

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Großhadern

der Ludwig-Maximilians-Universität München

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

Einfluss von Testosteron auf
pathophysiologische Veränderungen der Immunantwort
nach Trauma und Blutverlust im Mausmodell

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

vorgelegt von

Stefan Mayr

aus

Augsburg

Jahr

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. M.K. Angele

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Beuschlein

Prof. Dr. K. Hallfeldt

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10 2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Pathophysiologie des traumatisch-hämorrhagischen Schocks.....	5
1.2 Geschlechtsspezifische Immunantwort nach Trauma, Blutverlust, Schock und Sepsis; klinische und experimentelle Studien.....	8
1.3 Fragestellung.....	10
2 Hypothesen und Zielsetzungen der Studie.....	11
3 Material und Methoden.....	12
3.1 Verwendete Tiere, Gesetzliche Bestimmungen und Tierhaltung	12
3.2 Gruppeneinteilungen.....	12
3.3 Kastration und Scheinkastration	13
3.4 Traumatisch-hämorrhagisches Schockmodell und Kontrolloperation.....	13
3.5 Granulozyten-Myeloperoxidasebestimmung in Lungen- und Lebergewebe.....	15
3.6 Naphthol AS-D Chloracetat-Esterase-Färbung im histologischen Schnitt.....	17
3.7 Gewinnung von Makrophagen <i>in vitro</i> Kulturverfahren	19
3.8 Verfahren der Durchflußzytometrie zur MHC Klasse II und CD11b Bestimmung	22
3.8.1 Grundzüge des Messverfahrens	22
3.8.2 Detektion der MHC Klasse II und der CD11b Expression auf Peritoneal- und Milzmakrophagen.....	24
4 Ergebnisse.....	26
4.1 Granulozyten-Myeloperoxidaseaktivität im Lungen- und Lebergewebe	26
4.2 Granulozyteninfiltration der Lunge und Leber im histologischen Schnitt	28
4.3 CD11b Expression auf Peritoneal- und Milzmakrophagen	30
4.4 MHC II Expression auf Peritoneal- und Milzmakrophagen.....	32
5 Diskussion.....	36
5.1 Problemstellung	36
5.2 Relevanzen des verwendeten Tiermodells und der bestimmten Parameter.....	38
5.3 Einfluss von Testosteron auf die Neutrophileninfiltration	40
5.4 Einfluss von Testosteron auf die MHC Klasse II Expression	41

5.5	Mögliche Mechanismen der Wirkungen von männlichen Sexualhormonen auf die MHC Klasse II Expression	45
5.6	Mögliche Mechanismen der Wirkungen von männlichen Sexualhormonen auf die Neutrophileninfiltration	49
5.7	Klinische Relevanz	51
6	Zusammenfassung	53
7	Literaturverzeichnis	55
8	Danksagung	74
9	Tabellarischer Lebenslauf.....	75

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ASDCL	Naphthol AS-D Chloracetat (Granulozyten) Esterase
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cm	Zentimeter
°C	Grad Celsius
DHT	5 α -Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
etc.	<i>et cetera</i>
FACS	<i>fluorescent activated cell sorter</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FL-1,-2	Fluoreszenz 1, 2
FSC	<i>Forward-Scatter</i>
g	Gramm
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
<i>i.e.</i>	<i>it est</i>
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-1,-2,-6,-10	Interleukin-1,-2,-6,-10
kg	Kilogramm
L-	Laevus-Form (Fischer Projektion)
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
μ l	Mikroliter
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>

min.	Minute
ml	Milliliter
mM	mini Molar
mmHg	Millimeterquecksilber
MPO	Myeloperoxidase
MODS	<i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i>
MOF	<i>Multiple Organ Failure</i>
MTT	3-4,5-Dimethylthiazol-2-L-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid Lösung
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
OD	<i>optical density</i>
PAF	<i>platelet-activating factor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PM ϕ	Peritonealmakrophagen
PMN	<i>polymorphonuclear (cells)</i>
R-Pe	Phycoerythrin
rpm	<i>rounds per minute</i>
sek.	Sekunden
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SM ϕ	Milzmakrophagen
SSC	<i>Side-Scatter</i>
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
Th1,2	T1,2-Helfer (Zellen)
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor-Nekrosis-Faktor-alpha
U	Unit
VCAM	<i>vascular adhesion molecule</i>
vgl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Pathophysiologie des traumatisch-hämorrhagischen Schocks

Der traumatisch-hämorrhagische Schock, als sich erschwerend addierende Kombination aus Gewebetrauma und Blutverlust³¹, führt zu deletären inflammatorischen Reaktionen und einer Endothelleckage des Organismus, die das Überleben pathogenetisch maßgeblich bestimmen^{31,104}.

Eine zunächst lokale, nicht bakterielle Entzündung, als Antwort auf eine externe Noxe, entsteht am Ort des Geschehens im reaktionsfähigen Zellsystem²⁴, die sich in Permeabilitäts- und Zirkulationsstörungen entfernter Organe manifestieren kann¹⁴¹(Fig. 1).

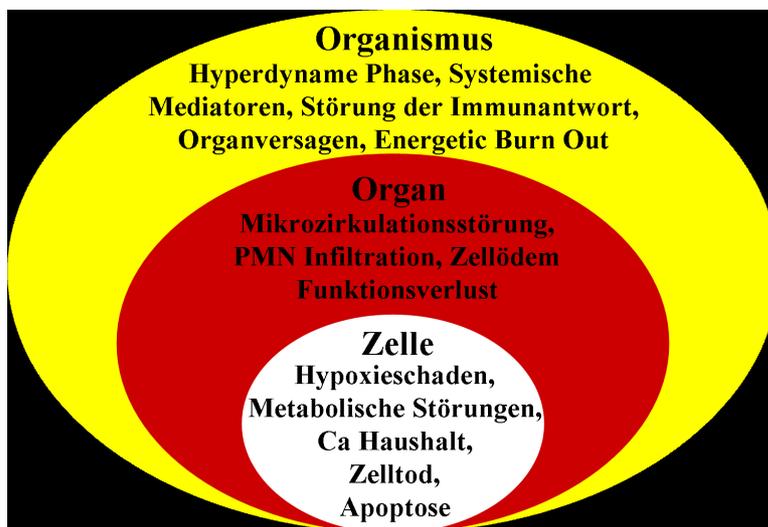


Fig. 1 Pathophysiologie des Schocks

Dabei ist ein generalisiertes Gesamtgeschehen nach traumatisch-hämorrhagischen Schock abhängig von der lokalen Zerstörung und der systemischen Minderperfusion³¹. Der traumatisch-hämorrhagische Schock, wie jede andere Form des Schocks, ist durch ein zelluläres Sauerstoffmismatch³¹, und/oder der Unfähigkeit von Zellen ihren Stoffwechsel in ausreichendem Maße zu metabolisieren, definiert¹⁰⁴. Die inflammatorische Reaktion nach traumatisch-hämorrhagischem Schock wird durch proinflammatorische Zytokine initiiert, die im Zuge des lokalen Reparaturmechanismus freigesetzt werden¹³⁴. Diese Zytokine werden mittels systemischer Einschwemmung als Initiator der Dekompensation durch das generalisierte Entzündungssyndrom gesehen¹³⁴.

Die proinflammatorische Zytokinantwort unterdrückt die zelluläre Immunantwort nach Trauma und Blutverlust^{1,13,158,159}, welche mit einer erhöhten Inzidenz für septische Komplikationen^{22,42,45,52,53} und Sepsis^{13,42,45,158} assoziiert ist. Eine Dekompensation mit Ausbrennen der Defensivsysteme durch anhaltende neuroendokrine und inflammatorische Reize, sowie Destruktion der Zell- und Membranintegrität in Form eines Barriereverlusts³¹, führt über die Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren zum Start der Leukozyten-Endothelinteraktion¹⁰⁷. Vasoaktive Mediatoren erleichtern sukzessive die Invasion von Granulozyten³¹. Eine Neutrophileninfiltration als initialer pathophysiologischer Mechanismus ist die Folge. Über diese Adhäsion und Transmigration aktivierter Granulozyten in das Gewebe, die primär der Ausgrenzung zerstörten Gewebes und dem Abbau desselbigen dienen³¹, können sich, wenn sie die physiologische Schutz- und Reparationsfunktion übersteigen, ursächlich Membran- und Gewebeschäden verstärken¹⁰⁷ und damit die Entzündungsreaktion vorantreiben, sowie ein Organversagen bedingen¹⁰⁷. Somit stellen neutrophile Granulozyten eine der Schlüsselimmunzellen bei der Organschädigung im Schockgeschehen dar^{34,84,91,113,132,146}. Die Neutrophileninfiltration führt ihrerseits selbst über proinflammatorische Zytokinsekretionen zu inflammatorischen Reaktionen im Sinne eines *circulus vitiosus*¹⁸¹.

Damit ist Neutrophileninfiltration Grundlage für die Dysfunktionen Antigenpräsentierender Zellen, z.B. Makrophagen oder Dendritische Zellen, nach traumatisch-hämorrhagischem Schock. Die Antigenpräsentierende Zelle nimmt eine zentrale Rolle in der Induktion und Aufrechterhaltung einer adäquaten Immunantwort durch die Präsentation von Fremdan antigenen ein¹⁶⁷ (Fig. 2). Hierfür ist die Expression der Haupthistokompatibilitätsmoleküle (*Major histocompatibility complex*: MHC, synonym: *human leucocyte antigen*: HLA) Klasse II zur Präsentation des Antigens erforderlich^{115,164}. Sie findet ihren Ursprung darin, dass Makrophagen und Dendritische Zellen die außergewöhnliche Fähigkeit besitzen, Antigene zu prozessieren und *via* MHC Klasse II (Ia) T-Zellen zu präsentieren^{115,164}. Dabei erkennen T-Helferzellen indessen Fremd-Antigene nur, wenn sie im Zusammenhang mit (eigen) MHC Klasse II Oberflächenmolekülen präsentiert werden^{39,49,68,152}. Dies ist grundlegend für die Aktivierung und Initiierung des humoralen und zellvermittelten, *i.e.* spezifischen und unspezifischen, Immunsystems^{17,152}. Gegen die MHC Klasse II Oberflächenstrukturen gerichtete Antikörper führen zu unterdrückter Antigenpräsentation an T-Zellen durch Antigenpräsentierende Zellen^{69,151}, und ein Mangel der MHC Klasse II (Ia) Expression führt zu schwerer Immundefizienz¹⁰³.

Quantitative Variationen in der Ia Antigenexpression nehmen somit eine Hauptrolle in der Regulation der Immunantwort wahr ^{86,164}.

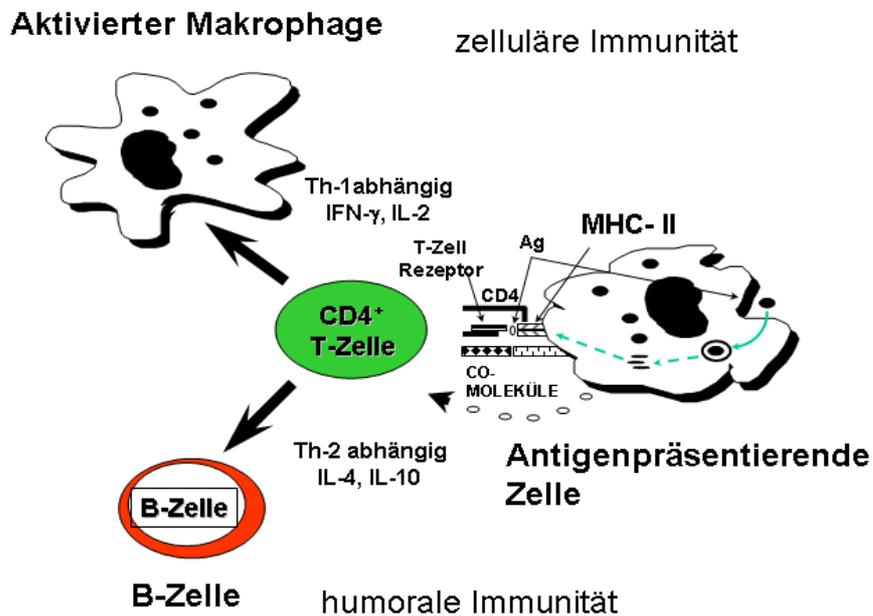


Fig. 2 MHC Klasse II (Ia) nimmt eine Schlüsselstelle im Initiieren und Aufrechterhalten der zellulären und humoralen Immunantwort ein.

Nach Trauma und Blutverlust zeigen sich Makrophagendysfunktionen (Peritoneal-, Milzmakrophagen, Kupffer-Zellen), in Form von supprimierter MHC Klasse II (Ia) Expression und der verminderten Fähigkeit zur Antigenpräsentation, sowohl in klinischen, als auch in tierexperimentellen Studien ^{17,19,42,45,47,59,61,100,133,138,158}. So kann z.B. bei Mäusen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock eine unterdrückte MHC Klasse II (Ia) Expression und Antigenpräsentation von Peritoneal-, Milzmakrophagen und Kupffer-Zellen gezeigt werden ^{18,21,33,44,60,158}. Ayala *et al.* zeigt dabei auf, dass die unterdrückte Antigenpräsentationsfähigkeit von Peritoneal- und Milzmakrophagen mit einer Suppression der MHC Klasse II (Ia) Expression nach Trauma und Blutverlust korreliert ¹⁸. Die Studien von Wakefield *et al.* stellen heraus, dass der Prozentsatz HLA-DR positiver Monozyten nach elektiver großer Resektionschirurgie signifikant unterdrückt ist und bei Patienten ohne Sepsis signifikant höher liegt, als bei diesen mit Sepsis ¹⁷¹. Pachot *et al.* kann dies bei septischen Schockpatienten bestätigen ¹²⁸.

Es sollen in dieser Arbeit zwei Pathomechanismen subsumiert und untersucht werden, die zu deletären Folgen für den Organismus führen: eine gesteigerte Neutrophileninfiltration, gekoppelt mit einer Makrophagen-Suppression.

1.2 Geschlechtsspezifische Immunantwort nach Trauma, Blutverlust, Schock und Sepsis; klinische und experimentelle Studien

Es deuten zahlreiche klinische und experimentelle Studien darauf hin, dass Sexualhormone bedeutend an der Immunantwort unter physiologischen, als auch pathophysiologischen Gegebenheiten beteiligt sind^{5,51,78,160,175,178}.

Nach Trauma und schwerem Blutverlust werden in vergangenen Studien Geschlechtsunterschiede in der humoralen, als auch der zellulären Immunantwort^{29,38,108,127}, der Anfälligkeit und Sterblichkeit für und von Sepsis^{29,38,108,185} und dem Auftreten von MOF (*Multiple Organ Failure*)¹²⁴ festgestellt.

Die divergenten Effekte männlicher und weiblicher Sexualhormone werden dadurch augenscheinlich, dass das männliche Patientenkollektiv nach Trauma und schwerem Blutverlust anfälliger für bakterielle Komplikationen in Form von Infektionen¹⁰⁸, Sepsis und MOF¹²⁴ ist und in Folge dessen, eine erhöhte Mortalität besitzt^{29,148}. Offner *et al.* zeigt, dass das männliche Geschlecht sogar ein unabhängiger Risikofaktor für schwere Infektionen bei chirurgischen Patienten ist¹²⁵. Frauen hingegen besitzen eine niedrigere Inzidenz für Komplikationen wie Pneumonie, Sepsis oder Multiorganversagen nach Trauma^{72,118,124,125}.

Zusätzlich zu den klinischen Studien finden sich auch in einer Reihe von tierexperimentellen Studien eine geschlechtsspezifische Immunantwort nach Trauma, Blutverlust und Sepsis^{3,7,9,177,185}. So zeigt sich, dass das männliche Geschlecht mit einer unterdrückten zellulären Immunantwort auf Trauma und Blutverlust reagiert^{5,6,177,185}. Dies ist beim männlichen Geschlecht mit einer erhöhten Inzidenz septischer Komplikationen nach Trauma und Blutverlust assoziiert^{29,56,58,108}. Die zelluläre Immunantwort bei weiblichen Mäusen nach Trauma und Blutverlust ist hingegen nicht, in derartiger Form, signifikant supprimiert^{5,6,177,185}, und es ist eine erhöhte Überlebensrate, im Vergleich zu männlichen Mäusen, für weibliche Mäuse nach Induktion einer folgenden Sepsis nachweislich^{56,185}.

Dabei wird aufgezeigt, dass männliche Sexualhormone entscheidend für die geschlechtsspezifische Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock sind^{5,6}. Genauer gesagt deuten die Studien von Angele *et al.* darauf hin, dass männliche Sexualhormone für die Immunsuppression bei Männern verantwortlich sind^{5,6}. Die chirurgische Reduktion männlicher Sexualhormone durch Kastration zwei Wochen vor traumatisch-hämorrhagischem Schock führt bei männlichen Mäusen zu einer

wiederhergestellten Makrophagenfunktion in Form von verbesserter Zytokinfreisetzung bei Peritoneal-(PM ϕ) und Milzmakrophagen (SM ϕ)^{10,11}. Eine Verabreichung physiologischer Mengen des männlichen Sexualhormons 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) an kastrierte, männliche Mäuse, resultiert in einer unterdrückten proinflammatorischen Zytokinfreisetzung durch PM ϕ und SM ϕ (IL-1, IL-6, TNF- α nach LPS-Stimulation *in vitro*)^{10,11}. Gleiche Veränderungen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock und Verabreichung physiologischer Mengen DHT an kastrierte, männliche Mäuse werden bei der TH1-Zytokinfreisetzung, IL-2, IFN- γ , bei T-Zellen beobachtet¹⁰.

An weibliche Mäuse verabreichte Androgene, *i.e.* DHT in physiologischen Mengen, führen zu einer unterdrückten Immunantwort (Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen nach LPS-Stimulation *in vitro*) bei PM ϕ und SM ϕ nach traumatisch-hämorrhagischem Schock, die vergleichbar mit der männlicher Versuchstiere unter diesen Bedingungen ist^{5,6}. Vergleichbar dazu zeigt sich, dass die Verabreichung von DHT zu einer Hemmung der Ausschüttung von Th1-Zytokinen durch Lymphozyten von weiblichen Mäusen führt^{5,6}. Die Sekretion von IL-10 durch Makrophagen und Lymphozyten wird nicht beeinflusst^{5,6}.

Die Verabreichung des selektiven Testosteronrezeptorblockers Flutamid, führt zu einer wiederhergestellten Makrophagenfunktion der PM ϕ und SM ϕ und einer erhöhten Überlebensrate einer nachfolgend induzierten Sepsis^{5,13,14,111,175}.

Die immunsuppressiven Effekte männlicher Sexualhormone beschränken sich nicht auf den traumatisch-hämorrhagischen Schock, sondern lassen sich auch nach Infektionen und Brandverletzung nachweisen^{92,93,110}. Eine medikamentöse Kastration von männlichen Mäusen durch den spezifischen Testosteronrezeptorblocker Flutamid, stellt die unterdrückte Milzlymphozytenfunktion nach vorangegangener Brandverletzung im Mausmodell wieder her¹¹⁰. Die Verringerung des Testosteron-Plasmaspiegels durch Kastration erhöht dabei die Resistenz männlicher Mäuse gegenüber *Toxoplasma gondii* Infektionen^{92,93}.

Der Erkenntnisstand des Einflusses männlicher Sexualhormone auf polymorphkernige, neutrophile Zellen beschränkt sich auf die Beobachtung, dass mit männlichen Sexualhormonen behandelte polymorphkernige, neutrophile Zellen, kein höheres Maß an Chemotaxis aufweisen, als dies PMNs, die mit weiblichen Hormonen behandelt werden, zu vermögen im Stande sind¹¹².

Trotz dieser Vielzahl an Studien zur Unterdrückung der Immunantwort in Abhängigkeit von Testosteron nach Blutverlust, ist der Einfluss männlicher Sexualhormone auf die MHC II Expression und die Granulozytenfunktion nach Trauma und Blutverlust jedoch unbekannt.

1.3 Fragestellung

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss männlicher Sexualhormone auf funktionelle Parameter der Immunantwort zu untersuchen. In vergangenen Studien hat sich gezeigt, dass männliche Sexualhormone nach traumatisch-hämorrhagischem Schock direkte immunmodulatorische Wirkungen besitzen. Es sollte der Einfluss männlicher Sexualhormone auf zwei entscheidende Pathomechanismen, die zu einer gesteigerten Mortalität nach Trauma und Blutverlust führen können, nämlich eine verminderte Expression von *Major histocompatibility complex* (MHC) Klasse II (Ia) und eine erhöhte Neutrophileninfiltration, untersucht werden. Der Effekt männlicher Sexualhormone auf diese funktionellen Parameter der Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock ist unbekannt.

Es wurde sowohl die MHC Klasse II (Ia) Expression auf Milz- und Peritonealmakrophagen, als auch die Neutrophileninfiltration in Lungen- und Lebergewebe nach traumatisch-hämorrhagischem Schock gemessen.

