRELL, G. L., GRAMMAS, P. & ESMON, C. T. (2000) Endotoxin and thrombin elevate rodent endothelial cell protein C receptor mRNA levels and increase receptor shedding in vivo. *Blood*, 95, 1687-93.
- HARADA, N., OKAJIMA, K., KUSHIMOTO, S., ISOBE, H. & TANAKA, K. (1999) Antithrombin reduces ischemia/reperfusion injury of rat liver by increasing the hepatic level of prostacyclin. *Blood*, 93, 157-64.
- HARBER, M., SUNDSTEDT, A. & WRAITH, D. (2000) The role of cytokines in immunological tolerance: potential for therapy. *Expert Rev Mol Med*, 2, 1-20.
- HAUPT, W., RIESE, J., MEHLER, C., WEBER, K., ZOWE, M. & HOHENBERGER, W. (1998) Monocyte function before and after surgical trauma. *Dig Surg*, 15, 102-4.
- HENSLER, T., SAUERLAND, S., RIESS, P., HESS, S., HELLING, H. J., ANDERMAHR, J., BOUILLON, B. & NEUGEBAUER, E. A. (2000) The effect of additional brain injury on systemic interleukin (IL)-10 and IL-13 levels in trauma patients. *Inflamm Res*, 49, 524-8.
- HILDEBRAND, F., PAPE, H. C. & KRETTEK, C. (2005) [The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction]. *Unfallchirurg*, 108, 793-4, 796-803.
- HIRANO, T., YASUKAWA, K., HARADA, H., TAGA, T., WATANABE, Y., MATSUDA, T., KASHIWAMURA, S., NAKAJIMA, K., KOYAMA, K., IWAMATSU, A. & ET AL. (1986) Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324, 73-6.
- HOFFMANN, J. N., VOLLMAR, B., INTHORN, D., SCHILDBERG, F. W. & MENDER, M. D. (2000) Antithrombin reduces leukocyte adhesion during chronic endotoxemia by modulation of the cyclooxygenase pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C98-C107.
- HOFFMANN, J. N., VOLLMAR, B., LASCHKE, M. W., INTHORN, D., FERTMANN, J., SCHILDBERG, F. W. & MENDER, M. D. (2004) Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med*, 32, 1011-7.

- Literaturverzeichnis -

- HOFFMANN, J. N., VOLLMAR, B., LASCHKE, M. W., INTHORN, D., KANEIDER, N. C., DUNZENDORFER, S., WIEDERMANN, C. J., ROMISCH, J., SCHILDBERG, F. W. & MENGER, M. D. (2002) Adverse effect of heparin on antithrombin action during endotoxemia: microhemodynamic and cellular mechanisms. *Thromb Haemost*, 88, 242-52.
- HOFFMANN, J. N., WIEDERMANN, C. J., JUERS, M., OSTERMANN, H., KIENAST, J., BRIEGEL, J., STRAUSS, R., WARREN, B. L. & OPAL, S. M. (2006) Benefit/risk profile of high-dose antithrombin in patients with severe sepsis treated with and without concomitant heparin. *Thromb Haemost*, 95, 850-6.
- HOLZKNECHT, B. J. (2003) Direkter ex vivo Nachweis Myelin Basic Protein (MBP)-spezifischer T-Helferzellen bei Multiple Sklerose Patienten. *Institut für Experimentelle Rheumatologie*. Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin.
- HOOPER, W. C., PHILLIPS, D. J., RENSHAW, M. A., EVATT, B. L. & BENSON, J. M. (1998) The up-regulation of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells by activated protein C. *J Immunol*, 161, 2567-73.
- ISAACS, A. & LINDENMANN, J. (1957) The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 147, 258-67.
- ISHIGURO, K., KADOMATSU, K., KOJIMA, T., MURAMATSU, H., IWASE, M., YOSHIKAI, Y., YANADA, M., YAMAMOTO, K., MATSUSHITA, T., NISHIMURA, M., KUSUGAMI, K., SAITO, H. & MURAMATSU, T. (2001) Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *J Biol Chem*, 276, 47483-8.
- JANEWAY, C., TRAVERS, P., WALPORT, M. & SHLOMCHIK, M. J. (2005) *Immunobiology : the immune system in health and disease*, New York, Garland Science.
- JOYCE, D. E., GELBERT, L., CIACCIA, A., DEHOFF, B. & GRINNELL, B. W. (2001) Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 11199-203.
- JOYCE, D. E. & GRINNELL, B. W. (2002) Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med*, 30, S288-93.
- JUSTUS, A. C., ROUSSEV, R., NORCROSS, J. L. & FAULK, W. P. (1995) Antithrombin binding by human umbilical vein endothelial cells: effects of exogenous heparin. *Thromb Res*, 79, 175-86.
- KANEIDER, N. C., REINISCH, C. M., DUNZENDORFER, S., ROMISCH, J. & WIEDERMANN, C. J. (2002) Syndecan-4 mediates antithrombin-induced chemotaxis of human peripheral blood lymphocytes and monocytes. *J Cell Sci*, 115, 227-36.
- KEEL, M., SCHREGENBERGER, N., STECKHOLZER, U., UNGETHUM, U., KENNEY, J., TRENTZ, O. & ERTEL, W. (1996) Endotoxin tolerance after severe injury and its regulatory mechanisms. *J Trauma*, 41, 430-7; discussion 437-8.
- KERSCHEN, E. J., FERNANDEZ, J. A., COOLEY, B. C., YANG, X. V., SOOD, R., MOSNIER, L. O., CASTELLINO, F. J., MACKMAN, N., GRIFFIN, J. H. & WEILER, H. (2007) Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *J Exp Med*, 204, 2439-48.
- KIM, C., SCHINKEL, C., FUCHS, D., STADLER, J., WALZ, A., ZEDLER, S., VON DONNERSMARCK, G. H. & FAIST, E. (1995) Interleukin-13 effectively

