Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der

Ludwig-Maximilians-Universität München

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

Dehydroepiandrosteron (DHEA):

Ein Steroidhormon mit immunmodulatorischem Potential im Hinblick auf die PBMC-Funktion abdominal-chirurgischer Patienten

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

Vorgelegt von
Markus Christopher Frantz
aus München
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. M. K. Angele
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. D. von Schweinitz
	Priv. Doz. Dr. Chr. Klein
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. med. M. K. Angele
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	30.06.2005

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CO_2	Kohlendioxid
°C	Grad Celsius
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et altera
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FCS	Fetal calf serum (Kälberserum)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Coloniestimulierende Faktoren
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
IgG	Immunglobulin G
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-1, -2, -6, -10, -12	Interleukin-1, -2, -6, -10, -12
kg	Kilogramm
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mA	Milliampère
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
ml	Milliliter
Min.	Minute
MHC	Major histocompatibility complex
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte

pg	Pikogramm
PBS	Phosphate buffered saline
PBMC	Periphere Mononukleäre Blutzellen
PCR	Polymerase Chain Reaction
präop.	präoperativ
postop.	postoperativ
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
Sek.	Sekunden
SEM	Standard Error of the Means
Std.	Stunde
SNK	Student-Newman-Keuls
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
vgl.	vergleiche
V	Volt
vs.	Versus
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 8

1.1 Hintergrund 8

1.2 Einfluss von Blutverlust, Schock und großen Operationen auf das Immunsystem 9

1.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort 10

1.4 Dehydroepiandrosteron (DHEA) als immunmodulatorische Substanz 12

1.5 Studienabsicht 15

2 Fragestellung und Versuchsansätze 16

3 Material und Methoden 18

3.1 Studiendesign und Rekrutierung der Patienten 18

3.1.1 Kriterien für die Rekrutierung 18

3.1.2 Patienten 18

3.2 Untersuchungsmethoden 20

3.2.1 Gewinnung von Gewebe 20

3.2.1.1 Vollblut, Plasma 20

3.2.1.2 Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) 20

3.2.2 Dehydroepiandrosteron (DHEA) 21

3.2.3 *In vitro* Zellkulturverfahren 22

3.2.3.1 Kulturverfahren für die Messung der Zytokinsekretion 22

3.2.3.2 Kulturverfahren für die RNA-Extraktion 22

3.2.4 Durchführung der Versuchsansätze 23

3.2.4.1 Effekt von DHEA auf die postoperative PBMC-Funktion 23

3.2.4.2 Einfluss von Plasma und PBMC auf die DHEA-Wirkung 23

3.2.4.3 LPS-Sensitivität von PBMC 24

3.2.4.4 Einfluss von Tamoxifen auf die DHEA-Wirkung 25

3.2.4.5 Effekt von DHEA auf die RNA-Expression 25

3.2.5 Zytokinbestimmung in den Zellüberständen 26

3.2.5.1 Bestimmung von IL-6, IL-1β und TNF-α mittels ELISA 27

3.2.5.2 Bestimmung von IL-12p70 und IL-10 mittels ELISA 27

3.2.6 RNA-Extraktion und *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (PCR) 28

3.2.7 Verwendung von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel für DHEA 31
3.2.8 PBMC Subpopulationen ... 31
3.2.8.1 Probenvorbereitung ... 31
3.2.8.2 Durchflusszytometrie ... 32
3.3 Chemikalien und Reagenzien ... 33
3.3.1 Chemikalien ... 33
3.3.2 Reaktionslösungen (ELISA) ... 34
3.4 Statistik ... 35

4 Ergebnisse ... 36

4.1 Effekt von DHEA auf die postoperative PBMC-Funktion ... 36
4.1.1 Proinflammatorische Zytokine IL-6, IL-1β und TNF-α ... 36
4.1.2 Die Zytokine IL-12p70 und IL-10 ... 39
4.2 Einfluss von Plasma und PBMC auf die DHEA-Wirkung ... 41
4.2.1 Einfluss von prä- und postoperativen Zellen auf die DHEA-Wirkung ... 41
4.2.2 Einfluss von prä- und postoperativem Plasma auf die DHEA-Wirkung ... 42
4.2.2.1 Wirkung von prä- und postoperativem Plasma auf postoperative PBMC ... 42
4.3 LPS-Sensitivität von PBMC ... 43
4.4 Einfluss von Tamoxifen auf die DHEA-Wirkung ... 44
4.5 Effekt von DHEA auf die RNA-Expression ... 45
4.6 Verwendung von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Träger für DHEA ... 46
4.7 PBMC Subpopulationen ... 47