2 Hypothesen und Zielsetzungen der Studie

Auf Grund vorangegangener Studien wurde die Hypothese aufgestellt, dass Kastration vor traumatisch-hämorrhagischem Schock die überschießende Neutrophileninfiltration in Lungen- und Lebergewebe bremst und zu einer Wiederherstellung der supprimierten *Major histocompatibility complex* (MHC) Klasse II (Ia) Expression auf Milz- und Peritonealmakrophagen führt.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Tiere, Gesetzliche Bestimmungen und Tierhaltung

Es wurden C3H/HeN Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht zwischen 24 und 27 g und einem Alter von 6 bis 8 Wochen verwendet.

Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den Gesetzen des *Animal Welfare Act and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* des *National Institutes of Health* vorgenommen, waren von der Regierung von Oberbayern und der Ludwig-Maximilians-Universität München bewilligt und von der deutschen Forschungsgesellschaft gefördert.

Die Untersuchungen wurden am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Die Tiere wurden in Macrolon® Nr. 2 Käfigen gehalten und erhielten eine Standarddiät (ssniff® R/M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) für Mäuse, sowie Wasser *ad libitum*.

Während des gesamten Studienverlaufes befanden sich die Tiere in der Tierhaltung des Institutes für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München unter tierärztlicher Obhut.

3.2 Gruppeneinteilungen

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in vier Gruppen zu je sechs Tieren randomisiert.

Gruppe I:	scheinkastrierte, männliche Mäuse; Kontrolle (kein Trauma und Blutverlust)
Gruppe II:	scheinkastrierte, männliche Mäuse; Schock (Trauma und Blutverlust)
Gruppe III:	kastrierte, männliche Mäuse; Kontrolle (kein Trauma und Blutverlust)
Gruppe IV:	kastrierte, männliche Mäuse; Schock (Trauma und Blutverlust)

3.3 Kastration und Scheinkastration

Um den Einfluss männlicher Sexualhormone zu beseitigen, wurden 14 Mäuse (Gruppen III+IV) zwei Wochen vor dem geplanten Versuch kastriert¹¹. Die Kastration fand wie folgt statt: nach Anästhesierung mit dem Inhalationsnarkotikum Forene® (Isofluran, Abbott GmbH&CoKG, Wiesbaden, Deutschland) wurden die Mäuse auf dem Rücken fixiert und die Testes unter reinen Operationsbedingungen aus dem Skrotum entnommen. Der Samenstrang wurde mit zu- und abführenden Gefäßen legiert.

Nach Ausleitung der Anästhesie befanden sich die kastrierten Mäuse ca. zwei Stunden postoperativ unter einer Wärmelampe und erhielten zur Schmerzlinderung direkt postoperativ einen Tropfen Novalgin® (Metamizol, Novaminsulfon-ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) oral verabreicht. Dieser Eingriff war mit keiner Mortalität verbunden.

Die Scheinkastration glich der Durchführung der Kastration bis auf die Entnahmen der Testes und der Ligation des Samenstranges (Gruppen I+II). Auch das postoperative Management erfolgte in gleicher Weise.

3.4 Traumatisch-hämorrhagisches Schockmodell und Kontrolloperation

Tiere der Gruppen I und III erhielten eine Kontrolloperation, die Mäuse der Gruppen II und IV einen traumatisch-hämorrhagischen Schock. Für das traumatisch-hämorrhagische Schockmodell wurden die Mäuse mit dem Inhalationsnarkotikum Forene® anästhesiert, auf dem Rücken fixiert, die Bauchwand rasiert und mit Hautantiseptikum desinfiziert. Es schloss sich ein Weichteiltrauma in Form einer Laparotomie (2,5 cm lang) unter reinen Operationsbedingungen an. Die Muskelschicht wurde mit einem 6-0 Ethicon® (Ethibond, Johnson-Johnson, Belgien) Faden und die Haut mit einem 5-0 Ethicon® Faden verschlossen.

Danach erfolgte der hämorrhagische Schock bei den Versuchstieren (Gruppe II und IV).

Unter Fortführung der Inhalationsnarkose mit Forene® wurde beidseits die Leiste mit einem ca. 0,5 cm langen Hautschnitt eröffnet, die Femoralarterien unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops dargestellt und distal ligiert. In beide Femoralarterien wurden Polyäthylen Katheter (SIMS Portex, UK) eingebracht. Anschließend erfolgte das Drehen der Versuchstiere in Bauchlage. Über beide, sich im Gefäßsystem befindlichen Polyäthylen

Katheter, konnte gleichzeitig die Aspiration des Blutes zur Reduktion des Druckes und die Messung des Blutdruckes getätigt werden. Die kontinuierliche Blutdruckmessung erfolgte mittels eines Computergestützten Messverfahrens (Digi-Med, Louisville, KY). Dabei wurde der Blutdruck von systolisch 90 mm Hg (Normaldruck der Maus) auf 35 ± 5 mm Hg für einen Zeitraum von 90 min. gesenkt (Fig. 3; dargestellt sind die Durchschnittswerte und die Standardabweichungen der geschockten Tiere (N=6-7)).

Während des Schocks wurden die Tiere nicht anästhesiert, da Narkotika selbst blutdrucksenkend sind und dadurch eine standardisierte Versuchsdurchführung (Blutdruck kontrolliertes Schockmodell) nicht möglich gewesen wäre.

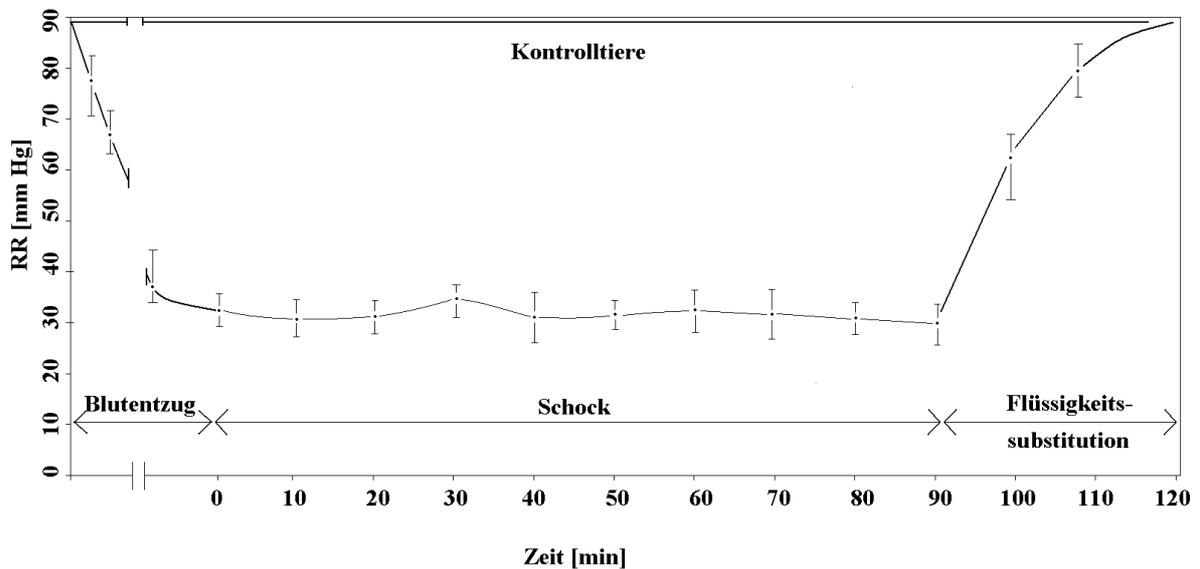


Fig. 3 Darstellung der hämorrhagischen Komponente in Form einer Blutdruckkurve in Abhängigkeit der Zeit (über 90 min.) mit anschließender Flüssigkeitssubstitution über 30 min.

Im Anschluss an die 90 min. Hypotension erhielten die Tiere das entzogene Blutvolumen in vierfacher Menge in Form von sterilem Ringerlaktat (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) innerhalb von 30 min. zurückinfundiert. Nach Beendigung der Flüssigkeitssubstitution wurden die Tiere nochmals mit Forene® anästhesiert, die Katheter entfernt, die Femoralarterien ligiert, das Lokalanästhetikum Xylocain® (Lidocain, AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) im Wundbereich zur verlängerten Schmerzreduktion aufgetragen und die Haut mit einer 5-0 Ethicon® Hautnaht verschlossen.

Das traumatisch-hämorrhagische Schockmodell fand zu gleichen Tageszeiten statt, um Schwankungen der Plasmahormonspiegel in Hinsicht auf zirkadiane Rhythmik zu vermeiden.

Bei den Kontrolltieren (Gruppe I und III) erfolgten die gleichen chirurgischen Verfahren unter Inhalationsnarkose mit Forene® wie bei den Tieren aus der Gruppe des traumatisch-hämorrhagischen Schockmodelles (Gruppe II und IV): Hautschnitt in der Leiste, Einlage der Katheter, Blutdruckmessung, 120 min. Zuwarten, erneutes Anästhesieren mit dem Inhalationsnarkotikums Isoflurane, Entfernen der Katheter, Femoralarterienligatur, Auftragen eines Lokalanästhetikums (Xylocain®) im Bereich der Wunde, Verschluss der Haut mit 5-0 Ethicon® Faden und 2 stündiger Aufenthalt unter der Wärmelampe. Zusammenfassend wurden bei den Kontrolltieren keine Laparotomie und kein Schock durchgeführt.

Vier Std. nach erfolgter Versuchsdurchführung wurden alle Mäuse durch eine Überdosis der Inhalationsnarkose Forene® euthanasiert.

3.5 Granulozyten-Myeloperoxidasebestimmung in Lungen- und Lebergewebe

Zur Detektion der Myeloperoxidasetätigkeit, als Index für die Gewebeeinfiltration von neutrophilen Granulozyten, wurden die Leber und beide Lungenflügel unter reinen Operationsbedingungen entnommen.

Retrograde Perfusion mit eiskaltem PBS *via* V. portae entfernte die Blutfraktion aus der Leber und anschließend wurde die Leber in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bzw. ein Teil der Leber in Formalin fixiert.

Es folgte die Darstellung der Lungen durch Eröffnung des Thorax, die Entnahme des linken Lungenflügels, die Asservierung gleichfalls in flüssigem Stickstoff und Fixation des rechten Lungenflügels in Formalin.

Vor der letztendlichen Aufarbeitung der Gewebe mussten diese gewogen werden, um später die gemessene Myeloperoxidasetätigkeit gewichtsbereinigt beurteilen zu können. Bei den Lungenflügeln stellte sich ein Gewicht von $60\text{mg} \pm 5\text{mg}$, bzw. $150\text{mg} \pm 20\text{mg}$ bei den gewonnenen Lebern heraus. Jede Probe wurde zwischen zwei sterilen, gefrorenen Objektträgern unter Beimengung von $500\ \mu\text{l}$ kaltem $0,02\ \text{M}$ Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4; Tab. 1) in einer Petrischale zerkleinert und die Suspension in ein Eppendorfröhrchen

(Eppendorf, Deutschland) gegeben. Mit weiteren 500 µl des 0,02 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) wurden Petrischale und Objektträger gespült und die restliche Suspension gewonnen, dieses Homogenisat bei 14000 rpm, 4° C für 15 min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zelldebridement für 2 Std. bei 60° C im Wasserbad inkubiert, entsprechend den Arbeiten von Schierwagen *et al.* ¹⁴⁵.

Danach wurde zu den Pellets eine Menge von 320 µl eiskalter 0,05 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0; Tab. 1), der eine 0,5% HTAB-Lösung (hexa-1,6-bis-decyltrimethylammoniumbromid; Tab. 1) enthält, resuspendiert. Diese Suspension wurde für 10 sek. soniziert, dreimal hintereinander bei -80°C eingefroren und aufgetaut. Daraufhin folgte erneutes sonizieren für 10 sek.. Abschließende Zentrifugation bei 14000 rpm, 4° C für 15 min. erbrachte einen Überstand, der gewonnen und bei -80°C bis zur Myeloperoxidasebestimmung asserviert wurde.

In vivo katalysiert Myeloperoxidase (MPO) die Bildung von Hypochlorit und anderen Oxidationsprodukten des Chloridions aus Wasserstoffperoxid und Chlorit.

Der *in vitro* MPO-Assay nützt die Wasserstoffperoxid-abhängige Oxidation von 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB; Tab. 1) ⁴. Dadurch wird das ursprünglich farblose TMB, in seinen blau-grünen Oxidationsstatus überführt. Durch Verbesserung der Reagentienkonzentrationen und des Assay-pH-Wertes, verbesserte Suzuki *et al.* ¹⁶¹ die Sensivität um den Faktor acht. In diesem Assay wurden 75 µl TMB, in Dimethylsulfoxid (DMSO; Tab.1) in einer Endkonzentration von 1,6 mM aufgelöst, 75 µl H₂O₂ (Perhydrol®; Tab.1), das in eiskalten 0,08M Natriumphosphatpuffer (pH 5,4; Tab. 1) in einer Konzentration von 0,6 mM eingebracht wurde und 150 µl des gewonnenen Gewebeprobenüberstandes verwendet. Die Reaktion startete bei 25° C in je einem *Well* pro Probe einer 96 *Well*-Platte (Tab. 4) durch Hinzufügen von kurz vorher gut gemischten 75 µl TMB und 75 µl Wasserstoffperoxid zu den 150 µl Gewebeprobenüberstand.

Die kinetische Reaktion wurde als Extinktionsänderung bei 650 nm für einen Zeitraum von 2 min. und einem OD *limit* von 0,2 kontinuierlich alle 6 sek. photometrisch gemessen.

Um die Datenreproduzierbarkeit und Validität zu gewährleisten, wurden bei jeder Messung gleichzeitig die Leerwerte, bestehend aus 150 µl TMB und 150 µl H₂O₂ und die kommerziell erhältliche *Horseradish Peroxidase* (2.500 U/ml; Tab. 1) in verschiedenen Konzentrationen mitbestimmt.

Abschließend seien im Folgenden in Tabelle 1 alle verwendeten Puffer und Substrate zur Aufbereitung der Organe für die Myeloperoxidasebestimmung im Überblick dargestellt.

Tabelle 1 Verwendete Puffer und Substrate zur Myeloperoxidasebestimmung

Substrat	Besonderheit	Herkunft
0,02 M Kaliumphosphatpuffer	pH=7,4	Sigma-Aldrich, Deutschland
0,05 M Kaliumphosphatpuffer	pH=6,0	Sigma-Aldrich, Deutschland
0,08 M Natriumphosphatpuffer	pH=5,4	Sigma-Aldrich, Deutschland
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid	Sigma-Aldrich, Deutschland
TMB	Tertramethylbenzidin	Sigma-Aldrich, Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Deutschland
Perhydrol	H ₂ O ₂	E. Merck, Deutschland
Horseradish-Peroxidase	2.500 U/ml	Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland

3.6 Naphthol AS-D Chloracetat-Esterase-Färbung im histologischen Schnitt

2µm dicke Paraffinschnitte des Lungen-, bzw. Lebergewebes, wurden mittels absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und die fettfreien Präparate mit destilliertem Wasser (Tab. 5) gespült. Daraufhin erfolgte eine Naphthol AS-D Chloracetat-Esterase-Färbung unter Verwendung eines konventionellen Kits der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland, zur Färbung von Zellen der Granulopoese. Bei der Naphthol AS-D Chloracetat-Granulozytenesterase tritt die Reaktion als rot-violetter Farbniederschlag nur in Zellen der Granulopoese auf. Die Lymphe- und Monozyten zeigen schwache oder keine Reaktion.

Die gefärbten Präparate wurden mittels Randomisierung ausgewählt und manuell mit dem Mikroskop die gefärbten Zellen der Granulopoese ausgezählt. Dazu wurden 8 Gesichtsfelder pro Präparat herangezogen. Die Zählung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher. Der ermittelte Durchschnittswert stellte die Datengrundlage für das jeweilige Gewebe eines Versuchstieres dar.

Im Einzelnen wurden die Schnitte bei 37°C mit ASDCL (Naphthol AS-D Chloracetat-Esterase)-Lösung für 30 min. lichtgeschützt mittels Tauchbad gefärbt. Die genaue Zusammensetzung der kommerziell erhältlichen ASDCL-Lösung findet sich in Tab. 2. Es folgte ein Spülvorgang mit destilliertem Wasser und eine kurze Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland: 6,0 g/l Hämatoxylin, 0,6 g/l Natriumjodat, 52,8 g/l Aluminiumsulfat). Nach abschließender Spülung mittels H₂O, folgte die Lufttrocknung und Eindeckelung mit Glyceringelatine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland).

Tabelle 2 ASDCL-Lösung (alle Produkte von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland).

Bestandteile	Konzentrationen
1 Teil Fast-Red-Violet LB(Base)-Lösung	15 mg/ml Fast Red Violet LB Base in 0,4 mol/l Salzsäure
1 Teil Natriumnitritlösung	0,1 mol/l Natriumnitrit
40 Teile 37°C warmen Aqua dest.	
5 Teile Trizmal TM 6,3 Pufferkonzentrat	1 mol/l Trizma® Maleat, (pH 6,3±0,15)
1 Teil Naphtol-AS-D Chloracetat-Lösung	8 mg/ml Naphthol AS-D Chloracetat

3.7 Gewinnung von Makrophagen *in vitro* Kulturverfahren

Peritoneal M ϕ :

Die Peritonealmakrophagen wurden nach der Methode von Ayala *et al.*^{20,184} aus dem Abdomen der Tiere gewonnen.

Nach Fixierung der Maus in Rückenlage, erfolgte durch einen weit lateralen, paramedianen Bauchhautschnitt und stumpfer subkutaner Präparation unter reinen Operationsbedingungen, die Darstellung der seitlichen Bauchmuskeln. Es folgte eine Injektion von 5 ml kalter (4°C) *Phosphate buffered saline*-Lösung (PBS-Lösung, Tab. 5) in das seitliche Abdomen. Die Gewinnung der Peritoneallavage fand durch Aspiration im ehemaligen Injektionsgebiet statt. Entsprechend wurden auf der gegenüberliegenden Seite, die an das Peritoneum adhäsiven Zellen gewonnen. Nach einer Zentrifugation bei 320 x g für 15 min. bei 4°C schloss sich die Isolation der zellulären Fraktion an. Die Peritonealmakrophagen wurden in 2 ml Click's-Medium (Tab. 5) resuspendiert, auf ein *Well* einer 6-*Well* Kulturplatte (Tab. 4) gebracht und für die Dauer von 2 Std. bei 37°C und 5% CO₂ zur Adhärenz der Makrophagen inkubiert. Die Isolation der am Boden der Kulturplatte anhaftenden Peritonealmakrophagen geschah durch wiederholtes Waschen zur Entfernung der nicht adhäsiven Zellen.

Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die Peritonealmakrophagen mittels eines Zellschabers (Tab. 4) entfernt und zur Detektion der Flowzytometrie in Rundbodenröhrchen für FACS-Analyse (Tab. 4) zugeführt.

Milz-M ϕ :

Die Milzmakrophagen wurden nach der Methode von Kaye *et al.* gewonnen⁸⁸.

Es wurde die Bauchhöhle unter reinen Operationsbedingungen eröffnet, die Milz freipräpariert, abgesetzt und in 9 ml eiskaltem PBS aseptisch asserviert. Die Gewinnung der Milzzellen fand durch vorsichtiges Zerreiben des Organs zwischen sterilen Objektträgern statt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 320 x g für 15 min. und 4° C zentrifugiert und in PBS-Lösung resuspendiert. Steriles, hypotones Wasser lysierte daraufhin vorhandene Erythrozyten. Nach sieben sek. stoppte die Zugabe von 10 x PBS die Lyse. Durch Adhäsion an eine Glaspipette konnten die Erythrozytenfragmente aus der Zellsuspension entfernt werden. Daraufhin schloss sich eine erneute Zentrifugation bei 320

x g für 15 min. und 4° C an. Um die zu untersuchenden Milzmakrophagen aus der so entstandenen Zellsuspension zu isolieren, machte man sich ihre Adhäsionsfähigkeit zu nutzen, indem die Suspension in 2 ml Click's Nährmedium bei 37°C und 5% CO₂ für zwei Std. auf einem *Well* einer 6-*Well*-Platte inkubiert wurde. Waschen mit Medium sollte anschließend dazu dienen, die nicht adhäsiven Zellen und Bestandteilen von den Makrophagen zu separieren.

Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die Milzmakrophagen mittels eines Zellschabers entfernt und zur Detektion der Flowzytometrie zugeführt.

Um steriles Arbeiten unter gleich bleibenden Voraussetzungen in der Zellkultur leisten zu können, standen die in folgenden Tabellen aufgeführten Geräte (Tab. 3), Zellkulturmaterialien (Tab. 4), Medien, Puffer und Lösungen (Tab. 5) zur Verfügung.