- Literaturverzeichnis -

- down-regulates the monocyte inflammatory potential during traumatic stress. *Arch Surg*, 130, 1330-6.
- KOMURA, H., UCHIBA, M., MIZUOCHI, Y., ARAI, M., HARADA, N., KATSUYA, H. & OKAJIMA, K. (2008) Antithrombin inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by monocytes in vitro through inhibition of Egr-1 expression. *J Thromb Haemost*, 6, 499-507.
- KUHNE, C. A., RUCHHOLTZ, S., BUSCHMANN, C., STURM, J., LACKNER, C. K., WENTZENSEN, A., BOUILLON, B., WAYDHAS, C. & WEBER, C. (2006) Polytraumaversorgung in Deutschland. Eine Standortbestimmung. *Unfallchirurg*, 109, 357-66.
- LARRICK, J. W. & WRIGHT, S. C. (1990) Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-alpha. *FASEB J*, 4, 3215-23.
- LASZIK, Z., MITRO, A., TAYLOR, F. B., JR., FERRELL, G. & ESMON, C. T. (1997) Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation*, 96, 3633-40.
- LE GALL, J. R., LEMESHOW, S. & SAULNIER, F. (1993) A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*, 270, 2957-63.
- LENDEMANS, S., KREUZFELDER, E., RANI, M., BAYEEH, E., SCHADE, F. U., FLOHE, S. B., WAYDHAS, C. & FLOHE, S. (2007) Toll-like receptor 2 and 4 expression after severe injury is not involved in the dysregulation of the innate immune system. *J Trauma*, 63, 740-6.
- LEVI, M. & TEN CATE, H. (1999) Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med*, 341, 586-92.
- LYONS, A., GOEBEL, A., MANNICK, J. A. & LEDERER, J. A. (1999) Protective effects of early interleukin 10 antagonism on injury-induced immune dysfunction. *Arch Surg*, 134, 1317-23; discussion 1324.
- MACK, V. E., MCCARTER, M. D., NAAMA, H. A., CALVANO, S. E. & DALY, J. M. (1996) Dominance of T-helper 2-type cytokines after severe injury. *Arch Surg*, 131, 1303-8; discussion 1308-9.
- MENGES, T., ENGEL, J., WELTERS, I., WAGNER, R. M., LITTLE, S., RUWOLDT, R., WOLLBRUECK, M. & HEMPELMANN, G. (1999) Changes in blood lymphocyte populations after multiple trauma: association with posttraumatic complications. *Crit Care Med*, 27, 733-40.
- MINTY, A., CHALON, P., DEROCQ, J. M., DUMONT, X., GUILLEMOT, J. C., KAGHAD, M., LABIT, C., LEPLATOIS, P., LIAUZUN, P., MILOUX, B. & ET AL. (1993) Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, 362, 248-50.
- MIZUTANI, A., OKAJIMA, K., UCHIBA, M. & NOGUCHI, T. (2000) Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Blood*, 95, 3781-7.
- MORGAN, J. G., DOLGANOV, G. M., ROBBINS, S. E., HINTON, L. M. & LOVETT, M. (1992) The selective isolation of novel cDNAs encoded by the regions surrounding the human interleukin 4 and 5 genes. *Nucleic Acids Res*, 20, 5173-9.
- MOSNIER, L. O., ZLOKOVIC, B. V. & GRIFFIN, J. H. (2007) The cytoprotective protein C pathway. *Blood*, 109, 3161-72.
- NEVIERE, R., TOURNOYS, A., MORDON, S., MARECHAL, X., SONG, F. L., JOURDAIN, M. & FOURRIER, F. (2001) Antithrombin reduces mesenteric