5 Diskussion ... 49

5.1 Auswahl und Bedeutung der untersuchten Parameter ... 49
5.2 Auswirkung der Operation auf die PBMC-Funktion ... 51
5.3 Effekt von DHEA auf die postoperative PBMC-Funktion ... 52
5.4 LPS-Sensitivität von PBMC ... 54
5.5 Einfluss von postop. Plasma und PBMC auf die DHEA-Wirkung ... 55
5.6 Einfluss von Tamoxifen auf die DHEA-Wirkung ... 57

5.7 Effekt von DHEA auf die RNA-Expression 58

5.8 PBMC Subpopulationen 59

6 Zusammenfassung 61

7 Literaturverzeichnis 63

8 Danksagung 77

9 Tabellarischer Lebenslauf 78

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Gesunde Individuen schützen sich vor eindringenden Erregern durch eine zeitgleich ablaufende Aktivierung von zusammenhängenden Teilen des Immunsystems. Dieses System kann prinzipiell in eine „erworbene“ (spezifische) und eine „angeborene“ (unspezifische) Immunität eingeteilt werden. Während das erworbene System im Laufe seiner Evolution zu einer zielgerichteten Antwort auf spezielle, eindringende Erreger wird, ist das angeborene System unspezifisch und funktioniert unabhängig von der antigenen Beschaffenheit des Erregers. Neben der Bekämpfung eindringender Erreger dient das angeborene System auch der Verminderung von Gewebsverletzungen, Zelltod sowie der Reduzierung der Anfälligkeit für sekundäre oder opportunistische Infektionen (25,50,103). Für das Zusammenspiel aller zum System gehörenden Zellen, deren Kommunikation untereinander und für die gezielte Aktivierung einzelner Komponenten sind unter anderem Zytokine verantwortlich. Diese sind Proteine und Glykoproteine, die als chemische Botenstoffe zwischen den Zellen fungieren. Die Zytokine werden zum großen Teil von den Immunzellen selbst ausgeschüttet (unter anderem von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) (Monozyten, Makrophagen, Natürliche Killer (NK) Zellen, T-Zellen u.a.). Die Fähigkeit der PBMC zur Produktion und Ausschüttung von Zytokinen wird in dieser Studie als Funktionsparameter untersucht. Die Zytokine spielen in zahlreichen Prozessen wie z. B. im Zellwachstum, in der Zelldifferenzierung, im Auf- und Umbau von Gewebe sowie bei der Regulation der Immunantwort eine große Rolle (103). So sind Zytokine auch an der inflammatorischen Reaktion nach traumatisch-hämorrhagischem Schock initiierend beteiligt (112). Im Speziellen sind es die drei proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF-α, die eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der Entzündungskaskade und damit der Immunabwehr zu spielen scheinen. Ihre Ausschüttung führt sowohl zur Produktion als auch zur Hemmung weiterer Zytokine und Mediatoren, die ihrerseits an der Aufrechterhaltung der entzündlichen Reaktion beteiligt sind.

1.2 Einfluss von Blutverlust, Schock und großen Operationen auf das Immunsystem

Durch Weichteilverletzungen, Operationen und Infektionen können diese Mediatoren in den Körperkreislauf eingeschwemmt werden und so zu einer generalisierten Entzündungsreaktion führen. Diese kann zusammen mit anderen pathophysiologischen Veränderungen in einer Störung der spezifischen Immunantwort resultieren, die mit einer erhöhten Infektions- und Mortalitätsrate einhergeht (30,31,82). Hohe Plasmaspiegel proinflammatorischer Zytokine sind ein Hinweis auf die immunologische Reaktion und können in ihrem Verlauf als prognostischer Parameter bei polytraumatisierten oder septischen Patienten herangezogen werden (34,35,90,113,124).