Tabelle 3 Geräte

Geräteart:	Herkunft/Firma:
Brutschrank	US-AUTO-Flow [®] , NuAir, Phymouth, Minnesota, USA
Arbeitsbank	Gelaire [®] ,BSB 6A, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, Deutschland
Mikroskop	IDO 3, Zeiss, Deutschland
Zentrifuge	Rotixa/ PR, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Vortexgerät	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Deutschland
Handpipetten 10µl, 100µl und 1000µl	Eppendorf, Deutschland
Waagen, geeicht	Balance FX-40, A&D Elektronik, Frankfurt am Main und PL 1200, Mettler, Giessen, Deutschland

Tabelle 4 Zellkulturmaterialien

Materialart:	Herkunft
50 ml Zentrifugiergefäße	Blue Max [™] , Falcon, BD, Heidelberg, Deutschland
15 ml Zentrifugiergefäße	TPP, Trasadingen, Schweiz
sterile Pipettenspitzen (5ml, 10ml, 25ml)	Costar [®] , Corning, NY, USA
sterile Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Rainin, Leiden, Niederlande
Gewebekulturplatte (6-Well und 96-Well)	Nunclon [™] Surface, Nunc [™] , Wiesbaden, Deutschland
Rundbodenröhrchen für FACS-Analyse	Becton Dickinson Labware, Meylan Cedex, Frankreich
Zellschaber (Nr.: 9902)	TPP, Schweiz

Tabelle 5 Medien, Puffer und Lösungen

Medien/Puffer/Lösungen	Zusammensetzung/ Bezeichnung	Herkunft
Nährmedium	Click's Medium (Eagle's Ham's amino acids, 0,584g/l L-Glutamin) +1000µg/l Gentamicin +10% FCS (das FCS wurde ultrafiltriert, um die Sexualhormone zu beseitigen)	Sigma-Aldrich, Deutschland Bio Whittaker, Belgien Gibco, NY, United States
Phosphate Buffered Saline (PBS)	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ in Aqua. dest. (pH 7,3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
FACS-Buffer	0.1% NaN ₃ , 1% BSA in PBS	Sigma-Aldrich, Deutschland
BSA		Sigma-Aldrich, Deutschland
Paraformaldehyd		Sigma-Aldrich, Deutschland
destilliertes Wasser		Sigma-Aldrich, Deutschland

3.8 Verfahren der Durchflußzytometrie zur MHC Klasse II und CD11b Bestimmung

3.8.1 Grundzüge des Messverfahrens

Die Expression der *Major histocompatibility complex* (MHC) Klasse II (Ia) und der CD11b (Mac1) Expression wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Die Messung erfolgte mit einem FACSort[®] (Becton Dickinson GmbH, Deutschland) mit dazu passender Software (CELLQuest[™], Becton Dickinson). Die Abkürzung FACS steht für „*fluorescent activated cell sorter*“. Dabei werden Einzelzellsuspensionen mit einem Laserstrahl (15mw, 488nm-Argon-Ionen-Laser) abgetastet und die Fluoreszenzintensität und die Streulichtintensität der markierten Zellen mittels Fotometerzellen registriert. Ein Analog-Digital-Wandler (ADC) konvertiert diesen Puls in ein digitales Signal. Wird ein „Ereignis“ (Ablenkung des geraden Laserstrahls) mit bestimmter Voltzahl registriert, wird dieser einer entsprechenden Intensität zugeordnet und kann somit graphisch (Anzahl der Ereignisse mit entsprechenden Intensitäten) dargestellt werden. Gängigerweise wird die Lichtstreuung im Vorwärtsstreulicht (FSC) von 0-10° gemessen, welches eine Aussage über die Zellgrößenrelation gibt. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) von 90° liefert Informationen über die Zellstruktur (Zellmembran, Zellkern, Granularität). FSC/SSC werden meist linear, Fluoreszenzen hingegen meist logarithmisch über vier Dekaden verstärkt, da diese einen breiten Bereich von Intensitätsabstufungen beanspruchen. Bei der Messung einer Fluoreszenz ist die Abbildung in Histogrammen gängig. Hierbei werden die Intensitäten gegen die gezählten Ereignisse aufgetragen (siehe hierzu Fig. 10 und 12 im Ergebnissteil). In Figur 4 ist in einer Kurzübersicht dargestellt, wie im FACS-Gerät aus einem Ereignis vier Parameter (*Forward-Scatter* = FSC, *Side-Scatter* =SSC, Fluoreszenz 1 = FL-1, Fluoreszenz 2 = FL-2) gemessen werden können.

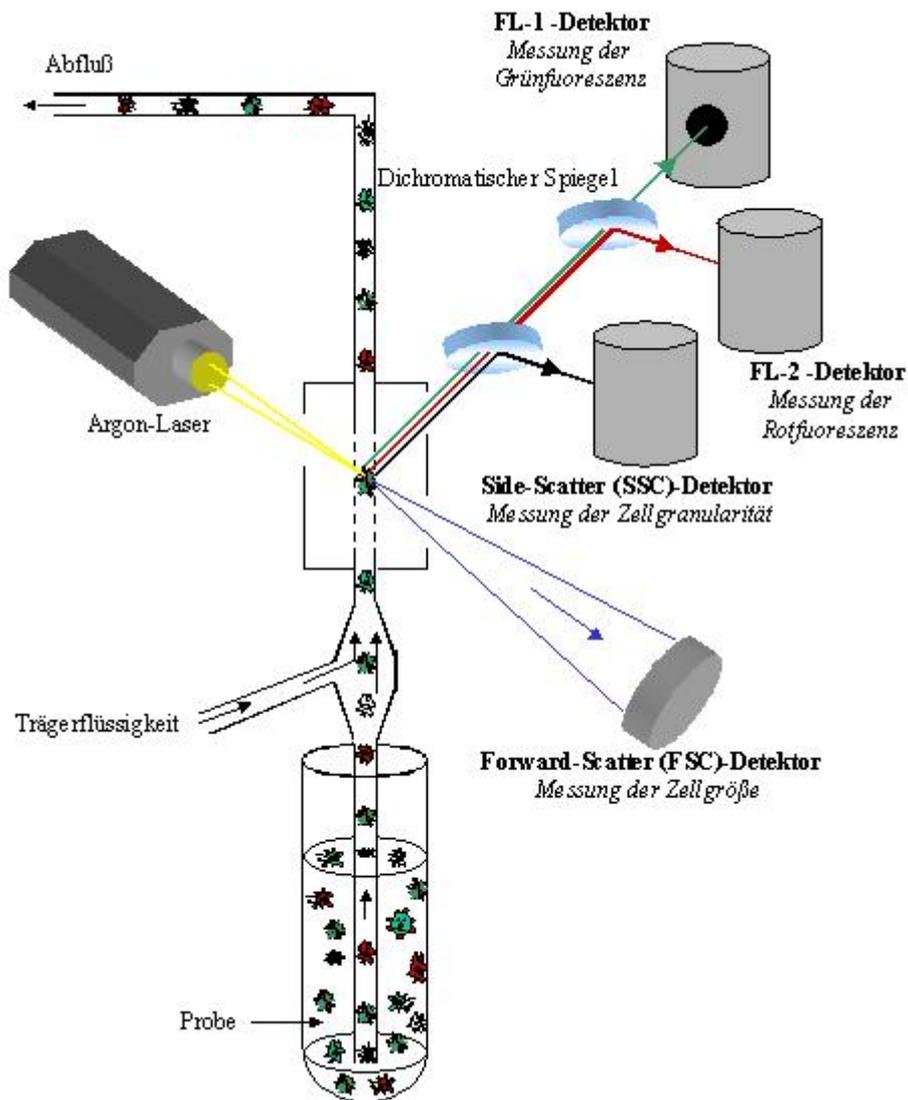


Fig. 4 Arbeitsweise eines Durchflußzytometers (mit freundlicher Genehmigung von Dr. J. Schmidt, Augsburg)

Die durch den Laser aktivierte maximale Lichtemission des roten Farbstoffes, des R-Pe (Phycoerythrin) markierten MHC Klasse II (Ia)-Antikörpers auf Peritoneal- und Milzmakrophagen, wurde bei 585 ± 21 nm detektiert.

Der FITC (Fluoresceinisothiozyanat) konjugierte Antikörper CD11b sendet ein grünes Licht der Wellenlänge von 500-570 nm aus, dessen Maximum bei 530 nm registriert wurde.

3.8.2 Detektion der MHC Klasse II und der CD11b Expression auf Peritoneal- und Milzmakrophagen

Der Nachweis der MHC Klasse II (Ia) Expression auf der Zelloberfläche der PM ϕ und SM ϕ wurde mit R-Pe-konjugiertem Antikörper (Tab. 6) mittels FACS-Analyse durchgeführt.

Zur Bestimmung der adäquaten Antikörpervolumen wurden Verdünnungsreihen im Bereich der Sättigungscharakteristik bestimmt und die ermittelten Antikörpervolumina zur abschließenden Messung verwendet. Der benützte Antikörper ist gegen den CKB-Mausstamm immunogen. Dieser Stamm ist ein Derivat des in der Studie verwendeten C3H-Mausstammes. Der verwendete Klon (11-5.2) (Tab. 6) reagiert mit der α -Kette des MHC Klasse II Moleküls und soll so weniger Kreuzreaktivität mit anderen Haplotypen zeigen. Die Anfärbung der zu untersuchenden Zelloberflächenstruktur, mittels konjugierten Antikörpers, erfolgte, wie im Folgenden beschrieben:

Sowohl die PM ϕ , als auch die SM ϕ , wurden aus ihrem jeweiligen *Well* mittels eines konventionellen Zellschabers (Tab. 4) entfernt und in FACS Rundbodenröhrchen (Tab. 4) überführt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit FACS-*Buffer* (Tab. 5) gewaschen (4min., 4°C, 1500rpm), danach mit 0,5 μ l Fc-Blocker (CD16/CD32) (Tab. 6), zur Blockung der zahlreich vorhandenen Fc-Bindungsstellen der Makrophagen, versehen, gevortext und für 30 min. auf Eis und Dunkelheit inkubiert. Daraufhin sollte erneutes Waschen mit FACS-*Buffer* den restlichen Blocker vollständig entfernen. Zur Detektion der MHC Klasse II (Ia) wurden die PM ϕ und SM ϕ mit dem entsprechenden Antikörper mit einer Menge von 2,5 μ l versehen und für 20 min. auf Eis und Dunkelheit inkubiert und nochmals mit FACS-*Buffer* gewaschen. Abschließend wurden die Zellen mit 1%igem Paraformaldehyd (Tab. 5) fixiert und innerhalb von zwölf Stunden mittels FACS analysiert.

Zur Kontrolle der unspezifischen Bindungen und Autofluoreszenz wurde eine passende IgG-Isotypkontrolle mit baugleichem Antikörper (Tab.6) durchgeführt.

Das Intensitätsmaximum dieser Kontrolle wurde in die erste log-Dekade justiert und diese Einstellungen für die nachfolgenden Proben belassen. Als ein positives Ereignis galt jedes Intensitätssignal, welches höher als die Fluoreszenz der Isotypkontrolle der Vergleichsprobe lag. Diese Grenze wurde jeweils für ein Tier der Gruppe festgelegt und bei den anderen drei Tieren des jeweiligen Versuchstages dabei belassen. Eine Vergleichbarkeit der Proben aus den jeweiligen verschiedenen Gruppen ist hiermit für jeden einzelnen Versuchstag möglich.

Es wurden mindestens 10 000 Makrophagen für jedes Makrophagenkompartiment und Tier detektiert.

Die Verifizierung der Höhe der CD11b Expression (Mac-1) auf PM ϕ und SM ϕ erfolgte analog der MHC Klasse II Expressionsmessung mittels eines FITC-konjugierten, monoklonalen Antikörpers (Tab. 6). CD11b/Mac-1 stellt einen differenzierungsabhängigen Mausmakrophagenmarker dar, der auf Makrophagen der Maus unterschiedlicher Kompartimente in verschiedener Ausprägung exprimiert wird. Der verwendete Klon (M1-70) reagiert mit allen Mäusestämmen, da dieser mit einer rudimentären α -Integrin-Kette interagiert, die eine äußerst konservierte Region darstellt. Dieser Antikörper diente zur Verifizierung der gewonnenen Makrophagen. Es wurden mindestens 10 000 Makrophagen für jedes Makrophagenkompartiment und Tier detektiert. Die verwendeten Antikörper finden sich nachfolgend in tabellarischer Form (Tabelle 6).

Tabelle 6 Verwendete Antikörper zur Flowzytometriedetektion

Antikörper:	Klon:	Konjugation:
Anti-IgG Isotypkontrolle (Maus IgG2b, κ)	MPC-11	R-PE
Anti-MHC II (I-A α κ) Maus anti Maus monoklonaler Ak Immunogenität: CKB (= C3H-Derivat)	11-5.2	R-PE
Anti-IgG Isotypkontrolle (Ratte(DA)IgG2b, κ)	A95-1	FITC
Anti-CD11b (Mac-1 α) Ratte anti Maus monoklonaler Ak Immunogenität: C57BL/10 (alle Mäusestämme)	M1/70	FITC

Fc-Block:	Immunogenität:	Klon:
Anti-Maus CD16/CD32 (Fc III/II Rezeptor)	BALB/c Mausmakrophagenzelllinie J774	2.4G2

Alle verwendeten Antikörper, Isotypkontrollantikörper und der verwendete Fc-Blocker entstammten der Firma BD PharMingen, Deutschland.

4 Ergebnisse

4.1 Granulozyten-Myeloperoxidaseaktivität im Lungen- und Lebergewebe

Lunge:

Bei Kontrolltieren (ohne Trauma und Blutverlust) führt Kastration zu keiner Veränderung der Granulozyten-Myeloperoxidaseaktivität, als Index für die Gewebeeinfiltration von neutrophilen Granulozyten, im Lungengewebe ($v_{\max} 10^{-3} \text{mODmin}^{-1} \text{mg}^{-1}$ von $2,2 \pm 1,3$ bei männlichen, scheinkastrierten Kontrolltieren, $1,2 \pm 0,7$ $v_{\max} \cdot 10^{-3} \text{mODmin}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bei kastrierten Kontrolltieren) (Fig. 5).

Bei männlichen, scheinkastrierten Tieren ist die Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe nach traumatisch-hämorrhagischem Schock erhöht von $2,2 \pm 1,3$ $v_{\max} \cdot 10^{-3} \text{mODmin}^{-1} \text{mg}^{-1}$ auf $7,7 \pm 15,2$ $v_{\max} \cdot 10^{-3} \text{mODmin}^{-1} \text{mg}^{-1}$ im Vergleich zur Kontrollgruppe männlicher, scheinkastrierter Mäuse (Fig. 5). Dieser Anstieg ist jedoch auf Grund der großen Standardabweichung nicht signifikant.

Vorherige Kastration verringert den Anstieg der Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe nach traumatisch-hämorrhagischem Schock nicht signifikant. So zeigt das Lungengewebe kastrierter Versuchstiere nach traumatisch-hämorrhagischem Schock eine Myeloperoxidaseaktivität von $2,1 \pm 2,2$ $v_{\max} \cdot 10^{-3} \text{mODmin}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Fig. 5).

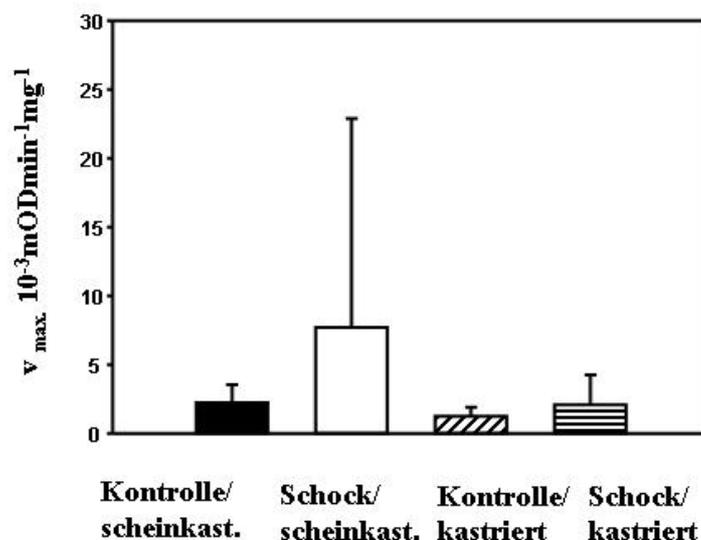


Fig. 5 Myeloperoxidaseaktivität ($v_{\max} \cdot 10^{-3} \text{mODmin}^{-1} \text{mg}^{-1}$) im Lungengewebe 4 Std. nach Trauma und Blutverlust (Schock) oder Kontrolloperation (Kontrolle) bei männlichen C3H/HeN Mäusen, welche 2 Wochen vor dem Experiment kastriert oder scheinkastriert wurden. Die Werte wurden als Durchschnittswerte angegeben \pm Standardabweichung, $N=6-7/\text{Gruppe}$.

Leber:

Bei Kontrolltieren (ohne Trauma und Blutverlust) führt Kastration zu keiner Veränderung der Granulozyten-Myeloperoxidaseaktivität, als Index für die Gewebeeinfiltration von neutrophilen Granulozyten, im Lebergewebe (v_{\max} . $10^{-3}\text{mODmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ von $3,5\pm 4,6$ bei männlichen, scheinkastrierten Kontrolltieren, $2,6\pm 3,7$ v_{\max} . $10^{-3}\text{mODmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ bei kastrierten Kontrolltieren) (Fig. 6).

Bei männlichen, scheinkastrierten Tieren ist die Myeloperoxidaseaktivität im Lebergewebe nach traumatisch-hämorrhagischem Schock erhöht von $3,5\pm 4,6$ v_{\max} . $10^{-3}\text{mODmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ auf $7,8\pm 10,6$ v_{\max} . $10^{-3}\text{mODmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ im Vergleich zur Kontrollgruppe männlicher, scheinkastrierter Mäuse (Fig. 6). Auch hier findet sich kein signifikanter Unterschied auf Grund der großen Standardabweichung.

Vorherige Kastration verringert den Anstieg der Myeloperoxidaseaktivität im Lebergewebe nach traumatisch-hämorrhagischem Schock nicht signifikant. So zeigt das Lebergewebe kastrierter Versuchstiere nach traumatisch-hämorrhagischem Schock eine durchschnittliche Myeloperoxidaseaktivität von $4,6\pm 5,0$ v_{\max} . $10^{-3}\text{mODmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (Fig. 6).

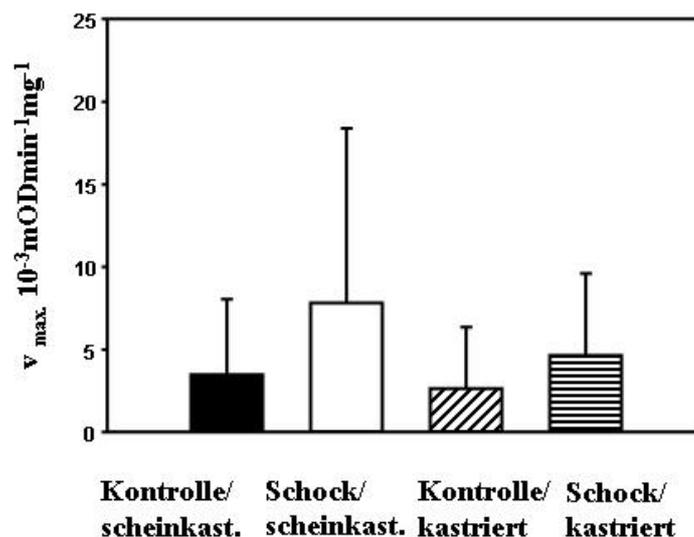


Fig. 6 Myeloperoxidaseaktivität (v_{\max} . $10^{-3}\text{mODmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$) im Lebergewebe 4 Std. nach Trauma und Blutverlust (Schock) oder Kontrolloperation (Kontrolle) bei männlichen C3H/HeN Mäusen, welche 2 Wochen vor dem Experiment kastriert oder scheinkastriert wurden. Die Werte wurden als Durchschnittswerte angegeben \pm Standardabweichung, $N=6-7/\text{Gruppe}$.

4.2 Granulozyteninfiltration der Lunge und Leber im histologischen Schnitt

Lunge:

Bei Kontrolltieren (ohne Trauma und Blutverlust) führt Kastration zu keiner Veränderung der durchschnittlich ermittelten Granulozytenzahl pro Gesichtsfeld im histologischen Schnitt des Lungengewebes (50 ± 15 bei männlichen, scheinkastrierten Kontrolltieren, 42 ± 12 bei kastrierten Kontrolltieren) (Tab. 7).

Bei männlichen, scheinkastrierten Tieren ist die durchschnittlich ermittelte Granulozytenzahl pro Gesichtsfeld im histologischen Schnitt des Lungengewebes nach traumatisch-hämorrhagischem Schock signifikant erhöht von 50 ± 15 auf 85 ± 25 im Vergleich zur Kontrollgruppe männlicher, scheinkastrierter Mäuse (Tab. 7).

Kastration hat keinen Einfluss auf den Anstieg der Granulozyteninfiltration im Lungengewebe nach traumatisch-hämorrhagischem Schock.

So zeigt sich auch im Lungengewebe kastrierter Versuchstiere nach traumatisch-hämorrhagischem Schock ein signifikanter Anstieg der Granulozytenzahl von 70 ± 21 (Tab. 7).

Tabelle 7 Durchschnittswerte der Granulozyten pro Gesichtsfeld (nach Auszählung von 8 Gesichtsfeldern je Versuchstier von zwei unabhängigen Untersuchern) im in Paraffin gebetteten Lungengewebe nach Naphthol AS-D Chloracetat-Esterase Färbung 4 Std. nach Trauma und Blutverlust (Schock) oder Kontrolloperation (Kontrolle) bei männlichen C3H/HeN Mäusen. Die Tiere wurden 2 Wochen vor dem Experiment kastriert, bzw. scheinkastriert.