- Literaturverzeichnis -

- venular leukocyte interactions and small intestine injury in endotoxemic rats. *Shock*, 15, 220-5.
- NICK, J. A., COLDREN, C. D., GERACI, M. W., POCH, K. R., FOUTY, B. W., O'BRIEN, J., GRUBER, M., ZARINI, S., MURPHY, R. C., KUHN, K., RICHTER, D., KAST, K. R. & ABRAHAM, E. (2004) Recombinant human activated protein C reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis. *Blood*, 104, 3878-85.
- NORTON, L. W. (1985) Does drainage of intraabdominal pus reverse multiple organ failure? *Am J Surg*, 149, 347-50.
- 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, 869-75.
- O'MAHONY, J. B., WOOD, J. J., RODRICK, M. L. & MANNICK, J. A. (1985) Changes in T lymphocyte subsets following injury. Assessment by flow cytometry and relationship to sepsis. *Ann Surg*, 202, 580-6.
- O'SULLIVAN, S. T., LEDERER, J. A., HORGAN, A. F., CHIN, D. H., MANNICK, J. A. & RODRICK, M. L. (1995) Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg*, 222, 482-90; discussion 490-2.
- OELSCHLAGER, C., ROMISCH, J., STAUBITZ, A., STAUSS, H., LEITHAUSER, B., TILLMANN, H. & HOLSCHERMANN, H. (2002) Antithrombin III inhibits nuclear factor kappaB activation in human monocytes and vascular endothelial cells. *Blood*, 99, 4015-20.
- OESTERN, H.-J. (1997) *Unfallchirurgie in Deutschland : Bilanz und Perspektiven*, Berlin [[u.a.], Springer.
- OGANESYAN, V., OGANESYAN, N., TERZIAN, S., QU, D., DAUTER, Z., ESMON, N. L. & ESMON, C. T. (2002) The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid. *J Biol Chem*, 277, 24851-4.
- OKUSAWA, S., GELFAND, J. A., IKEJIMA, T., CONNOLLY, R. J. & DINARELLO, C. A. (1988) Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest*, 81, 1162-72.
- OPAL, S. M. & DEPALO, V. A. (2000) Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117, 1162-72.
- PETERSON, C. B. & BLACKBURN, M. N. (1985) Isolation and characterization of an antithrombin III variant with reduced carbohydrate content and enhanced heparin binding. *J Biol Chem*, 260, 610-5.
- POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M. Y., VAN HUFFEL, C., DU, X., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., GALANOS, C., FREUDENBERG, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., LAYTON, B. & BEUTLER, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282, 2085-8.
- PORIES, S. E., GAMELLI, R. L., MEAD, P. B., GOODWIN, G., HARRIS, F. & VACEK, P. (1991) The epidemiologic features of nosocomial infections in patients with trauma. *Arch Surg*, 126, 97-9.
- PULLETZ, S., LEHMANN, C., VOLK, T., SCHMUTZLER, M., ZIEMER, S., KOX, W. J. & SCHERER, R. U. (2000) Influence of heparin and hirudin on endothelial binding of antithrombin in experimental thrombinemia. *Crit Care Med*, 28, 2881-6.