Eine Reihe von klinischen und tierexperimentellen Studien zeigen, dass operatives Trauma, Blutverlust und Schock unterdrückende Effekte auf die Immunantwort haben (48,59,99,125,136,138,139). Als Zeichen einer Störung der spezifischen Immunantwort führten Trauma und Blutverlust zu einer unterdrückten Antigenpräsentation durch Makrophagen. Im Einzelnen kam es zu einer verringerten Expression der für die Erregerpräsentation notwendigen MHC Klasse II Moleküle durch eine direkte Beeinflussung der Makrophagen-Funktion (16,18,111). Chirurgisches Trauma hatte einen stark reduzierenden Effekt auf die Proliferationsfähigkeit von mit Phytohämagglutinin (PHA) stimulierten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) *in vitro* (47). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich nach operativem Trauma die Reaktivität zirkulierender Monozyten gegenüber bakterieller Stimulation signifikant verringerte (58). Diese verminderte Aktivität konnte über einen Zeitraum von bis zu fünf Tagen nach Trauma beobachtet werden (49) und scheint ein potentieller Risikofaktor für postoperative septische Komplikationen zu sein (58). In weiteren tierexperimentellen Studien resultierte eine Störung der PBMC-Funktion durch abdominal-chirurgisches Trauma in einer erhöhten Rate an septischen Komplikationen (4,47). Das Ausmaß der Störung scheint dabei einen entscheidenden Faktor zu spielen. Patienten mit einer Unterdrückung der Proliferations- und Sekretionsfähigkeit von PBMC und zusätzlicher Unterdrückung von isolierten T-Zellen besaßen ein deutlich höheres Mortalitätsrisiko als Patienten mit alleiniger T-Zell-Funktionsstörung (39). Wiederum konnte in Studien gezeigt werden, dass die Schwere des Traumas selbst einen großen Einfluss auf das Ausmaß

der Störung der Immunantwort besitzt (19,33,84,136). Demnach führten offene, konventionelle Operationen zu einer stärkeren Beeinflussung der zell-vermittelten Immunantwort als laparoskopische Operationen (26,56,57,108,125).

Viele Versuche, durch Gabe von immunmodulatorischen Substanzen (wie z.B. anti-TNF-Antikörper, Wachstumshormone oder GM-CSF eine Verbesserung der unterdrückten Immunantwort zu erzielen, führten trotz vielversprechender Ergebnisse in präklinischen Studien (40,45,51,63,126) zu keiner signifikanten Senkung der Morbiditäts- und Mortalitätsrate von Patienten nach Trauma und Blutverlust. Substanzen, die lediglich einzelne Zytokine beeinflussen, scheinen demnach keinen Vorteil darzustellen. So könnten andere, über gleichgerichtete Signaltransduktionswege verfügende und von der Therapie unberührte Zytokine für den ausbleibenden Erfolg *in vivo* verantwortlich sein. Möglicherweise liegt die Schwierigkeit auch in der Erfassung des optimalen Therapiezeitpunkts innerhalb des inflammatorischen Verlaufs, da die beteiligten Zytokine zeitabhängigen Änderungen unterworfen sind. Die Fähigkeit zur Modulation auf Ebene der ursächlichen Zelldysfunktion scheint daher für eine erfolgreiche Beeinflussung der postoperativen Immunreaktion von Bedeutung zu sein. Aktuelle klinische und tierexperimentelle Studien bieten bereits richtungsweisende Erkenntnisse, indem sie auf eine geschlechtsabhängige Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock hinweisen.

1.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort

Klinische und experimentelle Studien berichten über den Einfluss des Geschlechts auf die humorale und zell-vermittelte Immunantwort (7). Bei männlichen Versuchstieren zeigte sich eine Unterdrückung der zellulären Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock, die bei weiblichen Tieren nicht nachweisbar war (132). Diese behielten nach traumatisch-hämorrhagischem Schock ihre Sekretionsfähigkeit proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen, bei männlichen Tieren hingegen waren die Makrophagen in ihrer Funktion deutlich beeinträchtigt (5,6,67). Des Weiteren fand sich in klinischen Studien nach operativem Trauma eine bei männlichen Patienten im Vergleich zu weiblichen Patienten anhaltende Verminderung immunkompetenter Lymphozyten (131). Die postoperativ unterdrückte Immunfunktion war beim männlichen Geschlecht mit einer höheren Inzidenz an septischen Komplikationen verbunden (24,43,71,77,89,91,104,130).