*Die Werte wurden als Durchschnittswerte angegeben \pm Standardabweichung, N=6-7/Gruppe. Datenanalyse mittels ANOVA. * $p < 0,05$ vs. Kontrolloperation.*

Kontrolle/scheinkastriert	50 ± 15
Schock/scheinkastriert	85 ± 25 *
Kontrolle/kastriert	42 ± 12
Schock/kastriert	70 ± 21 *

Leber:

Auch im histologischen Schnitt des Lebergewebes führt Kastration bei Kontrolltieren (ohne Trauma und Blutverlust) zu keiner Veränderung der durchschnittlich ermittelten Granulozytenzahl pro Gesichtsfeld (3 ± 2 bei männlichen, scheinkastrierten Kontrolltieren, 3 ± 2 bei kastrierten Kontrolltieren) (Tab. 8).

Bei männlichen, scheinkastrierten Tieren ist die durchschnittlich ermittelte Granulozytenzahl pro Gesichtsfeld im histologischen Schnitt des Lebergewebes nach traumatisch-hämorrhagischem Schock signifikant erhöht von 3 ± 2 auf 8 ± 9 im Vergleich zur Kontrollgruppe männlicher, scheinkastrierter Mäuse (Tab. 8). Allerdings liegt keine Normalverteilung vor.

Kastration hat keinen Einfluss auf den Anstieg der Granulozyteninfiltration im Lebergewebe nach traumatisch-hämorrhagischem Schock.

So zeigt sich auch im Lebergewebe kastrierter Versuchstiere nach traumatisch-hämorrhagischem Schock ein signifikanter Anstieg der Granulozytenzahl von 6 ± 3 (Tab. 8). Aber es liegt keine Normalverteilung der Daten vor.

Tabelle 8 Durchschnittswerte der Granulozyten pro Gesichtsfeld (nach Auszählung von 8 Gesichtsfeldern je Versuchstier von zwei unabhängigen Untersuchern) im in Paraffin gebetteten Lebergewebe nach Naphthol AS-D Chloracetat-Esterase Färbung 4 Std. nach Trauma und Blutverlust (Schock) oder Kontrolloperation (Kontrolle) bei männlichen C3H/HeN Mäusen. Die Tiere wurden 2 Wochen vor dem Experiment kastriert, bzw. scheinkastriert.

*Die Werte wurden als Durchschnittswerte angegeben \pm Standardabweichung, N=6-7/Gruppe. Datenanalyse mittels ANOVA. * $p < 0,05$ vs. Kontrolloperation.*

Kontrolle/scheinkastriert	3 ± 2
Schock/scheinkastriert	8 ± 9 *
Kontrolle/kastriert	3 ± 2
Schock/kastriert	6 ± 3 *

4.3 CD11b Expression auf Peritoneal- und Milzmakrophagen

Peritoneal M ϕ :

Die CD11b Expression, *i.e.* Mac-1-Expression, ein differenzierungsabhängiger Makrophagenmarker, auf den Peritonealmakrophagen ist in allen Gruppen vergleichbar. Weder traumatisch-hämorrhagischer Schock, noch Kastration haben einen signifikanten Einfluss auf die Expression von CD11b und liegt im Mittel bei 65 % auf den Peritonealmakrophagen (Fig.7).

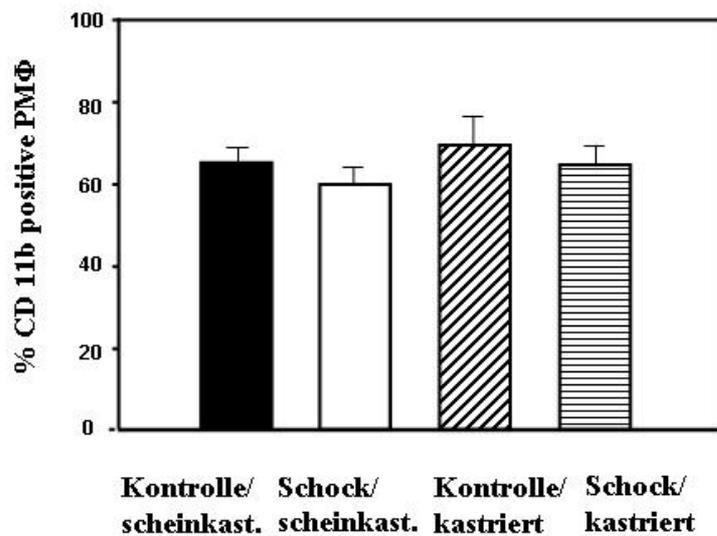


Fig. 7 CD11b Expression auf Peritonealmakrophagen 4 Std. nach Trauma und Blutverlust (Schock) oder Kontrolloperation (Kontrolle) bei männlichen C3H/HeN Mäusen, welche 2 Wochen vor dem Experiment kastriert oder scheinkastriert wurden. Die Werte wurden als Durchschnittswerte angegeben \pm Standardabweichung, N=3-4/Gruppe. Es wurden mindestens 10 000 Makrophagen mittels Flowzytometrie analysiert.

Milz M ϕ :

Die CD11b Expression ist auch auf den Milzmakrophagen in allen Gruppen vergleichbar. So zeigt sich bei den Tieren des traumatisch-hämorrhagischen Schocks und der Kontrollgruppe eine durchschnittliche CD11b Expression von 9 % auf den Milzmakrophagen, unabhängig davon, ob sie zuvor kastriert, oder scheinkastriert wurden (Fig. 8).

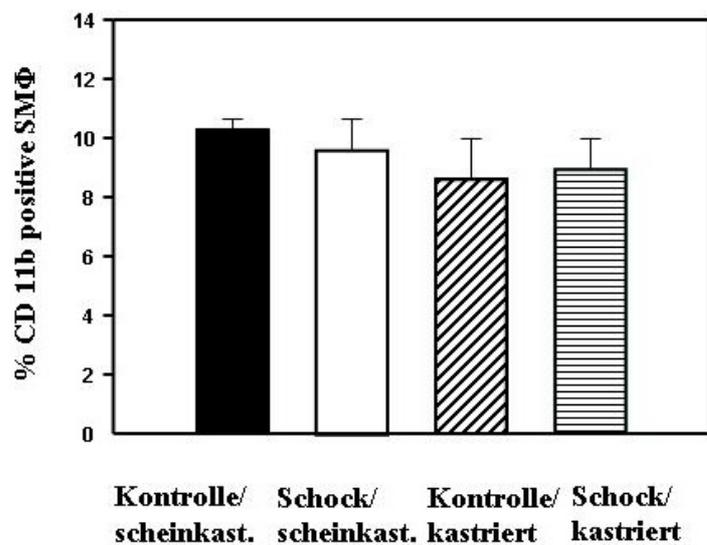


Fig. 8 CD11b Expression auf Milzmakrophagen 4 Std. nach Trauma und Blutverlust (Schock) oder Kontrolloperation (Kontrolle) bei männlichen C3H/HeN Mäusen, welche 2 Wochen vor dem Experiment kastriert oder scheinkastriert wurden. Die Werte wurden als Durchschnittswerte angegeben \pm Standardabweichung, N=3-4/Gruppe. Es wurden mindestens 10 000 Makrophagen mittels Flowzytometrie analysiert.

4.4 MHC II Expression auf Peritoneal- und Milzmakrophagen

Peritoneal M ϕ :

Bei Kontrolltieren (ohne Trauma und Blutverlust) führt Kastration zu keiner signifikanten Veränderung der MHC Klasse II (Ia) Expression von Peritonealmakrophagen ($31\pm 2\%$ bei männlichen, scheinkastrierten Kontrolltiere, $28\pm 3\%$ bei kastrierten Kontrolltiere) (Fig. 9).

Bei männlichen, scheinkastrierten Tieren ist die MHC II (Ia) Expression von Peritonealmakrophagen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock signifikant verringert von $31\pm 2\%$ auf $19\pm 3\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe männlicher, scheinkastrierter Mäuse (Fig. 9).

Kastration behebt die Suppression der MHC Klasse II (Ia) Expression auf Peritonealmakrophagen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock.

So verzeichnen die Peritonealmakrophagen kastrierter Versuchstiere nach traumatisch-hämorrhagischem Schock eine MHC Klasse II (Ia) Expression von $36\pm 5\%$ (Fig.9). Diese Zunahme ist signifikant.

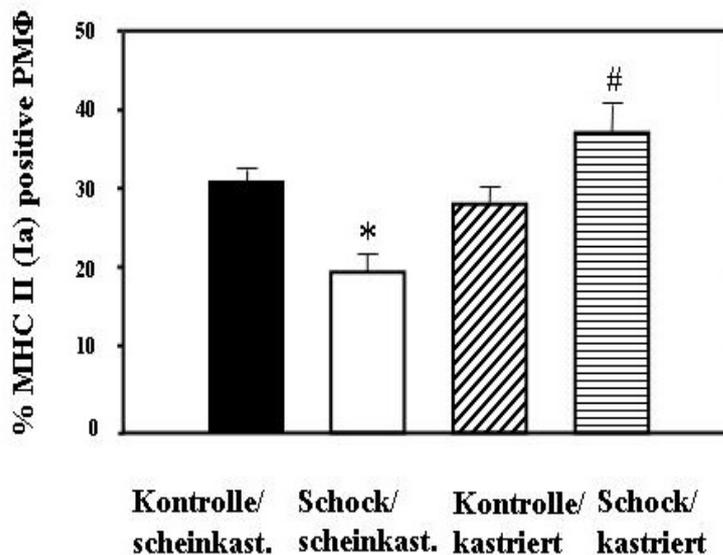


Fig. 9 MHC II (Ia) Expression auf Peritonealmakrophagen 4 Std. nach Trauma und Blutverlust (Schock) oder Kontrolloperation (Kontrolle) bei männlichen C3H/HeN Mäusen, welche 2 Wochen vor dem Experiment kastriert oder scheinkastriert wurden. Die Werte wurden als Durchschnittswerte angegeben \pm Standardabweichung, $N=6-7$ /Gruppe. Datenanalyse mittels ANOVA. */# $p<0,05$ vs. entsprechenden Kontrolloperationen. Es wurden mindestens 10 000 Makrophagen mittels Flowzytometrie analysiert.

Darstellung jeweils eines repräsentativen Versuchstieres pro Gruppe im Histogramm (Fig. 10,A,B):

Fig. 10 A

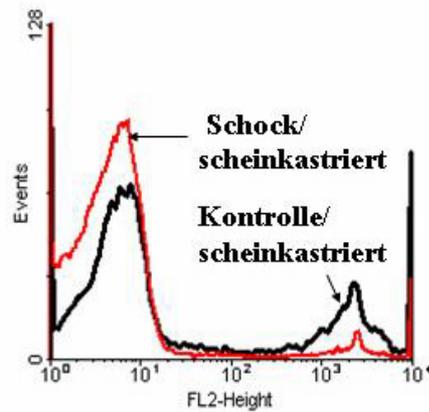


Fig. 10 B

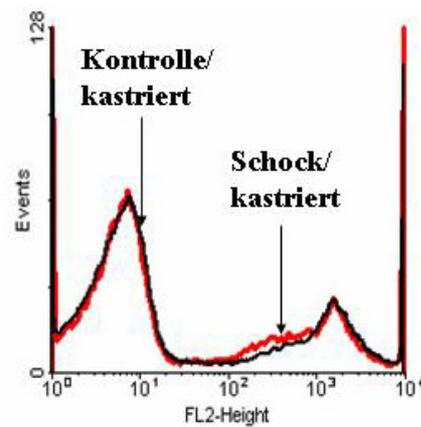


Fig.10,A,B Histogramme der MHC II (Ia) Expression auf Peritonealmakrophagen 4 Std. nach Trauma und Blutverlust (Schock) oder Kontrolloperation (Kontrolle) bei männlichen C3H/HeN Mäusen. Die Mäuse wurden 2 Wochen zuvor scheinkastriert (A), oder kastriert (B).

Es wurden mindestens 10 000 Makrophagen mittels Flowzytometrie analysiert.

Milz M ϕ :

Bei Kontrolltieren (ohne Trauma und Blutverlust) führt Kastration zu keiner signifikanten Veränderung der MHC Klasse II (Ia) Expression von Milzmakrophagen ($37\pm 1\%$ bei männlichen, scheinkastrierten Kontrolltieren, $36\pm 1\%$ bei kastrierten Kontrolltieren) (Fig. 11).

Bei männlichen, scheinkastrierten Tieren ist die MHC II (Ia) Expression von Milzmakrophagen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock signifikant verringert von $37\pm 1\%$ auf $30\pm 1\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe männlicher, scheinkastrierter Mäuse (Fig. 11).

Vorherige Kastration verhindert die Suppression der MHC Klasse II (Ia) Expression auch auf Milzmakrophagen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock. So zeigen die Milzmakrophagen kastrierter Versuchstiere nach traumatisch-hämorrhagischem Schock eine MHC Klasse II (Ia) Expression von $39\pm 0,5\%$ (Fig. 11).

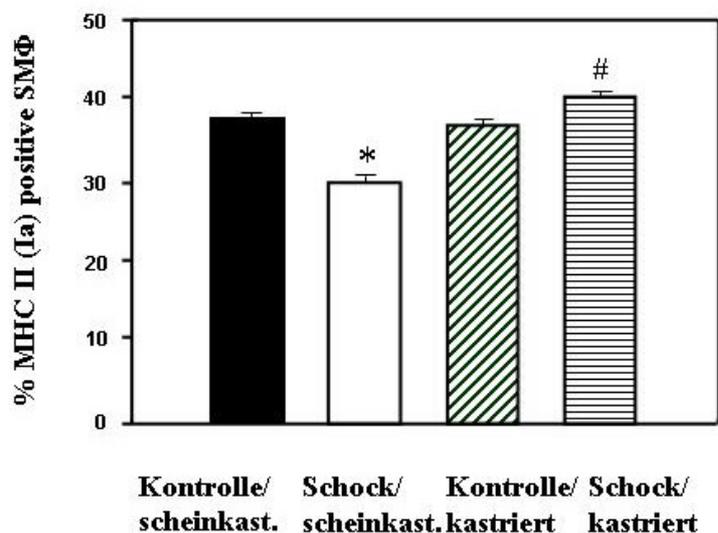


Fig. 11 MHC II (Ia) Expression auf Milzmakrophagen 4 Std. nach Trauma und Blutverlust (Schock) oder Kontrolloperation (Kontrolle) bei männlichen C3H/HeN Mäusen, welche 2 Wochen vor dem Experiment kastriert oder scheinkastriert wurden. Die Werte wurden als Durchschnittswerte angegeben \pm Standardabweichung, $N=6-7$ /Gruppe. Datenanalyse mittels ANOVA. */# $p < 0,05$ vs. entsprechenden Kontrolloperationen.

Es wurden mindestens 10 000 Makrophagen mittels Flowzytometrie analysiert.

Darstellung jeweils eines repräsentativen Versuchstieres pro Gruppe im Histogramm (Fig. 12, A, B):

Fig. 12 A

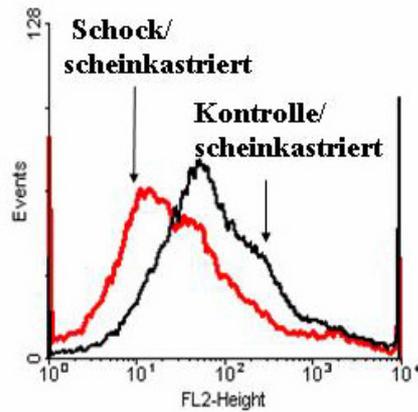


Fig. 12 B

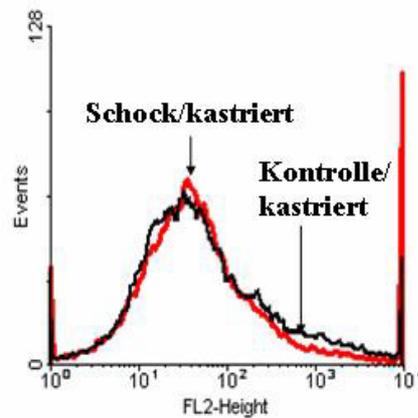


Fig. 12, A, B Histogramme der MHC II (Ia) Expression auf Milzmakrophagen 4 Std. nach Trauma und Blutverlust (Schock) oder Kontrolloperation (Kontrolle) bei männlichen C3H/HeN Mäusen. Die Mäuse wurden 2 Wochen zuvor scheinkastriert (A), oder kastriert (B).

Es wurden mindestens 10 000 Makrophagen mittels Flowzytometrie analysiert.

5 Diskussion

5.1 Problemstellung

Pathophysiologische Veränderungen nach Trauma und Blutverlust führen zu proinflammatorischer Zytokinsekretion und einem Endothelschaden, der über eine Neutrophileninfiltration als Antwort auf die Zytokinverarbeitung, die Entzündungsreaktion unterhält und damit die Immunantwort unterdrückt, indem weitere Zytokinkaskaden initiiert und Dysfunktionen Antigenpräsentierender Zellen verursacht werden. Da Antigenpräsentierende Zellen, z.B. Makrophagen oder Dendritische Zellen, eine essentielle Rolle in der Induktion einer adäquaten Immunantwort spielen, könnte die Unterdrückung der Funktion Antigenpräsentierender Zellen der entscheidende Faktor für den Mangel an zellulärer und humoraler Immunantwort nach hämorrhagischem Schock darstellen¹⁶⁶. Viele klinische und experimentelle Studien weisen eine unterdrückte zelluläre Immunantwort nach Trauma und Blutverlust nach^{8,67,80,183}. Dabei zeigen sich Makrophagenzell dysfunktionen in Form von supprimierter MHC Klasse II (Ia) Expression und der Fähigkeit zur Antigenpräsentation nach Trauma und Blutverlust^{17,19,47,59,61,67,133,138,158,171}. Dies resultiert in einer vermehrten Anfälligkeit für infektiöse Komplikationen und Sepsis mit resultierender erhöhter Sterblichkeit^{42,45}.

Die Aktivierung und Initiierung des humoralen und zellvermittelten, *i.e.* spezifischen und unspezifischen Immunsystems findet ihren Ursprung darin, dass T-Helferzellen Antigene von Antigenpräsentierenden Zellen *via Major Histocompatibility* Komplex Klasse II (Ia) präsentiert bekommen^{115,152,164}. Die Antigenpräsentationsfähigkeit ist mit der T-Zellantwort auf exogene Noxen assoziiert^{86,164} und zeigt sich darin, dass eine unterdrückte Antigenpräsentationsfähigkeit mit einer vermehrten Anfälligkeit für infektiöse Komplikationen und erhöhter Sterblichkeit einhergeht^{67,100,171}. Die quantitative Variation in der Ia Antigenexpression spielt damit eine Hauptrolle in der Regulation der Immunantwort^{86,164} und ein Mangel der MHC Klasse II (Ia) Expressionsfähigkeit führt zu schwerer Immundefizienz¹⁰³.

Die Neutrophileninfiltration ist eine wichtige Ursache für Membranschäden, die Entwicklung interstitieller Ödeme und Entzündungsreaktionen in der Genese eines Organversagens¹⁰⁷. Damit stellen Neutrophile einen Schlüsselmediator bei Organschäden im Schockgeschehen dar^{34,84,91,113,132,146}. Hypoperfusion des Splanchnikusgebietes führt zur

Freisetzung bioaktiver Stoffe, die zirkulierende Neutrophile zu einer erhöhten Zytotoxizität vorbereiten^{26,116,117}, indem Lymphe aus den Bauchorganen, speziell dem Darm, die zirkulierenden Neutrophilen aktiviert^{75,182}. Diese gesteigerte Aktivität der neutrophilen Granulozyten zeigt sich in einer gesteigerten Radikalbildung nach hämorrhagischem Schock¹⁸².

Zahlreiche klinische und experimentelle Studien deuten darauf hin, dass Sexualhormone eine zentrale Rolle in der Immunantwort unter physiologischen, als auch pathophysiologischen Gegebenheiten einnehmen^{5,51,78,160,175,178}. Ferner schließen vergangene Studien sowohl auf Geschlechtsunterschiede in der humoralen, als auch der zellulären Immunantwort^{29,38,108,127} und der Anfälligkeit und Sterblichkeit für und von Sepsis^{29,38,108,185}. Daher sollen in dieser Arbeit zwei Pathomechanismen unter dem Gesichtspunkt des Einflusses von männlichen Sexualhormonen subsumiert werden, die zu deletären Folgen für den Organismus führen: eine gesteigerte Inflammation, in Form einer Neutrophileninfiltration, gekoppelt mit einer Makrophagen-Suppression.

Es wird gezeigt, dass männliches Geschlecht mit einer unterdrückten zellulären Immunantwort^{5,6} und einer erhöhten Inzidenz septischer Komplikationen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock assoziiert ist^{29,56,58,108}. In dieser Hinsicht führt Kastration männlicher Mäuse vor traumatisch-hämorrhagischem Schock, oder die Verabreichung von Flutamid, einem selektivem Testosteronrezeptorblocker, zur Wiederherstellung der unterdrückten Zytokinsekretionsfähigkeit von Makrophagen^{13,14} und erhöht die Überlebensrate einer nachfolgend induzierten Sepsis^{13,174}. Des Weiteren führt die Verabreichung von DHT an weibliche Mäuse zu einer unterdrückten Immunantwort von PM ϕ und SM ϕ nach traumatisch-hämorrhagischem Schock, die mit der in männlichen Mäusen vergleichbar ist^{5,6}.