- Literaturverzeichnis -

- RAFFAEL, A., NEBE, C. T. & VALET, G. (1994) Grundlagen der Durchflußzytometrie. IN SCHMITZ, G. & ROTHE, G. (Eds.) *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik : mit 61 Tabellen*. Stuttgart [u.a.], Schattauer.
- RAPRAEGER, A., JALKANEN, M., ENDO, E., KODA, J. & BERNFIELD, M. (1985) The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J Biol Chem*, 260, 11046-52.
- REGEL, G., GROTZ, M., WELTNER, T., STURM, J. A. & TSCHERNE, H. (1996) Pattern of organ failure following severe trauma. *World J Surg*, 20, 422-9.
- RENSING, H. & BAUER, M. (2001) Multiorganversagen. Mechanismen, klinische Manifestation und Therapiestrategien. *Anaesthesist*, 50, 819-41.
- RIDDLE, P. R. & BERENBAUM, M. C. (1967) Postoperative depression of the lymphocyte response to phytohaemagglutinin. *Lancet*, 1, 746-8.
- RIEWALD, M., PETROVAN, R. J., DONNER, A., MUELLER, B. M. & RUF, W. (2002) Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science*, 296, 1880-2.
- RIVKIND, A. I., SIEGEL, J. H., LITTLETON, M., DE GAETANO, A., MAMANTOV, T., LAGHI, F. & STOKLOSA, J. C. (1991) Neutrophil oxidative burst activation and the pattern of respiratory physiologic abnormalities in the fulminant post-traumatic adult respiratory distress syndrome. *Circ Shock*, 33, 48-62.
- ROEMISCH, J., GRAY, E., HOFFMANN, J. N. & WIEDERMANN, C. J. (2002) Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 13, 657-70.
- ROUMEN, R. M., HENDRIKS, T., VAN DER VEN-JONGEKRIJG, J., NIEUWENHUIJZEN, G. A., SAUERWEIN, R. W., VAN DER MEER, J. W. & GORIS, R. J. (1993) Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann Surg*, 218, 769-76.
- SCHIMPL, A. & WECKER, E. (1972) Replacement of T-cell function by a T-cell product. *Nat New Biol*, 237, 15-7.
- SCHMIDT-SUPPRIAN, M., MURPHY, C., WHILE, B., LAWLER, M., KAPURNIOTU, A., VOELTER, W., SMITH, O. & BERNHAGEN, J. (2000) Activated protein C inhibits tumor necrosis factor and macrophage migration inhibitory factor production in monocytes. *Eur Cytokine Netw*, 11, 407-13.
- SHALABY, M. R., WAAGE, A., AARDEN, L. & ESPEVIK, T. (1989) Endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo. *Clin Immunol Immunopathol*, 53, 488-98.
- SHAPIRO, H. M. (1995) *Practical flow cytometry*, New York, Wiley-Liss.
- SOUTER, P. J., THOMAS, S., HUBBARD, A. R., POOLE, S., ROMISCH, J. & GRAY, E. (2001) Antithrombin inhibits lipopolysaccharide-induced tissue factor and interleukin-6 production by mononuclear cells, human umbilical vein endothelial cells, and whole blood. *Crit Care Med*, 29, 134-9.
- SPIEL, A. O., FIRBAS, C., MAYR, F. B., LEITNER, J. M., SCHMIDT, B., KNOBL, P., VARADI, K. & JILMA, B. (2005) The effects of supra-normal protein C levels on markers of coagulation, fibrinolysis and inflammation in a human model of endotoxemia. *Thromb Haemost*, 94, 1148-55.