Hierbei scheinen die Geschlechtshormone für die geschlechtsspezifische Immunreaktion verantwortlich zu sein (107). Diesbezüglich war eine positive Korrelation zwischen Östrogen-Plasmaspiegeln *in vivo* und der Aktivität zytokinsezernierender Zellen des Immunsystems nachweisbar (65,122,123). Auch der zu beobachtende Rückgang geschlechtsspezifischer Unterschiede mit der altersbedingten Abnahme der Plasmahormonspiegel verdeutlichte den Einfluss der Geschlechtshormone (67,68).

Eine Reihe von Studien weisen sowohl immunprotektive Eigenschaften der Östrogene (v.a. Östradiol) als auch immunsuppressive Effekte der Androgene (v.a. Dihydrotestosteron) auf (1-3,5-7,9,29,68,74,75,117,127,128,133,140). Somit scheint eine vorübergehende perioperative Modulation der Sexualhormon-Plasmaspiegel ein Erfolg versprechender Ansatz zur Behandlung der Immunsuppression durch eine generelle Beeinflussung der an der Immunantwort beteiligten Mediatoren zu sein. Diese Hypothese wird gestützt durch tierexperimentelle Studien, die eine Normalisierung der unterdrückten Immunantwort von männlichen Mäusen durch Reduktion der Testosteronwirkung mittels Kastration oder Gabe des Testosteronrezeptorblockers Flutamid nachweisen (8,133). Die Behandlung der Tiere mit 17β-Östradiol zeigte ebenfalls eine Normalisierung der Immunantwort und verdeutlichte somit die immunprotektive Wirkung von Östrogenen (3,7,29,76,94,127). Darüber hinaus verbesserte die Gabe von 17β-Östradiol kardiovaskuläre und hepatozelluläre Funktionen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock (78,95) und normalisierte bei ovariektomierten weiblichen Mäusen die durch Trauma veränderte Immunantwort (75). Allerdings wird den Östrogenen auch ein erhöhtes Thrombose- und Thrombembolierisiko zugeschrieben (79). Der klinische Einsatz von Östrogenen bei chirurgischen Patienten mit operationsbedingt erhöhtem Thromboserisiko ist daher nicht möglich. Ein großer Stellenwert wird demzufolge dem Steroidhormon Dehydroepiandrosteron (DHEA) beigemessen, dem als Zwischenprodukt im Steroidstoffwechsel ohne thrombogene Eigenschaften selbst immunstimulatorische Effekte nachgesagt werden. So führte die Gabe von DHEA bei männlichen Mäusen zu einer signifikanten Verbesserung der Immunfunktion nach Trauma und hämorrhagischem Schock (3,29).

1.4 Dehydroepiandrosteron (DHEA) als immunmodulatorische Substanz

Die tierexperimentell beobachtete Verbesserung der zellulären Immunität durch DHEA (siehe 1.3) war mit einer signifikanten Erhöhung der Überlebensrate nach traumatisch-hämorrhagischem Schock und nachfolgender Sepsis verbunden (vgl. Abb.1) (3). Dieser Effekt auf die posttraumatische Immunfunktion war dosisabhängig (3,29).