Da Kastration positive Effekte auf Milz- und Peritonealmakrophagen nach hämorrhagischem Schock zeigt, stellten wir die Hypothese, dass Androgenausschaltung durch Kastration vor traumatisch-hämorrhagischem Schock zu einer Wiederherstellung der supprimierten MHC Klasse II Expression führt und die überschießende Neutrophileninfiltration bremst.

Daher war das Ziel dieser Studie festzustellen, ob Kastration, durch Beseitigung männlicher Sexualhormone, vor traumatisch-hämorrhagischem Schock, zu positiven Effekten, auf die Expression von MHC Klasse II bei PM ϕ und SM ϕ und verringerter Neutrophileninfiltration in Leber und Lunge führt.

5.2 Relevanzen des verwendeten Tiermodells und der bestimmten Parameter

Die tierexperimentellen Studien, die den Effekt von Schock und Trauma auf das Immunsystem untersuchen, verwenden größtenteils Mäusemodelle. Die hohen Kosten für Großtiermodelle sowie der Mangel an Antikörpern und spezifischen immunologischen Tests schränken die Verwendung von Großtieren ein¹³⁷. C3H/HeN Mäuse werden für die Experimente benutzt, da diese über eine ausgewogene Th1-Th2 Immunantwort verfügen und demnach dem Immunsystem des Menschen ähnlich erscheinen^{16,66}. Das verwendete traumatisch-hämorrhagische Schockmodell ist etabliert und ermöglicht eine kontrollierte Blutdruckreduktion. Weiterhin erlaubt es eine adäquate Flüssigkeitsresubstitution über die implantierten Katheter⁴². Das Modell ist mit keiner Mortalität verbunden⁴².

Bei dem verwendeten Modell des experimentellen Schocks kommt es zu einer Immunsuppression, durch z.B. verringerte MHC Klasse II Expression^{18,21,33,44,158} und dies führt zu einer erhöhten Sterblichkeit nach induzierter polymikrobieller Sepsis⁴². Auch in klinischen Studien zeigt sich eine unterdrückte Immunantwort mit einer erhöhten Anfälligkeit /Inzidenz für septische Komplikationen nach Trauma und Blutverlust^{22,52,53}. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das verwendete Schockmodell die gleichen pathophysiologischen Abläufe wie in klinischen Studien hervorruft. Dies verdeutlicht die Relevanz des verwendeten traumatisch-hämorrhagischem Schockmodells zur Untersuchung grundlegender Mechanismen^{52,53}.

Bei der chirurgischen Kastration männlicher Mäuse zeigt sich in vorangegangenen Studien, dass zwei Wochen nach Kastration die Testosteronplasmaspiegel signifikant verringert sind^{6,11,123,175}. Diese Reduktion der Testosteronplasmaspiegel von kastrierten Mäusen, im Vergleich zu unkastrierten, ist in allen Studien vergleichbar^{6,11,123,175} und zeigt, dass Kastration zwei Wochen vor dem Experiment ein adäquates Modell für die Testosteronausschaltung darstellt.

Frühere Untersuchungen der auf selbige Weisen gewonnenen Peritoneal- und Milzmakrophagen zeigen, dass 90% der adhären PM ϕ und SM ϕ eine positive Anfärbbarkeit für einen Mausmakrophagenmarker und eine typische Makrophagenmorphologie aufweisen¹⁸. Diese Modelle der Makrophagengewinnungen aus dem Peritoneum und der Milz sind seit Jahren etabliert. Der in dieser Arbeit verwendete Makrophagenmarker, i.e. CD11b (MAC-1) bestätigt dies, da er in allen Studiengruppen zu gleicher Höhe exprimiert ist. Der Prozentsatz CD11b-positiver Zellen ist unbeeinflusst von Kastration, oder traumatisch-hämorrhagischem Schock. Die quantitative Ausprägung der

CD11b Expression, sowohl auf PM ϕ , als auch auf SM ϕ , ist mit früheren Studien komplementär¹⁵⁴. Des Weiteren ist der Aktivierungsstatus der untersuchten Makrophagen in allen Experimentalgruppen gleich, wie der Prozentsatz der CD11b-Expression belegt^{154,155}. Der unterschiedliche Prozentsatz der CD11b-Expression auf den PM ϕ und SM ϕ liegt nicht an der Unreinheit der gewonnen Zellsuspensionen. Die beobachteten, differenten CD11b-Expressionen auf PM ϕ und SM ϕ erhalten ihren Ursprung aus den verschiedenen Kompartimenten, aus denen die Makrophagen gewonnen wurden. Auch Springer *et al.* weißt eine CD11b Expression von 8 % auf SM ϕ und 60 % bei PM ϕ nach¹⁵⁴. Welche Faktoren innerhalb dieser Kompartimente die Expression beeinflussen ist jedoch unbekannt. In Hinblick der Möglichkeit, dass die beobachtete Suppression der MHC Klasse II (Ia) Expression nach traumatisch-hämorrhagischem Schock aus der veränderten Anzahl, oder der Lebensfähigkeit der Makrophagen aus dem Peritoneum oder der Milz herrührt, muss darauf hingewiesen werden, dass hämorrhagischer Schock *per se*, zu keinerlei Veränderungen in Anzahl oder Lebensfähigkeit von PM ϕ und SM ϕ , die aus solchen Tieren gewonnen werden, führt¹⁸.

Die Expression der *Major Histocompatibility* Komplex Klasse II (Ia) wurde mit einem Antikörper gegen dieses Oberflächenmolekül direkt mittels Flowzytometrie detektiert. MHC II ist auf dem Ia Komplex genetisch enkodiert^{142,149,164}. Unspezifische Bindungen und Autofluoreszenzen wurden durch Blockade des Fc-Fragmentes und baugleichem Kontrollantikörper (Isotyp) minimiert und zwar sowohl bei der MHC Klasse II (Ia) Expression, als auch der CD11b Expression. Zur Bestimmung der adäquaten Antikörpervolumen wurden Verdünnungsreihen im Bereich der Sättigungscharakteristik ermittelt und die ermittelten Antikörpervolumina zur abschließenden Messung verwendet. Die verwendete Fixation mit Paraformaldehyd denaturierte die MHC Klasse II (Ia) Moleküle auf der Oberfläche nicht¹⁶⁶ und sollte damit als Einfluss nehmende Störgröße bei der MHC Klasse II (Ia) Expression ausscheiden.

Dies weist darauf hin, dass der Verlust an MHC II (Ia) positiven PM ϕ und SM ϕ nach traumatisch-hämorrhagischem Schock, in der Suppression der Gesamt-Ia-Expression der Zellen selbst begründet ist.

Da allerdings auch andere Antigenpräsentierende Zellen, wie z.B. Dendritische Zellen, die Fähigkeit an Kulturplatten adhären zu können besitzen, sind diese in der untersuchten Zellsuspension möglicherweise enthalten und auch nicht mit dem verwendeten Makrophagenmarker zu demaskieren, da die Expression der CD11b Struktur auch auf Dendritischen Zellen zu finden ist. Nachdem Dendritische Zellen die Fähigkeit zur MHC

Klasse II Expression besitzen, könnten die beobachteten MHC Klasse II (Ia) Differenzen der einzelnen Versuchsgruppen ihren Ursprung auch auf eben selbigen Zellen darin haben, oder gar deren unterschiedlicher Anzahl selbst. Dies müsste weiter untersucht werden durch die Verwendung von zusätzlichen Antikörpern, die Oberflächenmarker auf Dendritischen Zellen, z.B. CD11c, detektieren.

5.3 Einfluss von Testosteron auf die Neutrophileninfiltration

Bei Kontrolltieren (ohne Trauma und Blutverlust) führt Kastration, im Vergleich zu unbehandelten, männlichen Tieren, zu keiner Veränderung der Granulozyten-Myeloperoxidaseaktivität, als Index für die Gewebeeinfiltration von neutrophilen Granulozyten, im Lungen- und Lebergewebe bei der Kontrolloperation. Dies bestätigt sich auch in den histologischen Schnitten der Lunge und der Leber.

Bei männlichen, scheinkastrierten Tieren ist die Myeloperoxidaseaktivität im Lungen- und Lebergewebe nach traumatisch-hämorrhagischem Schock im Vergleich zur Kontrollgruppe männlicher, scheinkastrierter Mäuse erhöht, allerdings nicht signifikant. In den histologischen Schnitten der Lunge und Leber ist dieser Anstieg durch die durchschnittlich ermittelte Granulozytenzahl signifikant. Jedoch liegt im Lebergewebe keine Normalverteilung vor.

Vorherige Kastration hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Anstieg der Myeloperoxidaseaktivität im Lungen- und Lebergewebe nach traumatisch-hämorrhagischem Schock. In den feingeweblichen Schnitten der Lunge und Leber ist dieser Anstieg signifikant. Im Lebergewebe kann keine Normalverteilung verzeichnet werden. Allerdings erscheint die Granulozyteninfiltration in Lunge und Leber nicht in dem Masse ausgeprägt zu sein, wenn die Tiere vor Trauma und Blutverlust kastriert wurden, wie dies in unbehandelten, männlichen Mäusen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock festgestellt wird. Möglicherweise würden sich hier Unterschiede zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt zeigen. Dies muss jedoch erst in weiterführenden Studien untersucht werden.

Über den Einfluss von Sexualhormonen auf neutrophile Granulozyten selbst ist wenig bekannt. Testosteron hat keine messbaren Effekte auf die Chemotaxis polymorphkerniger Leukozyten (PMN) ¹¹². Dabei muss erwähnt werden, dass PMNs, die mit männlichen Sexualhormonen behandelt werden, dabei über ein grundlegend höheres Maß an Chemotaxis, allerdings nicht signifikant, verfügen, als die PMNs, die mit weiblichen

Hormonen behandelt werden¹¹². Maroni *et al.* und Clark *et al.* zeigen, dass die chemotaktische Aktivität von Neutrophilen *in vitro* durch Spermatozoen und Seminalflüssigkeit in Anwesenheit von Serum und Plasma gegeben ist und *Intrinsic*-Faktoren für die Neutrophilenakkumulation hormonell reguliert sind^{48,105,106}. Auf der Ebene der Rezeptoren ergibt sich, dass Testosteron die TNF- α induzierte E-Selektin und VCAM-1 (*vascular adhesion molecule*) Expression in Endothelzellen beeinflusst¹⁸⁶, welche eine wichtige Rolle in der Endothel-Leukozyten Interaktion spielen²³.

Eine hormonelle Kontrolle der Neutrophilenchemotaxis kann bei weiblichen Sexualhormonen gemacht werden⁸⁷. Dabei zeigt sich eine unterschiedliche chemotaktische Aktivität von Neutrophilen, die vom weiblichen Sexualzyklus abhängig ist⁸⁷. Östrogene selbst führen bei experimenteller Coronarischämie zu einer verringerten ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule*) Expression im Myokard¹⁵⁶ und führt zu einer verringerten Neutrophilenakkumulation^{30,55}.

5.4 Einfluss von Testosteron auf die MHC Klasse II Expression

Nach Trauma und/oder schwerem Blutverlust zeigen männliche Patienten, im Vergleich zu weiblichen Patientinnen, eine erhöhte Inzidenz für das Auftreten bakterieller Komplikationen in Form von Infektionen¹⁰⁸, Sepsis und MOF¹²⁴ und in Folge dessen eine erhöhte Mortalität^{29,148}. So zeigt die Analyse von vier Sepsisstudien durch Bone eine erhöhte Mortalität männlicher Patienten bei manifester Sepsis im Vergleich zu Patientinnen²⁹. Schroder *et al.* konnte demonstrieren, dass nach dem Auftreten einer abdominalen Sepsis bei chirurgischen Patienten Männer eine geringere Überlebensrate (31%) im Vergleich zu Frauen (74%) aufweisen¹⁴⁸.

Offner *et al.* zeigt, dass das männliche Geschlecht einen unabhängigen Risikofaktor für schwere Infektionen bei chirurgischen Patienten darstellt¹²⁵. Außerdem kann eine signifikante Reduktion in der Anzahl weiblicher Patientinnen, die nach großen chirurgischen Eingriffen einen Intensivaufenthalt benötigen, im Vergleich zu männlichen Patienten unter diesen Bedingungen beobachtet werden¹⁷⁶. Ebenso zeigt sich im Vergleich zu den männlichen Patienten bei den weiblichen Patientinnen eine signifikante Reduktion septischer Komplikationen¹⁷⁶.

In Tierexperimentellen Studien ist das männliche Geschlecht mit einer unterdrückten zellulären Immunantwort nach Trauma und Blutverlust assoziiert^{5,6}. Männliche Sexualhormone sind für diese Immunsuppression verantwortlich^{5,6}. So führt Kastration männlicher Mäuse, oder die Verabreichung von Flutamid, einem selektivem Testosteronrezeptorblocker, nach traumatisch-hämorrhagischem Schock zur Wiederherstellung der unterdrückten T-Zellfunktion und der Makrophagenfunktion verschiedener Kompartimente^{10,13,14,77,175}. Dies stimuliert die zellvermittelte Immunantwort⁷⁷ und erhöht die Überlebensrate einer nachfolgend induzierten Sepsis^{13,174}. Kastration männlicher Mäuse zwei Wochen vor Trauma und Blutverlust generiert eine verbesserte Zytokinfreisetzung von PM ϕ und SM ϕ nach Trauma und Blutverlust^{10,11}. Die Verabreichung physiologischer Mengen DHT an kastrierte Mäuse bedingt eine unterdrückte proinflammatorische Zytokinfreisetzung von PM ϕ und SM ϕ (IL-1, IL-6, TNF- α nach LPS-Stimulation in vitro)^{10,11}. Gleiche Veränderungen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock und Verabreichung physiologischer Mengen DHT an kastrierte Mäuse werden bei der Th1-Zytokinfreisetzung, IL-2, IFN- γ , bei T-Zellen beobachtet¹⁰. Ferner kann gezeigt werden, dass männliche Mäuse, oder mit Testosteron behandelte weibliche Mäuse, eine im Vergleich zu kastrierten Mäusen verringerte Antigenpräsentationsfähigkeit besitzen¹⁷². Immunsuppressive Effekte von männlichen Sexualhormonen können auch nach Infektion und Brandverletzung aufgezeigt werden^{92,93,110}, ebenso nach Infektion und Kreislaufstörungen^{70,179}. Die Verringerung der Testosteron-Plasmaspiegel durch Kastration erhöht dabei die Resistenz männlicher Mäuse gegenüber *Toxoplasma gondii* Infektionen^{92,93}. Die medikamentöse Kastration von männlichen Mäusen durch den Testosteronrezeptorblocker Flutamid normalisiert die unterdrückte Milzlymphozytenfunktion nach vorangegangener Brandverletzung im Mausmodell¹¹⁰. Die Ergebnisse der gegenwärtigen Studie zeigen eine unterdrückte MHC Klasse II (Ia) Expression auf PM ϕ und SM ϕ bei männlichen Mäusen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen, die eine supprimierte MHC Klasse II (Ia) Expression auf Makrophagen verschiedener Kompartimente nachweisen können^{18,19,61,158,171}. Es zeigt sich bei PM ϕ scheinkastrierter Tiere eine Reduktion der MHC Klasse II (Ia) Expression von 38,7% nach traumatisch-hämorrhagischem Schock im Vergleich zur Kontrolloperation. Bei den SM ϕ der scheinkastrierten Tiere führt Trauma und Blutverlust zu einer Reduktion der MHC Klasse II (Ia) Expression von 19,9% im Vergleich zu Kontrolloperierten Tieren. Des Weiteren, wie aus den Ergebnissen ersichtlich ist, beeinflusst Kastration an sich nicht die MHC II (Ia) Expression auf PM ϕ und SM ϕ in

Kontrolloperierten Tieren. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass Kastration zu einer Normalisierung der unterdrückten MHC Klasse II (Ia) Expression auf PM ϕ und SM ϕ nach Trauma und Blutverlust führt. Dabei erhalten die gegenwärtigen Ergebnisse Unterstützung von den Beobachtungen von Weinstein *et al.*, die *in vitro* eine effizientere Lymphozytenantwort auf aktivierte Mausmakrophagen bei weiblichen Mäusen, im Vergleich zu denen von männlichen Mäusen, nachweisen¹⁷². Dabei führt Kastration männlicher Mäuse, wenn in dieser Studie auch kein Schock induziert wurde, zu einer verbesserten, oder die Behandlung weiblicher Mäuse mit Testosteron, zu einer verringerten Effektivität der Antigenpräsentationsfähigkeit der stimulierten Makrophagen¹⁷².

Die Messung der MHC Klasse II Expression erfolgte in der gegenwärtigen Studie vier Stunden nach traumatisch-hämorrhagischem Schock. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass der positive Effekt der Kastration nach traumatisch-hämorrhagischem Schock auf die MHC Klasse II (Ia) Expression von PM ϕ und SM ϕ für längere Zeit anhält. So konnte gezeigt werden, dass die selektive Testosteronblockade mittels eines spezifischen Rezeptorblockers, das Überleben einer Sepsis, die 48 Stunden nach traumatisch-hämorrhagischem Schocks induziert wird, signifikant im Vergleich zu männlichen Mäusen verbessert wird¹³. Diese Hypothese wird gestützt durch Studien von Ayala *et al.*, die eine unterdrückte Antigenpräsentationsfähigkeit bei PM ϕ und SM ϕ nach hämorrhagischem Schock für mindestens 120 Stunden aufzeigen¹⁸. Ferner stellen Wakefield *et al.* heraus, dass der Prozentsatz HLA-DR positiver Monozyten nach elektiver großer Resektionschirurgie für fünf Tage signifikant unterdrückt ist und bei Patienten ohne septische Komplikationen signifikant höher liegt, als bei diesen mit Sepsis¹⁷¹.

Der Unterschied in den jeweiligen Experimentalgruppen in den absoluten Zahlen der positiv auf MHC II (Ia) Expression detektierten PM ϕ und SM ϕ erscheint nicht so gravierend zu sein, aber es muss herausgestellt werden, dass die exprimierten Antigen-Ia Komplexe eine kritische Schwelle überschreiten müssen, um zu einer T-Zell Aktivierung zu führen⁸⁶. Die Dichte der Klasse II Moleküle auf der Oberfläche der Monozyten kann den Grad der Immunantwort einer einzelnen, speziell den der T-Zell Antwort verändern^{86,135}.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine MHC II (Ia) Expression von im Durchschnitt 35 % auf SM ϕ . SM ϕ *in vivo* hingegen exprimieren bis zu 75%¹⁶⁵. Diese Differenz könnte darauf zurück zu führen sein, dass die Expression von MHC II (Ia) auf SM ϕ unter Kulturbedingungen schnell abnimmt¹⁶⁵. Vergleichbar zu den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit, weisen Ayala *et al.*, die ein vergleichbares Modell verwenden, eine MHC Klasse II (Ia) Expression auf SM ϕ nach, die mit unseren einher geht¹⁸. Auch die Höhe der

MHC Klasse II (Ia) Expression der PM ϕ in den Studien von Ertel *et al.* sind mit meinen Beobachtungen konform⁵⁹. Allerdings stellen die Tiere beider vorgenannter Autoren Kontrolltiere dar und werden keiner Kastration, oder Scheinkastration unterzogen.

Es muss jedoch auf Grund der Vollständigkeit erwähnt werden, dass in dieser Arbeit keine völlig unbehandelten, männlichen Tiere verwendet wurden. Dies könnte zu der Überlegung führen, dass Scheinkastration selbst, die MHC Klasse II (Ia) Expression auf PM ϕ und SM ϕ beeinflusst. Allerdings ist die beobachtete MHC II (Ia) Expression genannter Makrophagen scheinkastrierter Mäuse identisch zu der von männlichen, unbehandelten Tieren in den bereits erwähnten Studien^{18,59}. Dies verdeutlicht, dass Scheinkastration zwei Wochen vor den Experimenten, die MHC Klasse II (Ia) Expression auf PM ϕ und SM ϕ nicht beeinflusst. Es ist ferner augenscheinlich, dass die Unterdrückung der MHC Klasse II (Ia) Expression durch PM ϕ und SM ϕ auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Während in den Histogrammen bei den SM ϕ ein Intensitätsmaximum beobachtet wird, das nach traumatisch-hämorrhagischem Schock bei scheinkastrierten Tieren nach links verschoben ist, können bei PM ϕ zwei verschiedene Intensitätsmaxima ausgemacht werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass die untersuchten Makrophagen aus unterschiedlichen Kompartimenten stammen, *i.e.* Milz und Peritoneum. So haben Makrophagen aus der Milz direkten Kontakt zu Lymphozyten, wohingegen dieser Kontakt bei Peritonealmakrophagen nicht gegeben ist. Es wird auch festgestellt, dass in der Mäusemilz auf Grund Ihrer unterschiedlichen Aufnahmefähigkeit und Höhe der MHC Klasse II Expression mindestens zweierlei Arten von „Makrophagen“ unterschieden werden können¹⁶⁸, welches sich auch im unterschiedlichen Sitz der Makrophagen (Lymphozytenscheide, bzw. rote Pulpa) dieser zeigt⁸⁵, jedoch könnten dies auch andere Antigenpräsentierende Zellen, wie z.B. Dendritische Zellen sein.