- Literaturverzeichnis -

- STEPHENSON, D. A., TOLTL, L. J., BEAUDIN, S. & LIAW, P. C. (2006) Modulation of monocyte function by activated protein C, a natural anticoagulant. *J Immunol*, 177, 2115-22.
- STURN, D. H., KANEIDER, N. C., FEISTRITZER, C., DJANANI, A., FUKUDOME, K. & WIEDERMANN, C. J. (2003) Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils. *Blood*, 102, 1499-505.
- TAOKA, Y., OKAJIMA, K. & UCHIBA, M. (2004) Antithrombin reduces compression-induced spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*, 21, 1818-30.
- TAYLOR, F. B., JR., CHANG, A. C., PEER, G. T., MATHER, T., BLICK, K., CATLETT, R., LOCKHART, M. S. & ESMON, C. T. (1991) DEGR-factor Xa blocks disseminated intravascular coagulation initiated by *Escherichia coli* without preventing shock or organ damage. *Blood*, 78, 364-8.
- TAYLOR, F. B., JR., PEER, G. T., LOCKHART, M. S., FERRELL, G. & ESMON, C. T. (2001) Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood*, 97, 1685-8.
- TERANISHI, T., HIRANO, T., ARIMA, N. & ONOUE, K. (1982) Human helper T cell factor(s) (ThF). II. Induction of IgG production in B lymphoblastoid cell lines and identification of T cell-replacing factor- (TRF) like factor(s). *J Immunol*, 128, 1903-8.
- TRACEY, K. J. & CERAMI, A. (1993) Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med*, 21, S415-22.
- TRENTZ, O., OESTERN, H. J., HEMPELMANN, G., KOLBOW, H., STURM, J., TRENTZ, O. A. & TSCHERNE, H. (1978) Kriterien für die Operabilität von Polytraumatisierten. *Unfallheilkunde*, 81, 451-8.
- TRUNKEY, D. D. (1983) Trauma. Accidental and intentional injuries account for more years of life lost in the U.S. than cancer and heart disease. Among the prescribed remedies are improved preventive efforts, speedier surgery and further research. *Sci Am*, 249, 28-35.
- UCHIBA, M., OKAJIMA, K., KAUN, C., WOJTA, J. & BINDER, B. R. (2004) Inhibition of the endothelial cell activation by antithrombin in vitro. *Thromb Haemost*, 92, 1420-7.
- UCHIBA, M., OKAJIMA, K., MURAKAMI, K., OKABE, H. & TAKATSUKI, K. (1996) Attenuation of endotoxin-induced pulmonary vascular injury by antithrombin III. *Am J Physiol*, 270, L921-30.
- VAN DER POLL, T. (2001) Immunotherapy of sepsis. *Lancet Infect Dis*, 1, 165-74.
- WARREN, B. L., EID, A., SINGER, P., PILLAY, S. S., CARL, P., NOVAK, I., CHALUPA, P., ATHERSTONE, A., PENZES, I., KUBLER, A., KNAUB, S., KEINECKE, H. O., HEINRICHS, H., SCHINDEL, F., JUERS, M., BONE, R. C. & OPAL, S. M. (2001) Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA*, 286, 1869-78.
- WAYDHAS, C., NAST-KOLB, D., GIPPNER-STEPPERT, C., TRUPKA, A., PFUNDSTEIN, C., SCHWEIBERER, L. & JOCHUM, M. (1998) High-dose antithrombin III treatment of severely injured patients: results of a prospective study. *J Trauma*, 45, 931-40.
- WEISSENBAACH, J., CHERNAJOVSKY, Y., ZEEVI, M., SHULMAN, L., SOREQ, H., NIR, U., WALLACH, D., PERRICAUDET, M., TIOLLAIS, P. & REVEL, M. (1980) Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and *Escherichia coli* cloning studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 7152-6.