Abb. 1 Angele M.K. et al., 1998

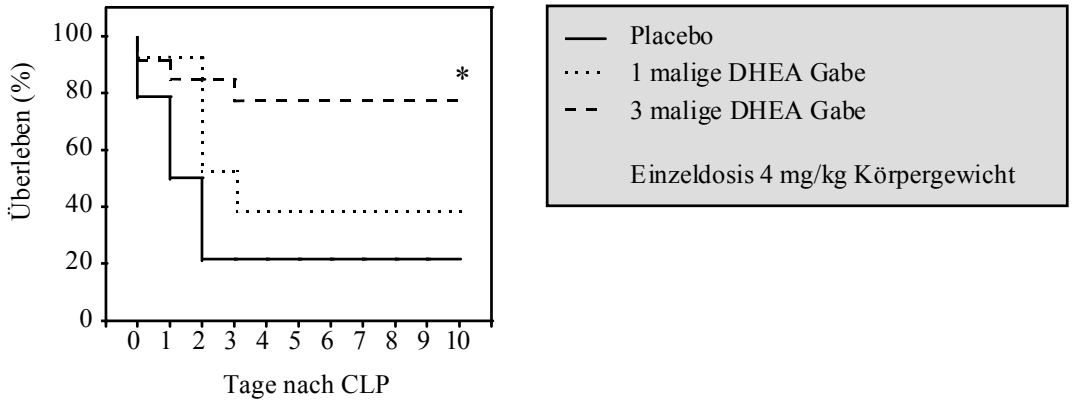

*Abb. 1 Männliche C3H/HeN Mäuse wurden nach traumatisch-hämorrhagischem Schock mit Plazebo, einer einmaligen Dosis DHEA oder dreimalig nach der Flüssigkeitssubstitution behandelt. 48 Std. nach hämorrhagischem Schock wurde bei allen Versuchstieren eine polymikrobielle Sepsis durch CLP (cecal ligation and puncture) induziert und das Überleben über einen Zeitraum von 10 Tagen beobachtet. N=15 Tiere/Gruppe, *p<0,05 vs. Plazebo behandelten Mäusen.*

Für DHEA konnte zusätzlich eine Verbesserung des Überlebens auch nach alleiniger polymikrobieller Sepsis gezeigt werden (102,121). Des Weiteren wurde im Tiermodell durch Therapie mit DHEA eine Reduzierung der Sterblichkeit nach Infektion mit Viren wie *Coxsachie* Virus oder *Herpes simplex* Virus Typ II und Bakterien wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecalis* erzielt (22,55,85).

Dehydroepiandrosteron (DHEA) ist das wichtigste adrenale, steroidale Sexualhormon beim Menschen. DHEA wird in den Nebennieren (Hauptsyntheseort bei Frauen), den Hoden (Hauptsyntheseort bei Männern) und den Ovarien synthetisiert. Durch das Leberenzym Dehydroepiandrosteronsulfotransferase wird es, in etwa dem Verhältnis 1:20 entsprechend, in die stabilere, sulfatierte Form DHEA-S umgewandelt. Der Serumspiegel von DHEA nimmt, ausgehend vom höchsten Wert im jungen Erwachsenenalter, mit steigendem Alter kontinuierlich ab und erreicht um

das 8. Lebensjahrzehnt 10 - 20 Prozent des Maximalwertes (109). DHEA ist Zwischenprodukt in der Synthese von männlichen und weiblichen Steroidhormonen (vgl. Abb.2) und kann in Abhängigkeit vom hormonellen Milieu zu Androgenen oder Östrogenen metabolisiert werden (44). Dabei fungiert DHEA-S als ein an Albumin gebundenes und im Blut zirkulierendes Reservoir (44). Es ist Hauptquelle für die bedarfsorientierte Umwandlung in aktivere Metaboliten, die vorrangig in peripheren Geweben stattfindet (81). Dabei konnte gezeigt werden, dass DHEA bei männlichen Patienten vorrangig zu Östrogenen metabolisiert wird (44). Eine derartige Metabolisierung, wie sie auch in Makrophagen nachgewiesen wurde, könnte eine wichtige Rolle in der lokalen Immunmodulation spielen (116).