Die Studien von Ayala und Ertel *et al.* weisen nach, dass es nach hämorrhagischem Schock zur Suppression der MHC Klasse II Expression und Antigenpräsentationsfähigkeit auf PM ϕ und SM ϕ kommt^{18,19,59,64}. In der gegenwärtigen Studie wurde die Antigenpräsentation selbst nicht untersucht. Allerdings ist bekannt, dass die MHC Klasse II (Ia) Expression mit der Fähigkeit von Makrophagen Antigene zu präsentieren, direkt korreliert¹⁸. In dieser Hinsicht können Ayala *et al.* zeigen, dass die verringerte Fähigkeit von PM ϕ und SM ϕ nach traumatisch-hämorrhagischem Schock Antigen zu präsentieren, mit einer supprimierten MHC Klasse II (Ia) Expression assoziiert ist¹⁸. Daraus kann gefolgert werden, dass Kastration vor Trauma und Blutverlust mit einer Normalisierung der beobachteten Suppression der Antigenpräsentationsfähigkeit von Makrophagen männlicher

Mäuse vergesellschaftet sein könnte. Dies müsste aber in weiterführenden Studien untersucht werden.

Auch in klinischen Studien ist eine verringerte MHC Klasse II Expression beobachtet worden, die mit einer erhöhten Anfälligkeit für infektiöse Komplikationen und einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert ist ^{67,100,171}. Die Reduktion zirkulierender HLA-DR positiver Monozyten kann auch nach schwerem Trauma ^{67,82,100,133}, schweren Verletzungen ^{46,47,67,133} und Brandverletzung ⁷⁴ bei Patienten in zahlreichen Studien nachgewiesen werden. Wakefield *et al.* kann zeigen, dass der Prozentsatz HLA-DR positiver sowohl bei Monozyten, als auch bei T-Zellen nach elektiver großer Resektionschirurgie signifikant unterdrückt ist und in Patienten ohne Sepsis signifikant höher, als in diesen mit septischen Komplikationen ist ¹⁷¹. Bei septischen Schockpatienten zeigt sich auch eine verringerte mRNA Expression der MHC Klasse II Gene ¹²⁸.

Diese Studien verdeutlichen zusammen die außerordentliche Wichtigkeit der MHC Klasse II Expression für eine adäquate Immunantwort und deren Unterdrückung sowohl bei Patienten, als auch in experimentellen Studien nach Trauma und Blutverlust.

5.5 Mögliche Mechanismen der Wirkungen von männlichen Sexualhormonen auf die MHC Klasse II Expression

Eine Vielzahl von Studien weisen auf eine normalisierte Zytokinfreisetzung männlicher Mäuse unter dem Einfluss von immunmodulierenden Substanzen hin, welche zu einer Überlebenssteigerung bei traumatisch-hämorrhagischem Schock nach induzierter Sepsis führt ^{41,62,63,65,109}. Es geben sich eindeutige Hinweise darauf, dass 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) für die unterdrückte, systemische Immunantwort in männlichen Mäusen nach schwerem Blutverlust verantwortlich ist ⁵⁻⁷. DHT Beseitigung führt dabei zu einer verbesserten T-Zell- und Makrophagenfunktion verschiedener Kompartimente ^{10,14,77,175} und einer gesteigerten Überlebensrate nach induzierter schwerer Sepsis in diesem Modell ^{13,174}. Die in meinem Modell verwendete chirurgische Kastration der männlichen Mäuse, zeigt in vorangegangenen Studien, dass zwei Wochen nach Kastration, die Testosteron Plasmaspiegel, im Vergleich zu den physiologischen Plasma-DHT-Spiegeln in normalen männlichen Mäusen, signifikant verringert sind ^{6,11,175}. Weitere Studien können zeigen, dass die Verabreichung von DHT an kastrierte Mäuse zu erneuter Immunsuppression führt und unterstreichen die Relevanz von Testosteron in Bezug auf den Mangel der Fähigkeit zur

Immunantwort in männlichen Mäusen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock^{10,11}. Vergleichbare Ergebnisse können für den Signaltransduktionsweg p38 nachgewiesen werden¹². Während p38 in unbehandelten männlichen Tieren aktiviert ist, zeigt sich keine Veränderung der Aktivität bei kastrierten männlichen Tieren nach traumatisch-hämorrhagischem Schock¹². Zusatz von DHT zu kastrierten Tieren resultiert erneut in einer vermehrten Aktivität¹². Des Weiteren erhöht eine Kastration männlicher ungeschockter Mäuse die Fähigkeit von Makrophagen zur Antigenpräsentation, wohingegen die Verabreichung von DHT an weibliche ungeschockte Mäuse zu einer verringerten Antigenpräsentation führt¹⁷².

Dies könnte zur Vermutung führen, dass Testosteron für die in dieser Arbeit beobachtete Suppression der MHC Klasse II (Ia) Expression auf PM ϕ und SM ϕ verantwortlich ist. Um diese Fragestellung endgültig klären zu können, müssten in weiterführenden Studien kastrierten Mäusen physiologische Mengen 5 α -DHT verabreicht werden, damit direkt die Wirkung von Testosteron belegt wäre.

Kastration der Tiere hat keinerlei Auswirkungen auf die MHC Klasse II (Ia) Expression von PM ϕ und SM ϕ nach Kontrolloperation. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits in PM ϕ , SM ϕ und Kupffer-Zellen nachgewiesen werden^{11,175}. Auch hier zeigte sich eine Wiederherstellung der unterdrückten Zytokinsekretionsfähigkeit nach Trauma und hämorrhagischem Schock durch vorherige Kastration der Tiere, wohingegen kein Einfluss der Kastration auf die zellvermittelte Immunität nach Kontrolloperation gefunden wurde^{11,175}. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass physiologische Plasmaspiegel von DHT nur im immunologisch kompromittiertem Organismus (z.B. schwerer Blutverlust, Trauma oder Verbrennung) schädliche Auswirkungen haben, nicht aber unter normalen Bedingungen. Eine mögliche Erklärung findet sich in neueren Studien von Schneider *et al.* und Samy *et al.*, die in diesem Zusammenhang erst kürzlich zeigen können, dass der intrazelluläre Steroidmetabolismus von DHT nach traumatisch-hämorrhagischem Schock verändert ist^{143,147,187}. In diesen Studien findet sich in Lymphozyten und Milzmakrophagen männlicher Mäuse nach Trauma und schwerem Blutverlust eine erhöhte intrazelluläre Syntheserate von DHT bei gleichzeitig verringertem Abbau dieses Steroidhormons^{143,187}. Im Einzelnen scheint die Aktivität der an dem DHT-Metabolismus beteiligten Enzyme verändert zu sein. So kann nach Trauma und hämorrhagischem Schock eine erhöhte Aktivität der DHT bildenden 5 α -Reduktase nachgewiesen werden, wohingegen die Aktivität der das DHT abbauenden 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase vermindert ist^{143,187}. Des Weiteren führt Trauma und Blutverlust selbst nicht zu Veränderungen der

Plasmaspiegel der Sexualhormone ¹⁰. Die Bedeutung der Aktivität von Enzymen der Steroidsynthese für die Immunreaktion nach traumatisch-hämorrhagischem Schock wird durch die immunprotektiven Effekte von 4-Hydroxyandrostenedion, einem Blocker der 5 α -Reduktase, weiter verdeutlicht ¹⁴⁷. Eine Aktivitätszunahme der 5 α -Reduktase führt zu einer erhöhten Synthese des Steroidhormons DHT ¹⁴³, welches aus Umwandlung aus Testosteron entsteht. Eine Hemmung der 5 α -Reduktase führt zu einer normalisierten zellulären Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock ¹⁴⁷. Zusätzlich scheinen direkte Effekte von Testosteron auf Immunzellen zu bestehen. So können Androgenrezeptoren auf verschiedenartigen Immunzellen, z.B. Lymphozyten, Thymozyten, Makrophagen ^{50,127,170}, Rezeptoren für männliche Sexualhormone auf makrophagenähnlichen Zellen wie Synovialzellen, unreifen Monozyten, als auch T- und B-Zellen nachgewiesen werden ¹²⁷. Ferner wird beobachtet, dass Kastration, oder die Verabreichung von Flutamid, einem selektiven Testosteronrezeptorblocker, zu einer Zunahme der Östrogenrezeptorexpression auf T-Zellen führt ^{28,144}. Durch eine Veränderung der Rezeptordichte, bzw. -verteilung, oder deren Bindungsaktivität durch traumatisch-hämorrhagischen Schock könnte zusätzlich als potentielle Erklärung für die unterschiedlichen Effekte von Testosteron in geschockten gegenüber Kontrolltieren herangezogen werden.

Männliche Sexualhormone besitzen auch Einfluss auf die Herz- und Kreislauffunktion nach traumatisch hämorrhagischem Schock, da sich zeigt, dass Kastration männlicher Ratten vor traumatisch-hämorrhagischem Schock, oder die Gabe des selektiven Testosteronblockers Flutamid während der Flüssigkeitssubstitution, die Organhypoxie, die entscheidend zur Auslösung der pathophysiologischen Veränderungen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock beiträgt ^{42,43}, verhindert, indem die Unterdrückung der Herz- Kreislauffunktionen beseitigt wird ^{139,140}. Diese Beobachtung könnte ebenfalls an der geschlechtsspezifischen Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock beteiligt sein.

Obwohl in dieser Studie lediglich PM ϕ und SM ϕ untersucht wurden, kann postuliert werden, dass die unterdrückte MHC II Expression auch auf Kupffer-Zellen normalisiert wird. Diese Hypothese stützt sich auf die Beobachtung, dass Kastration zu einer Normalisierung der Zytokinsekretion nach Schock führt ^{10,11,175}.

Die gesteigerte MHC Klasse II (Ia) Expression bei PM ϕ und SM ϕ kastrierter Tiere nach traumatisch-hämorrhagischem Schock könnte verursacht sein durch eine Normalisierung der unterdrückten Zytokinsekretion von Makrophagen (IL-1, IL-6, oder TNF- α) ^{10,11}.

Dabei ist IL-1 für eine funktionstüchtige Makrophagen-T-Zell-Interaktion erforderlich und ist für die Präsentationprozessierter Antigene durch Makrophagen über die MHC Klasse II (Ia) Expression an T-Helfer-Zelle wichtig¹⁶⁶.

Studien von Mitzutani *et al.* zeigen, dass IL-6 stimulatorische Effekte auf die Antigen-spezifische-D10.G4.1-Proliferation hat, welches als Nachweis für eine erhöhte Antigenpräsentationsfähigkeit durch Makrophagen unter IL-6 Einfluss gesehen werden kann¹¹⁴. Garman *et al.* spricht dabei IL-6 ebenso kostimulatorische Effekte auf die T-Zell-Proliferation, wie IL-1 zu⁷³.

TNF- α wird ebensolche, kostimulatorische Effekte auf die T-Zell-Proliferation, wie IL-1 nachgewiesen¹³⁶. Die unter DHT-Verabreichung zu beobachtende Unterdrückung der TNF- α Freisetzung von PM ϕ und SM ϕ bei kastrierten, oder bei unbehandelten männlichen Mäusen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock^{10,11}, könnte als Erklärungsversuch für die beobachtete Wiederherstellung der MHC Klasse II (Ia) Expression durch Kastration nach traumatisch-hämorrhagischem Schock bei Mäusen herangezogen werden, da, im Gegensatz zu den deletären Effekten hoher Spiegel von zirkulierendem TNF, *in vitro* Studien stimulatorische Effekte von geringen Dosen TNF auf die Makrophagen Ia Expression zeigen⁴⁰ und ein Antikörper, der gegen TNF gerichtet ist, eine MHC Klasse II Suppression, wie sie nach hämorrhagischem Schock augenscheinlich wird, aufhebt⁶⁴. TNF- α erhöht die Expression von IL-1, IL-6 und TNF- α in Makrophagen und wirkt in hohen Dosen endokrin auf die IL-1 und IL-6 Ausschüttung. Hiermit findet ein *circulus vitiosus* statt, der oben genannten Sachverhalte weiter Unterstützung gibt und eine Wiederherstellung der MHC Klasse II (Ia) Expression auf PM ϕ und SM ϕ nach traumatisch-hämorrhagischem Schock bei kastrierten, männlichen Mäusen Plausibilität verleihen könnte.

Alternativ könnte eine Normalisierung der T-Zell-Funktion kastrierter Tiere nach Schock sich günstig auf die MHC II Expression auswirken¹⁰. So zeigt sich nach traumatisch-hämorrhagischem Schock bei kastrierten Mäusen, im Gegensatz zu männlichen Mäusen, oder im Gegensatz zu mit physiologischen Dosen von DHT behandelten kastrierten Mäusen, eine wiederhergestellte Th1-Zytokinfreisetzung, IL-2, IFN- γ , bei T-Zellen¹⁰.

Die Sekretion von Th₁ Zytokinen, insbesondere IFN- γ , steigert die Expression von MHC II auf Makrophagen^{18,37,63} und verbessert damit die Antigenpräsentation. So führt die Gabe von INF- γ *in vitro*¹⁸ und *in vivo*⁶³ zu einer merklich verbesserten/wiederhergestellten MHC Klasse II Antigenexpression auf Mausmakrophagen nach traumatisch-

hämorrhagischem Schock. Ebenso kann in klinischen Studien gezeigt werden, dass IFN- γ Gabe die HLA-DR Expression auf Monozyten bei schwer verletzten Patienten erhöht ⁸¹.

Außerdem führt eine Unterdrückung der Sekretion der Th1 Zytokine IL-2 und IFN- γ durch T-Helfer-(T_H-) Lymphozyten zu einer Hemmung der Antigenpräsentation ^{42,98}. Damit liegt der Schluss nahe, dass Kastration männlicher Mäuse vor dem Ereignis von Trauma und Blutverlust unter Umständen auch zu einer verbesserten Antigenpräsentation von PM ϕ und SM ϕ führen könnte, vor allem da es sich zeigt, dass die verminderte Fähigkeit von PM ϕ und SM ϕ männlicher Mäuse nach traumatisch-hämorrhagischem Schock Antigene zu präsentieren mit einem Mangel der MHC Klasse II (Ia) Expression korreliert ¹⁸.

5.6 Mögliche Mechanismen der Wirkungen von männlichen Sexualhormonen auf die Neutrophileninfiltration

Die Hyperinflammation nach Trauma und Schock ist ein Haupttrigger für die Immunsuppression. Dabei kommt es zur Initiation der Inflammation durch z.B. Neutrophileninfiltration. Die Adhärenz an das Endothel, die Migration in das extravaskuläre Interstitium, die Chemotaxis zum Ort eines entzündlichen Geschehens von polymorphkernigen Zellen (PMN) steht weiterhin im Fokus der Suche, die Hyperinflammation besser zu verstehen. Die Sequestration, bzw. die Transmigration aktivierter Granulozyten in das Gewebe ist unidirektional ³⁵ und die PMNs persistieren im Interstitium ¹⁵⁷. Nachdem sie nicht in die Gefäße zurückkehren können, müssen PMNs aus dem Gewebe entfernt werden. Das ist im Zuge der Inflammation besonders kritisch, in dem sie sich länger befinden. Da die Fähigkeit der Makrophagen PMNs abzubauen aktivierungsabhängig ist ¹²², fehlt unter Umständen die Makrophagenfunktion nach Trauma und Blutverlust zur PMNs Elimination und es wird das Entzündungsgeschehen weiter unterstützt. Die Studien von Ayala *et al.* zeigen auf, dass Neutrophile nach hämorrhagischem Schock vermehrt im Blut zirkulieren, vermehrt das Enzym der Myeloperoxidase und das Zytokin MIP-2 (ein Mauszytokin, das mit dem humanen IL-8 vergleichbar ist und von dem angenommen wird, es sei für die Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen verantwortlich ³²) exprimieren und über eine geringere Apoptoserate, neben einem gesteigerten oxidativen Potential verfügen ¹⁵. Der Mechanismus, der durch die Lymphe, speziell aus den Bauchorganen, nach Schock zum

Endothelzellschaden führt und/oder die Neutrophilen aktiviert, ist nicht bekannt. Allerdings wissen wir, dass der Darm eine große Anzahl von Faktoren freisetzt und produziert, die Endothelzellen und Neutrophile aktiviert, stört oder prägt. Das sind Zytokine wie TNF und IL-6^{36,54,79,163}, Radikale^{132,163}, Eikosanoide^{162,163}, *platelet-activating factor*^{90,119}, Komplementprodukte^{83,96} und Endotoxine¹²⁶. Bei männlichen Mäusen zeigt sich nach traumatisch-hämorrhagischem Schock eine unterdrückte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- α als Antwort auf LPS-Stimulation *in vitro*) bei PM ϕ und SM ϕ ^{10,11}. Bei kastrierten Mäusen lässt sich eine gesteigerte proinflammatorische Zytokinfreisetzung von PM ϕ und SM ϕ (IL-1, IL-6, TNF- α nach LPS-Stimulation *in vitro*) feststellen^{10,11}. Auch führt das Verabreichen physiologischer Mengen DHT an kastrierte Mäuse zu einer verringerten IL-1, IL-6 und TNF- α Zytokinausschüttung bei Peritoneal- und Milzmakrophagen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock¹¹. Besonders hervorzuheben ist, dass die genannten drei Zytokine, wenn sie gemeinsam wirken, ihre Effekte auf endokrinem Wege begehen. TNF, IL-1 und IL-6 führen zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*) auf vaskulären Endothelzellen und somit zu einer Umverteilung von neutrophilen Granulozyten in entzündlich verändertes Gewebe^{95,120,173,180}. Eine Neutrophilenadhärenz findet statt und führt über eine Radikalbildung zu reaktiven Sauerstoffmetaboliten⁵⁷. Diese reaktiven Sauerstoffmetabolite, die während der akuten Phase des Schocks gebildet werden, führen zu Leukozyten-Chemotaxis⁷⁶ und -adhäsion¹²⁹, möglicherweise über Komplementaktivierung¹⁵³, die Aufregulation der P Selektin Expression², ICAM-1 Expression⁹⁷, oder über die erhöhte Fähigkeit von ICAM-1 Neutrophile zu binden¹⁵⁰. IL-6 und TNF erhöhen die Phagozytosefähigkeit und die Superoxidproduktion der Neutrophilen bei Versuchsteilnehmern männlichen Geschlechts, ohne die CD18-Adhäsionsrezeptorexpression zu beeinflussen¹²⁰. Die für die Kontrolle des Gewebes Schadens wichtige Phagozytose der PMNs wird durch ihre Apoptose gefördert, die selbst keine Immunreaktion oder lokalen, zytotoxischen Effekte hervorruft²⁵. IL-6 zögert die Apoptose Neutrophiler hinaus²⁵, erhöht die zytotoxische Kapazität der PMNs^{24,120} und unterhält so das deletäre Gesamtgeschehen. Somit würde einiges dafür sprechen, dass männliche Mäuse einen Vorteil gegenüber ihren kastrierten Artgenossen nach Trauma und Blutverlust hätten. Eher das Gegenteil scheint der Fall zu sein. Ein möglicher Grund hierfür könnte daran liegen, dass TNF bei kastrierten Tieren nach Trauma und Blutverlust erhöht ist^{10,11} und damit teils gegenläufige Wirkungen induziert, indem die oben aufgeführten Nachteile für die kastrierten Versuchstiere aufgehoben werden könnten. TNF führt zu

gesteigerter Neutrophilenapoptose⁸⁹ und erhöht weiterhin Stickstoffmonoxid⁸⁹, welches ein wichtiger Modulator der Neutrophilenadhäsion⁹⁴ und der Neutrophilenprägung ist^{130,131}. So unterdrückt NO die Expression von Adhäsionsmolekülen, besonders P Selektin, aber auch ICAM-1 Expression von Endothelzellen^{27,99,102}, verringert damit die Neutrophilenakkumulation und –adhärenz an das Gefäßendothel^{71,99,101,102,121} und die Neutrophilenmigration¹⁶⁹.

Die Normalisierung der T-Zell-Funktion kastrierter Tiere nach Schock führt zu einer verbesserten Zytokinfreisetzung¹⁰. Es zeigt sich nach traumatisch-hämorrhagischem Schock bei kastrierten Mäusen, im Gegensatz zu männlichen Mäusen, oder im Gegensatz zu mit physiologischen Dosen von DHT behandelten kastrierten Mäusen, eine gesteigerte, wiederhergestellte Th1-Zytokinfreisetzung, IL-2, IFN- γ , bei T-Zellen¹⁰. IFN- γ führt zu einer Adhäsionsmolekülexpression auf vaskulären Endothelzellen und somit zu einer Umverteilung von neutrophilen Granulozyten in entzündlich verändertes Gewebe. Allerdings besitzt Kastration keinen Einfluss auf die Granulozyteninfiltration nach traumatisch-hämorrhagischem Schock. Dies bestätigt sich durch die Beobachtung, dass

Testosteron selbst keine signifikanten Effekte auf die Chemotaxis polymorphkerniger Leukozyten (PMN) hat¹¹². Dabei muss erwähnt werden, dass PMNs, die mit männlichen Sexualhormonen behandelt werden, dabei über ein grundlegend höheres, allerdings nicht signifikantes Maß an Chemotaxis verfügen, als die PMNs, die mit weiblichen Hormonen behandelt werden¹¹². Aber auf Rezeptorebene ergibt sich, dass Testosteron die TNF- α induzierte E-Selektin und VCAM-1 (*vascular adhesion molecule*) Expression in Endothelzellen erhöht¹⁸⁶, welche eine wichtige Rolle in der Endothel-Leukozyten Interaktion spielen²³.