- Literaturverzeichnis -

- WHITE, B., SCHMIDT, M., MURPHY, C., LIVINGSTONE, W., O'TOOLE, D., LAWLER, M., O'NEILL, L., KELLEHER, D., SCHWARZ, H. P. & SMITH, O. P. (2000) Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol*, 110, 130-4.
- WIEDERMANN, C. J. (2006) Clinical review: molecular mechanisms underlying the role of antithrombin in sepsis. *Crit Care*, 10, 209.
- WIEDERMANN, C. J., HOFFMANN, J. N., JUERS, M., OSTERMANN, H., KIENAST, J., BRIEGEL, J., STRAUSS, R., KEINECKE, H. O., WARREN, B. L. & OPAL, S. M. (2006) High-dose antithrombin III in the treatment of severe sepsis in patients with a high risk of death: efficacy and safety. *Crit Care Med*, 34, 285-92.
- YAMAJI, K., WANG, Y., LIU, Y., ABEYAMA, K., HASHIGUCHI, T., UCHIMURA, T., KRISHNA BISWAS, K., IWAMOTO, H. & MARUYAMA, I. (2005) Activated protein C, a natural anticoagulant protein, has antioxidant properties and inhibits lipid peroxidation and advanced glycation end products formation. *Thromb Res*, 115, 319-25.
- YAN, S. B. & DHAINAUT, J. F. (2001) Activated protein C versus protein C in severe sepsis. *Crit Care Med*, 29, S69-74.
- YAO, Y. M., REDL, H., BAHRAMI, S. & SCHLAG, G. (1998) The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm Res*, 47, 201-10.
- YATES, D. W. (1990) ABC of major trauma. Scoring systems for trauma. *BMJ*, 301, 1090-4.
- YUDA, H., ADACHI, Y., TAGUCHI, O., GABAZZA, E. C., HATAJI, O., FUJIMOTO, H., TAMAKI, S., NISHIKUBO, K., FUKUDOME, K., D'ALESSANDRO-GABAZZA, C. N., MARUYAMA, J., IZUMIZAKI, M., IWASE, M., HOMMA, I., INOUE, R., KAMADA, H., HAYASHI, T., KASPER, M., LAMBRECHT, B. N., BARNES, P. J. & SUZUKI, K. (2004) Activated protein C inhibits bronchial hyperresponsiveness and Th2 cytokine expression in mice. *Blood*, 103, 2196-204.
- YUKSEL, M., OKAJIMA, K., UCHIBA, M., HORIUCHI, S. & OKABE, H. (2002) Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by inhibiting activation of both nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in human monocytes. *Thromb Haemost*, 88, 267-73.
- ZEDLER, S. (2003) Phänotypische und funktionelle Charakterisierung lymphozytärer Subpopulationen nach ausgedehnter Verbrennungsverletzung. *Chirurgische Klinik und Poliklinik*. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- ZELLWEGER, R., AYALA, A., DEMASO, C. M. & CHAUDRY, I. H. (1995) Trauma-hemorrhage causes prolonged depression in cellular immunity. *Shock*, 4, 149-53.
- ZUO, X. J., NICOLAIDOU, E., OKADA, Y., TOYODA, M. & JORDAN, S. C. (2001) Antithrombin III inhibits lymphocyte proliferation, immunoglobulin production and mRNA expression of lymphocyte growth factors (IL-2, gamma-IFN and IL-4) in vitro. *Transpl Immunol*, 9, 1-6.
- ZURAWSKI, G. & DE VRIES, J. E. (1994) Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today*, 15, 19-26.

7 Abkürzungen

AIS	Abbreviated Injury Scale
aPC	aktiviertes Protein C
AT	Antithrombin
C	Celsius
CARS	Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome
CD	Cluster of Differentiation
D	Tag nach (vor) Trauma
DGU	Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
dl	Deziliter
EPCR	Endothelialer Protein C Rezeptor
Fa.	Firma
GAG	Glykosaminoglykan
H	Heparin
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung
HSPG	Heparan Sulfat Proteoglykane
ICU	Intensivstation
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ISS	Injury Severity Score
KO	Gesunde Probanden
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
µg	Mikrogramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MOV	Multiorganversagen

- Abkürzungen -

MW	Mittelwert
N/A	Nicht Verfügbar
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killer(-Zellen)
OKT3	monoklonaler Anti-CD3-Antikörper
OP	Chirurgische Patienten
PAR-1	Protease-aktivierter Rezeptor-1
PBMC	Mononukleäre Zellen des Peripheren Blutes
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet derived growth factor
pg	Pikogramm
PT	Polytraumatisierte Patienten
SAPS II	Simplified Acute Physiology Score II
SF	Standardfehler
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TCR	T-Zellrezeptor
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U / min	Umdrehungen pro Minute
ZS	Zellsuspension

8 Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name: Manuel Burggraf
Geburtstag: 25. April 1979
Geburtsort: Forchheim
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Dieter Burggraf, Regierungsangestellter
Hannelore Burggraf geb. Weiß, Sekretärin

Ausbildung

9/1985 – 7/1989 Anna-Grundschule, Forchheim
9/1989 – 6/1998 Ehrenbürg-Gymnasium, Forchheim
8/1998 – 8/1999 Zivildienst (Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen)

Studium

4/2001 – 2/2006 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (10 Semester)

2/2006 – 1/2007 Praktisches Jahr

1. Tertial Orthopädie (Orthopädische Klinik und Poliklinik – Großhadern der LMU München)

2. Tertial Unfallchirurgie (Joan and Sanford I. Weill Medical College of Cornell University, New York, NY; USA)
Unfallchirurgie, Intensivmedizin (Chirurgische Klinik und Poliklinik – Großhadern der LMU München)