Abb. 2

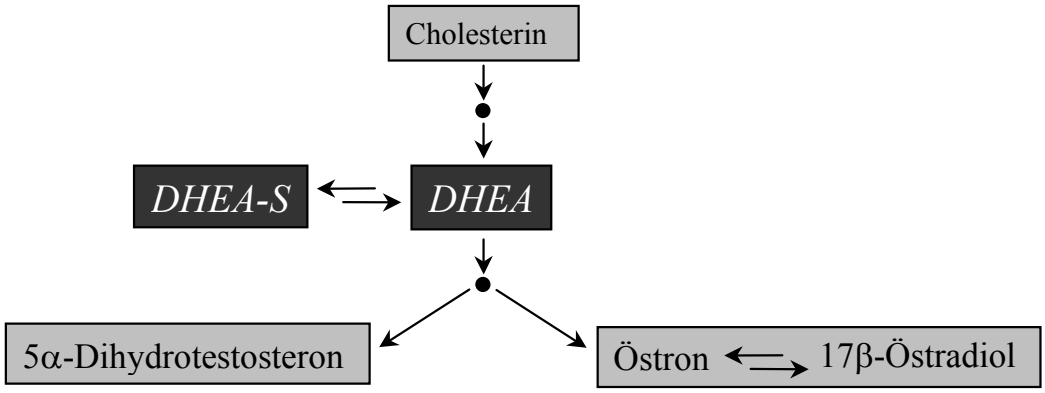

Abb. 2 *Schematische Darstellung der Synthese steroidaler Sexualhormone aus Cholesterin in der Nebenniere und den Hoden bzw. den Ovarien.*

In den USA erfreut sich DHEA als nicht verschreibungspflichtiges Medikament ständig wachsender Beliebtheit. Besonders von der älteren Bevölkerung wird es wegen der ihm nachgesagten Wirkung als „Jungbrunnen“ immer häufiger eingenommen. Diesbezüglich konnten für DHEA vorteilhafte Effekte auf den altersabhängigen Abbau der Gewebefunktion und Knochendichte aufgezeigt werden (21,80,81). Auch senkte DHEA bei regelmäßiger Einnahme die Infektanfälligkeit älterer Menschen (11,20,62). In weitergehenden klinischen Studien zeigte sich eine Korrelation zwischen niedrigen Plasma-DHEA-Spiegeln und Immundefizienz bei älteren Patienten und HIV Patienten im fortgeschrittenen Stadium (37,86). Ferner konnten signifikant höhere Antikörper-Plasmaspiegel nach Durchführung einer Influenza-Impfung bei mit DHEA behandelten Patienten im Vergleich zu unbehandelten Patienten beobachtet werden (11,46). Diese Ergebnisse deuten darauf

hin, dass DHEA bei immunschwächeren Patienten immunprotektive Eigenschaften besitzt. Bemerkenswert ist, dass in sämtlichen Studien, bei denen DHEA über einen Zeitraum von bis zu einem Jahr und in Dosen von bis zu 1600 mg eingenommen wurde, keine nennenswerten Nebenwirkungen auftraten (13-15,53,83,96,137). Hingegen verbesserte die DHEA-Einnahme das subjektive Wohlbefinden („well-being“) (14,137). Trotz dieser deutlichen Effekte von DHEA bleibt dessen Bedeutung für Immunfunktionsstörungen chirurgischer Patienten noch unklar und soll im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* untersucht werden.

Die genauen Mechanismen, die den immunstimulatorischen Effekten von DHEA nach traumatisch-hämorrhagischem Schock zugrunde liegen, sind unbekannt. Im Tiermodell konnte jedoch *in vitro* eine Zunahme der Splenozyten-Proliferation nach Zusatz von DHEA zum Kulturmedium sowie eine Normalisierung der Milz- und Peritonealmakrophagen-Zytokinsekretion *in vivo* nachgewiesen werden (3,29,70). Interessante Ergebnisse tierexperimenteller Studien zeigten, dass durch den Zusatz des Östrogenrezeptorblockers Tamoxifen der immunstimulierende Effekt von DHEA auf T-Zellen *in vitro* verhindert wurde (29). Diese und weitere Ergebnisse anderer Studien (88,98) weisen darauf hin, dass die immunstimulierenden Effekte von Östrogen und DHEA auf Immunzellen zu einem Teil durch Östrogenrezeptoren vermittelt werden. Dieser vermutete Wirkmechanismus soll unter anderem in dieser Arbeit untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass DHEA unterdrückende Effekte von Dexamethason auf die Lymphozytenfunktion zu antagonisieren vermag (23). Somit könnten die immunprotektiven Effekte unter anderem auch durch eine Hemmung der immunsuppressiven Eigenschaften von Glukokortikoiden vermittelt sein (10,23).

In klinischen Studien fand sich *in vitro* und *in vivo* eine Zunahme der NK-Zellen Zytotoxizität (28,118). Weitere Studien deuten auf einen direkten Effekt von DHEA auf humane Immunzellen hin. Diesbezüglich fanden Meikle et al. Hinweise auf intrazelluläre DHEA-Rezeptoren bei Immunzellen (T-Zellen, Monozyten) (92,93,106), die möglicherweise ebenfalls zu der Immunstimulierung durch DHEA beitragen.