5.7 Klinische Relevanz

Eine Reihe klinischer Studien zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für septische Komplikationen bei chirurgischen Patienten nach schwerem Blutverlust. Weiterhin kann in zahlreichen Studien nachgewiesen werden, dass die Verringerung von Androgenplasmaspiegeln durch Kastration oder die Verabreichung des selektiven Testosteronrezeptorblockers Flutamid die unterdrückte zellvermittelte Immunantwort nach

traumatisch-hämorrhagischem Schock wiederherstellt und die Anfälligkeit gegenüber einer nachfolgenden Sepsis verringert. Die vorliegenden Untersuchungen weiten diese Ergebnisse aus und zeigen, dass durch die Verringerung von Androgenplasmaspiegeln durch Kastration eine wiederhergestellte MHC Klasse II (Ia) Expression bewirkt werden kann. Nachdem Flutamid bei Patienten zur Behandlung des Prostatakarzinoms bereits klinisch eingesetzt wird, kann spekuliert werden, dass diese Studie dazu beiträgt, neuartige, klinisch relevante Therapiekonzepte unter Verwendung von Androgenrezeptorantagonisten zur Reduzierung der Rate septischer Komplikationen und dadurch der Mortalität nach Trauma, Blutverlust und operativen Eingriffen zu entwickeln.

6 Zusammenfassung

Traumatisch-hämorrhagischer Schock stellt in seiner Ausprägung einen immensen Eingriff für den biologischen Organismus dar. Verminderte Gewebepfusion führt zu verschiedenartigsten Veränderungen des geweblichen Metabolismus, der biologischen Textur und Funktion, sowohl auf systemischer, als auch auf zellulärer und subzellulärer Ebene.

Traumatisch-hämorrhagischer Schock führt zu schwerer Suppression der humoralen und zellulären Immunantwort, wie z.B. verminderter Zytokinsekretionsfähigkeit von Makrophagen und Lymphozyten, verminderter MHC Klasse II Expression, oder verminderter Antigenpräsentationsfähigkeit in männlichen Versuchstieren. Diese pathophysiologischen Veränderungen der Immunantwort sind mit einer erhöhten Anfälligkeit für infektiöse Komplikationen, Sepsis und letztendlich Letalität verbunden.

Nach Trauma und schwerem Blutverlust zeigen sich interessanterweise Geschlechtsunterschiede in der humoralen, als auch der zellulären Immunantwort, der Anfälligkeit und Sterblichkeit für und von Sepsis, dem Auftreten von MOF (*Multiple Organ Failure*) und letztendlich der Mortalität. Die divergenten Effekte männlicher und weiblicher Sexualhormonen spiegeln sich darin wieder, dass das männliche Patientenkollektiv nach Trauma und schwerem Blutverlust anfälliger für bakterielle Komplikationen in Form von Infektionen, Sepsis und MOF ist und in Folge dessen eine erhöhte Mortalität besitzt.

Es zeigt sich, dass männliche Sexualhormone für die beobachtete Benachteiligung des männlichen Geschlechts gegenüber dem weiblichen Geschlecht nach Trauma und Blutverlust unter diesen Umständen verantwortlich sind. So lässt sich in Tierexperimentellen Studien nachweisen, dass Kastration oder die Verabreichung eines selektiven Testosteronrezeptorblockers vor traumatisch-hämorrhagischem Schock, sowohl die unterdrückte Immunantwort/Zytokinsekretionsfähigkeit von Makrophagen, als auch von Lymphozyten, unterschiedlicher Kompartimente bei männlichen Mäusen behebt und mit einem verbesserten Überleben assoziiert ist.

Dies bestätigt sich in dieser Dissertationsarbeit, da sich eine Suppression der MHC Klasse II (Ia) Expression auf Peritoneal- und Milzmakrophagen bei männlichen Mäusen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock durch vorangegangene Kastration männlicher Mäuse beheben lässt.

Nachdem die MHC Klasse II für die Initiierung und Aufrechterhaltung der zellulären und humoralen Immunantwort entscheidend verantwortlich ist, legen die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit nahe, dass die temporäre Beseitigung der Testosteronwirkungen mittels eines spezifischen Testosteronrezeptorblockers in Form von z.B. Flutamid, welches seit langem bei Patienten mit Prostatakarzinom klinisch eingesetzt wird, als mögliches Therapiekonzept zur Reduktion septischer Komplikationen und der Mortalität für die klinische Anwendung einen hilfreichen und sinnvollen Ansatz, über einen in dieser Studie beobachteten, entscheidenden Pathomechanismus, nämlich der Normalisierung der Immunantwort *via* wiederhergestellter MHC Klasse II Expression bei männlichen Patienten nach Trauma, Blutverlust und operativen Eingriffen, darstellen könnte.

Es muss untersucht werden, ob letztendlich wirklich Testosteron für die nach traumatisch-hämorrhagischem Schock beobachtete Suppression der MHC Klasse II Expression bei männlichen Mäusen verantwortlich ist. Dazu könnten physiologische Mengen 5α -DHT an kastrierte Mäuse, oder alternativ der selektive Testosteronrezeptorblocker Flutamid an männliche Mäuse vor dem Experiment verabreicht werden. Eine zu dieser Studie weiterführende Untersuchung wäre, ob Kastration auch die Antigenpräsentation nach traumatisch-hämorrhagischem Schock in männlichen Mäusen verbessert.

Ferner sollte weiterhin eruiert werden, ob wirklich Makrophagen für diese Suppression verantwortlich sind, oder eventuell andere Antigenpräsentierende Zellen, wie Dendritische Zellen, da sie ebenso die Fähigkeit zur Adhärenz an Kulturplatten besitzen und nicht durch den verwendeten Makrophagenmarker demaskiert werden können.

Im Hinblick auf die Granulozyteninfiltration nach Trauma und Blutverlust bei kastrierten Mäusen im Vergleich zu männlichen Mäusen wäre die Untersuchung der generellen Mechanismen wichtig. Als potentieller Mechanismus wurde die Infiltration durch Granulozyten postuliert. Es zeigt sich jedoch sowohl bei scheinkastrierten, als auch bei kastrierten Mäusen nach Trauma und Blutverlust eine signifikant gesteigerte Infiltration. Somit hat Kastration keinen Einfluss auf die Granulozyteninfiltration.

Die exakten zugrunde liegenden Mechanismen des protektiven Effekts von Kastration auf die MHC Klasse II (Ia) Expression und die Auswirkungen auf die Granulozyteninfiltration sind unbekannt.

7 Literaturverzeichnis

1. Abraham E, Freitas AA. Hemorrhage in mice induces alterations in immunoglobulin-secreting B-cells. *Crit Care Med* 1989; 17:1015-1019.
2. Akgur FM, Brown MF, Zibari GB, McDonald JC, Epstein CJ, Ross CR, Granger DN. Role of superoxide in hemorrhagic shock-induced P-selectin expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:H791-H797.
3. Altura BM. Sex and estrogens in protection against circulatory stress reactions. *Am J Physiol* 1976; 231:842-847.
4. Andrews PC, Krinsky NI. The reductive cleavage of myeloperoxidase in half, producing enzymically active hemi-myeloperoxidase. *J Biol Chem* 1981; 256:4211-4218.
5. Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Testosterone: The culprit for producing splenocyte depression following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol* 1998; 274:C1530-C1536.
6. Angele MK, Ayala A, Monfils BA, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Testosterone and/or low estradiol: Normally required but harmful immunologically for males after trauma-hemorrhage. *J Trauma* 1998; 44:78-85.
7. Angele MK, Ayala A, Schwacha MG, Chaudry IH. Effect of gender and sex on immune responses following shock. *Shock* 2000; 14:81-90.
8. Angele MK, Catania RA, Ayala A, Cioffi WG, Bland K, Chaudry IH. Dehydroepiandrosterone (DHEA): An inexpensive steroid hormone which decreases the mortality from sepsis. *Arch Surg* 1998; 133:1281-1288.
9. Angele MK, Faist E. Gender Specific Immune Response Following Shock: Clinical and Experimental Data. *Eur J Trauma* 2000; 6:267-277.

10. Angele MK, Knoferl MW, Ayala A, Bland KI, Chaudry IH. Testosterone and estrogen differently effect Th1 and Th2 cytokine release following trauma-haemorrhage. *Cytokine* 2001; 16:22-30.
11. Angele MK, Knoferl MW, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Sex steroids regulate pro- and antiinflammatory cytokine release by macrophages after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol* 1999; 277:C35-C42.
12. Angele MK, Nitsch SM, Knoferl MW, Ayala A, Angele P, Schildberg FW, Chaudry IH. Sex specific p38 MAP kinase activation following trauma-hemorrhage: Involvement of male and female sex steroids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E189-E196.
13. Angele MK, Wichmann MW, Ayala A, Cioffi WG, Chaudry IH. Testosterone receptor blockade after hemorrhage in males: Restoration of the depressed immune functions and improved survival following subsequent sepsis. *Arch Surg* 1997; 132:1207-1214.
14. Angele MK, Knöferl MW, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry, IH. Testosterone and Estrogen regulate pro and antiinflammatory cytokine release by macrophages following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol* 1999; 277:C35-C42.
15. Ayala A, Chung Cs, Lomas JL, Song GY, Doughty LA, Gregory SH, Cioffi WG, LeBlanc BW, Reichner J, Simms HH, Grutkoski PS. Shock-Induced Neutrophil Mediated Priming for Acute Lung Injury in Mice. *Am J Pathol* 2002; 161:2283-2294.
16. Ayala A, Deol ZK, Lehman DL, Herdon CD, Chaudry IH. Polymicrobial sepsis but not low dose endotoxin infusion causes decreased splenocyte IL-2/IFN-gamma release while increasing IL- 4/IL-10 production. *J Surg Res* 1994; 56:579-585.
17. Ayala A, Ertel W, Chaudry IH. Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. *Shock* 1996; 5:79-90.
18. Ayala A, Perrin MM, Chaudry IH. Defective macrophage antigen presentation following haemorrhage is associated with the loss of MHC class II (Ia) antigens. *Immunology* 1990; 70:33-39.

19. Ayala A, Perrin MM, Ertel W, Chaudry IH. Differential effects of haemorrhage on Kupffer cells: decreased antigen presentation despite increased inflammatory cytokine (IL- 1, IL-6 and TNF) release. *Cytokine* 1992; 4:66-75.
20. Ayala A, Perrin MM, Wagner MA, Chaudry IH. Enhanced susceptibility to sepsis following simple hemorrhage: Depression of Fc and C3b receptor mediated phagocytosis. *Arch Surg* 1990; 125:70-75.
21. Ayala A, Perrin MM, Wang P, Ertel W, Chaudry IH. Hemorrhage induces enhanced Kupffer cell cytotoxicity while decreasing peritoneal or splenic macrophage capacity: involvement of cell-associated TNF and reactive nitrogen. *J Immunol* 1991; 147:4147-4154.
22. Baue AE. Multiple Organ Failure. In Baue AE (ed). *Multiple Organ Failure: Patient Care and Prevention*. St. Louis,MO: Mosby Year Book; 1990:421-470.
23. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:767-804.
24. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett JCC. Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor. *J Trauma* 1995; 40:575-579.
25. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett JCC, Carl VS, Peterson VM. Interleukin-6 Delays Neutrophil Apoptosis. *Arch Surg* 1996; 131:24-30.
26. Biffl WL, Moore EE. Splanchnic Ischemia/reperfusion and multiple organ failure. *Br J Anaesth* 1996; 77:59-70.
27. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CC. Nitric oxide reduces endothelial expression of intracellular adhesion molecule (ICAM-1). *J Surg Res* 1996; 63:328.
28. Bodker A, Anderson KE, Batra S, Juhl BR, Meyhoff HH. The estrogen receptor expression in the male rabbit urethra and prostate following castration. *Scand J Urol Nephrol* 1994; 28:113-118.
29. Bone RC. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA* 1992; 268:3452-3455.

30. Booth EA, Marchesi M, Kilbourne EJ, Lucchesi BR. 17 β -estradiol as a receptor-mediated cardioprotective agent. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307:395-401.
31. Bühren V. Pathophysiologie des Schocks. *Unfallchirurg* 1996; 99:207-220.
32. Call DR, Nemzek JA, Ebong SJ, Bolgos GR, Newcomb DE, Wollenberg GK, Remick DG. differential local and systemic regulation of the murine chemokines KC and MIP2. *Shock* 2001; 15:278-284.
33. Canonaco M, Ando S, Valenti A. The in-vitro transformation of [3H]dehydroepiandrosterone into its principal metabolites in the adrenal cortex of adult castrated male rats and following steroid treatment. *J Endocrinology* 1997;419-424.
34. Carden D, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol* 1998; 275:H385.
35. Cartwright GE, Athens JW, Wintrobe MM. The kinetics of granulopoiesis in normal man. *Blood* 1964; 24:780-803.
36. Caty MG, Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SI. Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1990; 212:694-700.
37. Celada A, Klemsz MJ, Maki RA. Interferone-gamma activates multiple pathways to regulate expression of the genes for major histocompatibility class II I-A beta, tumor necrosis factor and complement C3 in mouse macrophages. *Eur J Immunol* 1989; 19:1103.
38. Center for Disease Control. Mortality Patterns - United States, 1989. *MMWR* 1992; 41:121-125.
39. Chain BM, Kaye PM, Shaw MA. The biochemistry and cell biology of antigen processing. *Immunol Rev* 1988; 106:33-58.

40. Chang RJ, Lee SH. Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on the expression of an Ia antigen on a murine macrophage cell line. *J Immunol* 1986; 137:2853-2856.
41. Chaudry IH. The effect of ATP on survival in intestinal ischemia shock, hemorrhagic shock, and endotoxin shock in rats. *Circ Shock* 1982; 9:629-631.
42. Chaudry IH, Ayala A. *Immunological Aspects of Hemorrhage*. Austin, TX: Medical Intelligence Unit; R.G. Landes Company; 1992.
43. Chaudry IH, Ayala A. Immune consequences of hypovolemic shock and resuscitation. *Curr Opin Anaesthesiology* 1993; 6:385-392.
44. Chaudry IH, Ayala A, Ertel W, Stephan RN. Editorial Review. Hemorrhage and resuscitation: Immunological Aspects. *Am J Physiol* 1990; 259:R663-R678.
45. Chaudry IH, Stephan RN, Harkema JM, Dean RE. Immunological alterations following simple hemorrhage. In Faist E, Ninnemann J, Green D (eds). *Immune Consequences of Trauma, Shock, and Sepsis: Mechanisms and Therapeutic Approaches*. Berlin: Springer-Verlag; 1989:363-373.
46. Cheadle WG, Hershman MJ, Wellhausen SR, Polk HC, Jr. HLA-DR antigen-expression on peripheral blood monocytes correlates with surgical infection. *Am J Surg* 1991; 161:639-645.
47. Cheadle WG, Hershman MJ, Wellhausen SR, Polk HC, Jr. Role of monocyte HLA-DR expression following trauma in predicting clinical outcome. In Faist E, Ninnemann J, Green D (eds). *Immune Consequences of Trauma, Shock, and Sepsis: Mechanisms and Therapeutic Approaches*. Berlin: Springer-Verlag; 1989:119-122.
48. Clark RA, Klebanoff SJ. Generation of a neutrophil chemotactic agent by spermatozoa: role of complement and regulation by seminal plasma factors. *J Immunol* 1976; 117:1378-1386.
49. Creswell P. Antigen recognition by T-lymphocytes. *Immunol Today* 1987; 8:67.
50. Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S, Masi AT. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheum* 1995; 13:217-226.

51. Da Silva J, Hall GM. The effects of gender and sex hormones on outcome in rheumatoid arthritis. *Balliere's Clin Rheumatol* 1992; 6:193-219.
52. Deitch EA. Multiple Organ Failure: Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 1992; 216:117-134.
53. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* 1998; 9:1-11.
54. Deitch EA, Xu D, Franko L, Ayala A, Chaudry IH. Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. *Shock* 1, 141-146. 1994.
55. Delyani JA, Murohara T, Nossuli TO, Lefer AM. Protection from myocardial reperfusion injury by acute administration of 17 β -estradiol. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:1001-1008.
56. Diodato M, Knoferl MW, Angele MK, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. Gender differences in the inflammatory response and survival following hemorrhage and subsequent sepsis. *Cytokine* 14, 162-168. 2001.
57. Entman ML, Youker K, Shoji T, Kukielka G, Shappell SB, Taylor AA, Smith CW. Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. *J Clin Invest* 1992; 90:1335-1345.
58. Ertel W, Keel M, Infanger M, Ungethüm U, Steckholzer U, Trentz O. Circulating mediators in serum of injured patients with septic complications inhibit neutrophil apoptosis through up-regulation of protein-tyrosine phosphorylation. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* 1998; 44:767-776.
59. Ertel W, Meldrum DR, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH. Immunoprotective effect of a calcium channel blocker on macrophage antigen presentation function, major histocompatibility class II antigen expression and interleukin-1 synthesis after hemorrhage. *Surgery* 1990; 108:154-160.
60. Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH. Chloroquine attenuates hemorrhagic shock induced suppression of Kupffer cell antigen presentation and MHC class II

- antigen expression through blockade of tumor necrosis factor and prostaglandin release. *Blood* 1991; 78:1781-1788.
61. Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH. Insights into the mechanisms of defective antigen presentation following hemorrhage. *Surgery* 1991; 110:440-447.
 62. Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH. Chloroquine attenuates hemorrhagic shock-induced immunosuppression and decreases susceptibility to sepsis. *Arch Surg* 1992; 127:70-76.
 63. Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Dean RE, Chaudry IH. Interferon-gamma attenuates hemorrhage-induced suppression of macrophage and splenocyte functions and decreases susceptibility to sepsis. *Surgery* 1992; 111:177-187.
 64. Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Perrin MM, Chaudry IH. Anti-TNF monoclonal antibodies prevent haemorrhage-induced suppression of Kupffer cell antigen presentation and MHC class II antigen expression. *Immunology* 1991; 74:290-297.
 65. Ertel W, Morrison MH, Meldrum DR, Ayala A, Chaudry IH. Ibuprofen restores cellular immunity and decreases susceptibility to sepsis following hemorrhage. *J Surg Res* 1992; 53:55-61.
 66. Faist E, Meakins J, Schildberg FW. *Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag; 1993.
 67. Faist E, Mewes A, Strasser T, Walz A, Alkan SS, Baker CC, Ertel W, Heberer G. Alteration of monocyte function following major injury. *Arch Surg* 1988; 123:287-292.
 68. Farr AG, Kiely JM, Unanue ER. Macrophage-T cell interactions involving Listeria monocytogenes-role of the Il-2 gene complex. *J Immunol* 1979; 122:2395-2404.
 69. Frelinger JA, Niederhuber JE, Shreffler DC. Inhibition of immune responses *in vitro* by specific antiserums to Ia antigens. *Science* 1975; 188:268-270.
 70. Friedman D, Netti F, Schreiber AD. Effect of estradiol and steroid analogues on the clearance of immunoglobulin G-coated erythrocytes. *J Clin Invest* 1985; 75:162-167.

71. Fullerton DA, Eisenach JH, McIntyre RC. Inhaled nitric oxide prevents lung neutrophil accumulation and pulmonary endothelial dysfunction after mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1996; 271:L236.
72. Gannon CJ, Pasquale M, Tracy JK, McCarter RJ, Napolitana LM. Male gender is associated with increased risk for postinjury pneumonia. *Shock* 2004; 21:410-414.
73. Garman RD, Jacobs KA, Clark SC, Raulet DH. B-cell-stimulatory factor 2 (Beta2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7629-7633.
74. Gibbons RA, Martinez OM, Lim RC, Horn JK, Garovoy MR. Reduction in HLA-DR, HLA-DQ and HLA-DP expression by Leu-M₃₊ cells from the peripheral blood of patients with thermal injury. *Clin Exp Immunol* 1989; 75:371-375.
75. Gonzales RJ, Moore EE, Ciesla DJ, Biffl WL, Johnson JL, Silliman CC. Mesenteric lymph is responsible for post-hemorrhagic shock systemic neutrophil priming. *J Trauma* 2001; 51:1069-1072.
76. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1998; 255:H1269-H1275.
77. Grossman CJ. Interactions between the gonadal steroids and the immune response. *Science* 1985; 227:257-261.
78. Grossman CJ. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. *J Steroid Biochem* 1989; 34:241-251.
79. Guo W, Ding J, Huang Q, Deitch EA. Alterations in the bacterial flora modulate the systemic cytokine response to hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1995; 269:G827-G832.
80. Hensler T, Hecker H, Heeg K, Heidecke CD, Bartels H, Barthlen W, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun* 1997; 65:2283-2291.
81. Hersham MJ, Appel SH, Wellhausen SR, Sonnenfeld G, Polk HC, Jr. Interferon-gamma treatment increases HLA-DR expression on monocytes in severely injured patients. *Clin Exp Immunol* 1989; 77:67-70.

82. Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC, Jr. Monocyte HLA-DR antigen expression characterises clinical outcome in the trauma patient. *Br J Surg* 1990; 77:204-207.
83. Hill J, Lindsay TF, Ortiz F, Yeh CG, Hechtman HB, Moore FD. Soluble complement receptor type 1 ameliorates the local and remote injury after intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *J Immunol* 1992; 149:1723-1728.
84. Holman RG, Maier RV. Superoxide production by neutrophils in a model of adult respiratory distress syndrome. *Arch Surg* 1988; 123:1491.
85. Humphrey JH, Grennan D. Different macrophage populations distinguished by means of fluorescent polysaccharides. Recognition and properties of marginal-zone macrophages. *Eur J Immunol* 1981; 11:221.
86. Janeway CA, Bottomly K, Babich J, Conrad P, Conzen S, Jones B, Kaye J, Katz M, McVay L, Murphy DB, Tite J. Quantitative variation in Ia antigen expression plays a central role in immune regulation. *Immunol Today* 1984; 5:99-105.
87. Jungi TW, Besedovsky HO, Sorkin E, Schardt M. hormonal control of neutrophil chemotactic activity in the rat vagina. *Am J Physiol* 1997; 233:R59-R65.
88. Kaye J, Porcelli S, Tite J, Jones B, Janeway CA, Jr. Both a monoclonal antibody and antisera specific for determinants unique to individual cloned helper T-cell line can substitute for antigen and antigen-presenting cells in the activation of T-cells. *J Exp Med* 1983; 158:836-856.
89. Kher A, Wang M, Tsai BM, Pitcher JM, Greenbaum ES, Nagy RD, Patel KM, Wairiuko GM, Markel TA, Meldrum DR. Sex differences in the myocardial inflammatory response to acute injury. *Shock* 2005; 23:1-10.
90. Kim FJ, Moore FA, Biffl WL, Fontes B, Banerjee A. Reperfused gut elaborates PAF that chemoattracts and primes neutrophils. *J Surg Res* 1995; 58:636-640.
91. Kim FJ, Moore FA, Biffl WL, Fontes B, Banerjee A. Reperfused gut elaborates PAF that chemoattracts and prime neutrophils. *J Surg Res* 1995; 58:636.

92. Kittas C, Henry L. Effect of gonadectomy and oestrogen administration on the response of lymph-node post-capillary venules to infection with *Toxoplasma gondii*. *J Pathol* 1979; 127:129-136.
93. Kittas C, Henry L. Effect of sex hormones on the immune system of guinea-pigs and on the development of toxoplasmic lesions in non-lymphoid organs. *Clin Exp Immunol* 1979; 36:16-23.
94. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocytes adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4651.
95. Kukielka GL, Smith CW, Manning AM, Youker KA, Michael LH, Entman ML. Induction of interleukin-6 synthesis in myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation* 1995; 92:1866-1875.
96. Kukielka GL, Youker KA, Michael LH. Role of early reperfusion in the induction of adhesion molecules and cytokines in previously ischemic myocardium. *Mol Cell Biochem* 1995; 147:5-12.
97. Lakshminarayanan V, Benno DW, Costa RH, Roebuck KA. Differential regulation of interleukin-8 and intracellular adhesion molecule-1 by H_2O_2 and tumor necrosis factor- α in endothelial and epithelia cells. *J Biol Chem* 1997; 272:32910-32918.
98. Lederer J, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 1999; 11:153-159.
99. Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 1996; 32:743-751.
100. Livingston DH, Apel SH, Wellhausen SR, Sonnenfeld G, Polk HC. Depressed interferon-gamma production and monocyte HLA-DR expression after severe injury. *Arch Surg* 1988; 123:1309-1312.
101. Lyons CR. The role of nitric oxide in inflammation. *Adv Immunol* 1995; 60:323.
102. Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res* 1993; 72:403-412.

103. Mach B, Steimle E, Martinez-Soria E, Reitch W. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:301.
104. MacLennon DH, Tzagologg A. Effect of diphosphopyridine nucleotide deficiency on respiration, respiratory control and phosphorylation in mitochondria. *J Biol Chem* 1966; 214:1933-1937.
105. Maroni ES, Symon DNK, Wilkinson PC. Chemotaxis of neutrophil leucocytes towards spermatozoa and seminal fluid. *J Reprod Fertility* 1972; 28:359-368.
106. Maroni ES, Wilkinson PC. Selective chemotaxis of macrophages towards human and guinea-pig spermatozoa. *J Reprod Fertility* 1971; 27:149-152.
107. Marzi I. Der hämorrhagische Schock. *Anaesthesist* 1996; 45:976-995.
108. McGowan JE, Barnes MW, Finland N. Bacteremia at Boston City Hospital: occurrence and mortality during 12 selected years (1935-1972) with special reference to hospital-acquired cases. *J Infect Dis* 1975; 132:316-335.
109. Meldrum DR, Ayala A, Perrin MM, Ertel W, Chaudry IH. Diltiazem restores IL-2, IL-3, IL-6 and IFN-gamma synthesis and decreases susceptibility to sepsis following hemorrhage. *J Surg Res* 1991; 51:158-164.
110. Messingham KAN, Shirazi M, Duffner LA, Emanuele MA, Kovacs EJ. Testosterone receptor blockade restores cellular immunity in male mice after burn injury. *J Endocrinol* 2001; 169:299-308.
111. Miller L, Hunt JS. Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sci* 1996; 59:1-14.
112. Miyagi M, Aoyama H, Morishita M, Iwamoto Y. Effects of Sex Hormones on Chemotaxis of Human Peripheral Polymorphonuclear Leukocytes and Monocytes. *J Peridontol* 1992; 63:28-32.
113. Miyazaki Y, Inoue T, Kyi M, Sawada M, Miyake S, Yoshizawa Y. Effects of a neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on acute pulmonary injury induced by tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and activated neutrophils in isolated perfused rabbit lungs. *Crit Care Med* 1998; 157:89.

114. Mizutani H, May LT, Shegal PB, Kupper TS. synergistic interaction of Il-1 and Il-6 in T-cell activation: mitogen but not antigen receptor-induced proliferation of a cloned T-helper cell is enhanced by Il-6. *J Immunol* 1989; 143:896.
115. Moeller G. role of macrophages in the immune response. *Immunol Rev* 1978; 40:1-136.
116. Moore EE, Moore FA, Franciose RJ. The postischemic gut serves as a priming bed for circulation neutrophils that provoke multiple organ failure. *J Trauma* 1994; 37:881-887.
117. Moore FA, Moore EE, Poggetti R, McAnena OJ, Peterson VM, Abernathy CM, Parsons PE. Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma. *J Trauma* 1991; 31:629-638.
118. Mostafa G, Huynh T, Sing RF, Miles WS, Norton HJ, Thomason MH. Gender-related outcomes in trauma. *J Trauma* 2002; 53:430-434.
119. Mozes T, Braquet P, Filep J. Platelet-activating factor: an endogenous mediator of mesenteric ischemia-reperfusion-induced shock. *Am J Physiol* 1989; 257:R872-R877.
120. Mullen PG, Windsor ACJ, Walsh CJ, Fowler AA, Sugerman HJ. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 selectively regulate neutrophil function in vitro. *J Surg Res* 1995; 58:124-130.
121. Nakanishi K, Vinten-Johansen J, Lefer DJ. Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am J Physiol* 1992; 263:H1650.
122. Newman SL, Henson JE, Henson PM. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J exp Med* 1982; 156:430-442.
123. Nitsch SM, Wittmann F, Angele P, Wichmann MW, Hatz RA, Hernandez-Richter T, Chaudry IH, Jauch KW, Angele MK. Physiological levels of 5-dihydrotestosterone depress wound immune function and impair wound healing following trauma-hemorrhage. *Arch Surg* 2004; 132:157-163.

124. Oberholzer A, Keel M, Zellweger R, Steckholzer U, Trentz O, Ertel W. Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. *J Trauma* 48, 932-937. 2000.
125. Offner PJ, Moore EE, Biffl WL. Male gender is a risk factor for major infections after surgery. *Arch Surg* 134, 935-940. 1999.
126. Olofsson P, Nylander G, Olsson P. Endotoxin transport routes and kinetics in intestinal ischemia. *Acta Chir Scand* 1985; 151:635-639.
127. Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal Steroids and Immunity. *Endocr Rev* 1996; 17:369-384.
128. Pachot A, Monneret G, Brion A, Venet F, Bohe J, Bienvenu J, Mouglin B, Lepape A. Messenger RNA expression of major histocompatibility complex class II genes in whole blood from septic shock patients. *Crit Care Med* 2005; 33:236-237.
129. Patel KD, Zimmermann GA, Prescott SM, McEver RP, McIntyre TM. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol* 1991; 112:749-759.
130. Patrick DA, Moore EE, Barnett CC, Silliman CC. Nitric oxide attenuates PAF priming of human neutrophils for superoxide anion production. *J Surg Res* 1997.
131. Patrick DA, Moore EE, Barnett CC, Silliman CC. Nitric oxide attenuates PAF priming for elastase release via cGMP-dependent pathway. *Surgery* 1997.
132. Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Koeike K, Banerjee A. Simultaneous liver and lung injury following gut ischemia is mediated by xanthine oxidase. *J Trauma* 1992; 32:723-728.
133. Polk HC, George CD, Wellhausen SR, Cost K, Davidson PR, Regan MP, Borzotta AP. A systemic study of host defense in badly injured patients. *Ann Surg* 1986; 204:282-299.

134. Pruitt JH, Copeland EM, Moldawer LL. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism in sepsis, systemic inflammatory response syndrome, and septic shock [editorial]. *Shock* 1995; 3:235-251.
135. Raccioppi L, Moscarella A, Ruggiero G. inhibition by anti-HLA class II monoclonal antibodies of monoclonal antibody okt-3-induced t cell proliferation.studies at the mRNA level. *J Immunol* 1990; 145:3635-3640.
136. Ranges Ge, Bombara MP, Aiyer RA, Rice GG, Palladino MA. Tumor necrosis factor-alpha as a proliferative signal for IL-2- dependent T-cell line: strict species specificity of action. *J Immunol* 1989; 142:1203-1208.
137. Redl H, Dinges HP, Buurman WA, van der Linden GJ, Pober JS, Cotran RS, Schlag G. Expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 in septic but not traumatic/hypovolemic shock in the baboon. *Am J Pathol* 1991; 139:461-466.
138. Redmond HP, Hofmann K, Shou J, Leon P, Kelly CJ, Daly JM. Effects of laparotomy on systemic macrophage function. *Surgery* 1992; 111:647-655.
139. Remmers DE, Bland KI, Cioffi WG, Wang P, Angele MK, Chaudry IH. Testosterone: the crucial hormone responsible for depressing myocardial function in males after trauma-hemorrhage. *Ann Surg* 1998; 227:790-799.
140. Remmers DE, Wang P, Cioffi WG, Bland K, Chaudry IH. Testosterone receptor blockade after trauma-hemorrhage improves cardiac and hepatic functions in males. *Am J Physiol* 1997; 273:H2919-H2925.
141. Rose S, Marzi I. Pathophysiologie des Polytraumas. *Zentralbl Chir* 1996; 121:896-913.
142. Rosenthal AS, Shevach EM. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J Exp Med* 1973; 138:1194-1212.
143. Samy TS, Knoferl MW, Zheng R, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. Divergent immune responses in male and female mice after trauma-hemorrhage: dimorphic alterations in T lymphocyte steroidogenic enzyme activities. *Endocrinology* 2001; 142:3519-3529.

144. Samy TS, Schwacha MG, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Androgen and estrogen receptors in splenic T lymphocytes: Effects of flutamide and trauma-hemorrhage. *Shock* 2000; 14:465-470.
145. Schierwagen C, Bylund-Fellenius AC, Lundberg C. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *J Pharmacol Methods* 1990; 23:179-186.
146. Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, Guice KS, Hinshaw DB. Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery* 1989; 106:195.
147. Schneider CP, Nickel EA, Samy TSA, Schwacha MG, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. The aromatase inhibitor, 4-hydroxyandrostenedione, restores immune responses following trauma-hemorrhage in males and decreases mortality from subsequent sepsis. *Shock* 2000; 14:347-353.
148. Schroder J, Kahlke V, Staubach KH, Zabel P, Stuber F. Gender differences in human sepsis. *Arch Surg* 1998; 133:1200-1205.
149. Schwartz R, Yano A, Stimpfling J, Paul W. *J exp Med* 1979; 149:40-57.
150. Sellak H, Franzini E, Hakim J, Pasquier C. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood* 1994; 83:2669-2677.
151. Shevach EM, Green I, Paul WE. Alloantisera induced inhibition of immune response gives production function. II. Genetic analysis of target antigens. *J Exp Med* 1995.
152. Shevach EM, Rosenthal AS. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. II. Role of the macrophage in the regulation of genetic control of the immune response. *J Exp Med* 1973; 138:1213-1229.
153. Shingu M, Nobunaga M. Chemotactic activity generated in human serum from the fifth component of complement by hydrogen peroxide. *Am J Pathol* 1984; 117:201-206.

154. Springer T, Galfre G, Secher DS, Milstein C. MAC-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 1979; 9:301-306.
155. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346:425-434.
156. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Arlotta M, Arcoraci V, Minutoli L, Serrano M, Saitta A, Caputi AP. 17β -oestradiol reduces cardiac leukocyte accumulation in myokardial ischemia reperfusion injury in rat. *J Pharmacol* 1997; 335:185-192.
157. Squier MKT, Sehnert AJ, Cohen JJ. Apoptosis in leukocytes. *J Leuk Biol* 1995; 57:2-10.
158. Stephan RN, Ayala A, Harkema JM, Dean RE, Border JR, Chaudry IH. Mechanism of immunosuppression following hemorrhage: Defective antigen presentation by macrophages. *J Surg Res* 1989; 46:553-556.
159. Stephan RN, Kupper TS, Geha AS, Baue AE, Chaudry IH. Hemorrhage without tissue trauma produces immunosuppression and enhances susceptibility to sepsis. *Arch Surg* 1987; 122:62-68.
160. Stoeber ZN, Chiorazzi RG, Lahita RG. Regulation of the immune response by sex steroids. *J Immunol* 1988; 141:91-98.
161. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 1983; 132:345-352.
162. Turnage RH, Kadesky KM, Bartula L, Guice KS, Oldham KT, Myers SI. Splanchnic PGI₂: release and the "no reflow" following intestinal reperfusion. *J Surg Res* 1995; 58:558-564.
163. Turnage RH, Guice KS, Oldham KT. Pulmonary microvascular injury following intestinal reperfusion. *New Horizons* 1994; 2:463-475.
164. Unanue ER. The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. Part two: Symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages. *Adv Immunol* 1981; 31:1-136.

165. Unanue ER. Macrophages, antigen-presenting cells, and the phenomena of antigen handling and presentation. *Fund Immunol* 1989;95-115.
166. Unanue ER, Allen PM. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 1987; 236:551-557.
167. Unanue ER, Beller DI, Lu CT, Allen PM. Antigen presentation: comments on its regulation and mechanism. *J Immunol* 1984; 132:1-5.
168. van Vliet E, Melies M, van Ewijk W. Marginal zone macrophages in the mouse spleen identified by a monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 1985; 35:40.
169. VanUffelen BE, deKoster BM, VandenBroek PJA, VanSteveninck J, Elferink JGR. Modulation of neutrophil migration by exogenous gaseous nitric oxide. *J Leukocyte Biol* 1996; 60:94.
170. Viselli SM, Olsen NJ, Shults K, Steizer G, Kovacs WJ. Immunochemical and flow cytometric analysis of androgen receptor expression in thymocytes. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 109:19-26.
171. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ. Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg* 1993; 80:205-209.
172. Weinstein Y, Ran S, Segal S. Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *J Immunol* 1984; 132:656-661.
173. Wertheimer SJ, Myers CL, Wallace RW, Parks TP. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor- α and phorbol myristate acetate. *J Biol Chem* 1992; 267:12030-12035.
174. Wichmann MW, Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Chaudry IH. Flutamide: A novel agent for restoring the depressed cell-mediated immunity following soft-tissue trauma and hemorrhagic shock. *Shock* 1997; 8:1-7.

175. Wichmann MW, Ayala A, Chaudry IH. Male sex steroids are responsible for depressing macrophage immune function after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol* 1997; 273:C1335-C1340.
176. Wichmann MW, Inthorn D, Address HJ, Schildberg FW. Incidence and mortality of severe sepsis in surgical intensive care patients: The influence of patient gender on disease process and outcome. *Intensive Care Med* 2000; 26:167-172.
177. Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH. Enhanced Immune Responses in Females as Opposed to Decreased Responses in Males Following Hemorrhagic Shock. *Cytokine* 1996; 8:853-863.
178. Wira CR, Rossoll RM. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of sex hormones on antigen presentation in the vagina. *Immunology* 1995; 84:505-508.
179. Yamamoto Y, Saito H, Setogawa T, Tomioka H. Sex differences in host resistance to mycobacterium marinum infection in mice. *Infect Immun* 1991; 59:4089-4096.
180. Youker K, Smith CW, Anderson DC, Miller D, Michael LH, Rossen RD, Entman ML. Neutrophil adherence to isolated adult cardiac myocytes. Induction by cardiac lymph collected during ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* 1992; 89:602-609.
181. Zallen G, Moore EE, Johnson JL, Tamura DY, Aiboshi J, Biffi WL, Silliman CC. Circulating postinjury neutrophils are primed for the release of proinflammatory cytokines. *J Trauma* 1999; 46:42-48.
182. Zallen G, Moore EE, Johnson JL, Tamura DY, Ciesla DJ, Silliman CC. Posthemorrhagic shock mesenteric lymph primes circulating neutrophils and provokes lung injury. *J Surg Res* 1999; 83:83-88.
183. Zedler S, Bone RC, Baue AE, von Donnersmarck GH, Faist E. T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med* 1999; 27:66-72.
184. Zellweger R, Ayala A, DeMaso CM, Chaudry IH. Trauma-hemorrhage causes prolonged depression in cellular immunity. *Shock* 1995; 4:149-153.

185. Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S, DeMaso CM, Chaudry IH. Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. *Crit Care Med* 1997; 25:106-110.
186. Zhang X, Wang LY, Jiang TY, Zhang HP, Dou Y, Zhao J H, Zhao H, Qiao ZD, Qiao TQ. Effects of testosterone and 17-beta-estradiol on TNF-alpha induced E-selectin and VCAM-1 expression in endothelial cells Analysis of the underlying receptor pathways. *Life Sci* 2002; 71:15-29.
187. Zheng R, Samy TS, Schneider CP, Rue LW, Bland KI, Chaudry IH. Decreased 5alpha-dihydrotestosterone catabolism suppresses T lymphocyte functions in males after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282:C1332-C1338.

8 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater und Mentor PD Dr. Martin Angele (Chirurgische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern) für die geistigen und wissenschaftlichen Vorarbeiten und den damit verbundenen bildenden Konzepten, die ich im Rahmen meiner Dissertation verfolgen durfte.

Er wies mir in selbstloser Weise die Richtung wissenschaftlichen Arbeitens und vor allem Denkens, deren Wert sich mir bis *dato*, in voller Tragweite abschließend noch gar nicht ermessen lässt.

Ferner bin ich ebenso zu größtem Dank Florian Wittmann verpflichtet, der als promovierender Weggefährte Leiden und Erfolg teilte.

Abschließend danke ich selbstverständlich und gerne meinen Eltern, die mir die Studiengänge und letztendlich diese Promotion überhaupt in selbstloser Manier ermöglichten und ermöglichen.

9 Tabellarischer Lebenslauf

Stefan Mayr, Westheimer Str. 34a, 86356 Neusäß, Deutschland.

Geburtstag: 11.05.1977, Augsburg, Deutschland
Eltern: Dr. med. dent. R. Mayr, und U.A. Mayr †
Geschwister: Andreas Mayr
Familienstand: ledig
Konfession: römisch katholisch

Ausbildung:

1983 – 1987: Grundschule Westheim, Neusäß, Deutschland
1987 – 1996: Justus-von-Liebig-Gymnasium, Neusäß, Deutschland
1996: Allgemeine Hochschulreife
1996 – 1997: Wehrdienst bei der Bundeswehr
2000: Ärztliche Vorprüfung an der Ludwig-Maximilian-Universität,
München, Deutschland
2001: 1. Staatsexamen an der Ludwig-Maximilian-Universität,
München, Deutschland
2003: 2. Staatsexamen an der Ludwig-Maximilian-Universität,
München, Deutschland
2004: 3. Staatsexamen an der Ludwig-Maximilian-Universität,
München, Deutschland
Approbation zum Arzt
seit 2005: Student der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität,
München, Deutschland