3. Tertial Kardiologie (Klinik und Poliklinik für Kardiologie, Schweizer Herz- und Gefäßzentrum – Universitätsklinik Inselspital Bern; Schweiz)

11/2007 Ärztliche Prüfung und Approbation als Arzt (Gesamtnote: sehr gut)

Seit 10/2004 Doktorand der Arbeitsgruppe „Immunmodulation nach Trauma“ im Bereich Experimentelle Forschung Chirurgie – Großhadern bei Prof. Dr. med. Eugen Faist

- Curriculum Vitae -

Berufliche Tätigkeit

Seit 6/2008 Assistenzarzt der Klinik für Unfallchirurgie des
Universitätsklinikums Essen
Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Nast-Kolb

Veröffentlichungen

Vorträge

Trentzsch H., Burggraf M., Zedler S., Hoffmann J., Faist E.
Aktiviertes Protein C und Antithrombin III als Modulatoren der LPS-induzierten
Zytokinfreisetzung aus humanen PBMC's von gesunden Probanden und von Patienten nach
chirurgischem Trauma
Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 24.-27. Oktober 2007, Berlin.

Trentzsch H., Lefering R., Kraft R., Burggraf M., Zedler S., Piltz S., Traumaregister der DGU.
Geschlechtsspezifische Unterschiede bieten weiblichen Patienten nach schwerer
Mehrfachverletzung keinen Überlebensvorteil – eine Matched Pair Analyse
Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 21.-24. Oktober 2009, Berlin.

Lichte P., Burggraf M., Nast-Kolb D., Taeger G.
Fractures of the Clavicle: Operative Treatment as New Standard?
11th European Congress of Trauma & Emergency Surgery, 15.-18. Mai 2010, Brüssel,
Belgien.

Burggraf M., Hußmann B., Täger G., Nast-Kolb D., Lendemans S.
Einzelfaktoren der Gerinnung früh nach Polytrauma – welche Faktoren werden verbraucht?
Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 26.-29. Oktober 2010, Berlin.

Burggraf M., Hussmann B., Lendemans S.
Changes of coagulation factor patterns in the early course after multiple injury
12th European Congress of Trauma & Emergency Surgery, 27.-30. April 2011, Mailand,
Italien.

Poster

Burggraf M., Trentzsch H., Zedler S., Hoffmann J.N., Faist E.
Einfluss von aktiviertem Protein C und Antithrombin III auf die LPS-induzierte
Zytokinfreisetzung aus PBMC's gesunder Probanden und Patienten nach chirurgischem
Eingriff.
8. Deutscher Interdisziplinärer Kongress für Intensivmedizin und Notfallmedizin (DIVI), 8.-11.
November 2006, Hamburg.

Trentzsch H., Burggraf M., Zedler S., Hoffmann J., Faist E.
The role of activated protein C and antithrombin III as modulators of the LPS-induced
inflammatory response in PBMCs of healthy volunteers and patients undergoing major
surgery.
7th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis (TSIS), 13.-17. März 2007,
München.

Trentzsch H., Lefering R., Kraft R., Burggraf M., Zedler S., Faist E., Piltz S., the trauma
registry of German Society for Traumasurgery (DGU).

- Curriculum Vitae -

Sex as prognostic marker after severe multiple trauma
6th Congress of the International Federation of Shock Societies & 31st Annual Conference on Shock (US Shock Society), 28. Juni-2. Juli 2008, Köln.

Burggraf M., Trentzsch H., Zedler S., Hoffmann J., Faist E.
Antithrombin (AT) and Activated Protein C (APC): Immunomodulation after trauma?
6th Congress of the International Federation of Shock Societies & 31st Annual Conference on Shock (US Shock Society), 28. Juni-2. Juli 2008, Köln.

Zeitschriftenbeiträge

Burggraf M., Lendemans S.
Einzelfaktoren der Gerinnung früh nach Polytrauma - Welche Faktoren werden verbraucht?
MedReport. 2010 Okt; 34. Jahrgang (38):8.

Burggraf M., Lendemans S.
Einzelfaktoren der Gerinnung früh nach Polytrauma - Welche Faktoren werden verbraucht?
MedReport. 2010 Nov; 34. Jahrgang (47):9.

Abstracts

Burggraf M., Trentzsch H., Zedler S., Hoffmann J.N., Faist E.
Einfluss von aktiviertem Protein C und Antithrombin III auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung aus PBMC's gesunder Probanden und Patienten nach chirurgischem Eingriff.
Intensivmed. 2006 Oct; 43 Suppl 1:151-2.

Trentzsch H., Burggraf M., Zedler S., Hoffmann J., Faist E.
The role of activated protein C and antithrombin III as modulators of the LPS-induced inflammatory response in PBMCs of healthy volunteers and patients undergoing major surgery.
Inflamm Res. 2007 Mar; 56 Suppl 2:S175-6.

Trentzsch H., Lefering R., Kraft R., Burggraf M., Zedler S., Faist E., Piltz S., the trauma registry of German Society for Traumasurgery (DGU).
Sex as prognostic marker after severe multiple trauma
Shock. 2008 Jun; 29 Suppl 1:25.

Burggraf M., Trentzsch H., Zedler S., Hoffmann J., Faist E.
Antithrombin (AT) and Activated Protein C (APC): Immunomodulation after trauma?
Shock. 2008 Jun; 29 Suppl 1:83.

Lichte P., Burggraf M., Nast-Kolb D., Taeger G.
Fractures of the Clavicle: Operative Treatment as New Standard?
Eur J Trauma Emerg Surg. 2010 Jul; 36 Suppl 1:3.

Burggraf M., Hussmann B., Lendemans S.
Changes of coagulation factor patterns in the early course after multiple injury
Eur J Trauma Emerg Surg. 2011 Jun; 37 Suppl 1.

Preise

2. Preis in der Kategorie „Best Oral Presentation“ für den Vortrag „Changes of coagulation factor patterns in the early course after multiple injury“; 12th European Congress of Trauma & Emergency Surgery, 27.-30. April 2011, Mailand, Italien.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

Zu aller erst möchte ich mich bei meinem Doktorvater **Prof. Dr. med. Eugen Faist** für das Überlassen des Themas bedanken. Ihm verdanke ich das Wecken des wissenschaftlichen Interesses und die Heranführung an die Methoden der Forschung.

Bei meinem Betreuer **Dr. med. Heiko Trentzsch** möchte ich mich für die unermüdliche Hilfe bei der Rekrutierung der Patienten, den stets fruchtbaren Gedankenaustausch und die vielen Anregungen bedanken.

Der gleiche Dank gebührt meinem zweiten Betreuer **Dr. rer. biol. hum. Siegfried Zedler**. Mit viel Geduld begleitete er den experimentellen Teil dieser Arbeit und hatte bei allen Problemen stets ein offenes Ohr.

Meiner Freundin **Julia** bin ich für ihren steten und immer positiven Zuspruch, aber auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit, mehr als dankbar.

Ganz besonders möchte ich mich bei **meinen Eltern** für ihre bedingungslose Unterstützung bedanken. Sie erst ermöglichten mir das Studium der Medizin und somit nicht zuletzt das Entstehen dieser Arbeit.

10 Addendum

Nach Fertigstellung der vorliegenden Arbeit erfolgte mit Datum vom 26.10.2011 die Marktrücknahme von Xigris® (Wirkstoff: Drotrecogin alfa [aktiviert]) durch die Eli Lilly Company.

Als Grund dafür bezieht sich der Hersteller auf neueste, bisher unpublizierte Daten der PROWESS-SHOCK-Studie, wonach eine schlechtere Wirksamkeit der Substanz im Rahmen des septischen Schocks und somit ein möglicherweise ungünstiges Nutzen-Risiko-Profil bestehen soll.

Bei PROWESS-SHOCK handelt es sich um eine Folgestudie zu der in vorliegender Promotionsarbeit zitierten PROWESS-Studie und war eine Auflage der europäischen Zulassungsbehörden bei der Markteinführung von Xigris®. Da die Ergebnisse jedoch zumindest derzeit noch nicht publiziert sind, ist eine eingehende Diskussion zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich.

Quelle: Rote-Hand-Brief zu Xigris® (Drotrecogin alfa), Lilly Deutschland GmbH vom 26.10.2011