Zusammenfassend weisen experimentelle und klinische Studien auf eine Immunsuppression nach großen abdominellen Operationen hin, die mit einer erhöhten Inzidenz septischer Komplikationen und einer nicht zu vernachlässigenden Mortalitätsrate verbunden ist. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass durch die

Therapie mit dem Steroidhormon DHEA eine Immunsuppression nach Trauma und hämorrhagischem Schock verhindert werden kann. Ferner führte die Behandlung von Mäusen mit DHEA zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebensrate nach traumatisch-hämorrhagischem Schock und anschließend induzierter polymikrobieller Sepsis. Auch am Menschen wirkte sich die Einnahme von DHEA aus verschiedenster Sicht positiv aus. Trotz dieser Tatsache und der vielversprechenden tierexperimentellen Beobachtungen steht eine klinische Bestätigung der immunprotektiven Effekte von DHEA bislang noch aus und soll im Rahmen dieser prospektiven, klinisch-experimentellen Studie untersucht werden.

1.5 Studienabsicht

DHEA beeinflusst sowohl im Tiermodell als auch im Menschen die humorale und zelluläre Immunität. Tiere profitierten nach Trauma und hämorrhagischem Schock von einer Behandlung mit DHEA. Es ist jedoch unklar, ob DHEA auch bei abdominal-chirurgischen Patienten ein immunmodulatorisches Potential besitzt. Dies soll *in vitro* anhand der Funktion perioperativ gewonnener und mit DHEA behandelter PBMC untersucht werden. Ferner soll geprüft werden, ob sich aus den möglichen immunmodulatorischen Eigenschaften potentiell Therapieoptionen für Patienten nach abdominal-chirurgischen Operationen ergeben.

2 Fragestellung und Versuchsansätze

Aus den vorherigen Ausführungen ergaben sich folgende Fragen, die es im Rahmen dieser Arbeit zu beantworten galt:

- **Effekt von DHEA auf die postoperative PBMC-Funktion**

  Besitzt DHEA stimulierende Effekte auf die nach abdominal-chirurgischen Operationen unterdrückte Immunfunktion peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) und sind diese dosisabhängig?

Für die Beantwortung dieser Frage erfolgte *in vitro* die Behandlung peripherer mononukleärer Blutzellen mit DHEA in unterschiedlichen Konzentrationen. Als Funktionsparameter wurde nachfolgend die LPS induzierte Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine mittels ELISA in den Zellkulturüberständen analysiert.

- **Einfluss von postoperativ gewonnenem Plasma und PBMC auf die DHEA-Wirkung**

  Hat DHEA unterschiedliche Wirkungen auf prä- und postoperative PBMC? Welchen Effekt besitzen präop. Plasma und postop. Plasma auf die Wirkung von DHEA?

In Gegenwart von DHEA wurden im oben genannten Versuchsansatz verschiedene Inkubations-Kombinationen mit Plasma und PBMC durchgeführt. Dafür wurde präoperatives Plasma mit postoperativen Zellen kultiviert und umgekehrt. Als Funktionsparameter wurde die *in vitro* Zytokinsekretion mittels ELISA in den Zellkulturüberständen analysiert.

- **LPS-Sensitivität von PBMC**

  Gibt es einen synergistischen Effekt von DHEA und LPS?

Im oben genannten Versuchsansatz erfolgte die Kultivierung der mit DHEA behandelten PBMC ohne Stimulation sowie mit Stimulation durch verschiedene

Lipopolysaccharid (LPS) Konzentrationen. Als Funktionsparameter wurde die *in vitro* Zytokinsekretion mittels ELISA analysiert.

- **Einfluss von Tamoxifen auf die DHEA-Wirkung**
  Ist der Effekt von DHEA über den Östrogenrezeptor vermittelt?

Ein potentieller Wirkmechanismus wurde im oben genannten Versuchsansatz durch Zusatz des Östrogenrezeptorblockers Tamoxifen zum Kulturmedium untersucht. Als Funktionsparameter wurde auch hier die *in vitro* Zytokinsekretion mittels ELISA analysiert.

- **Effekt von DHEA auf die RNA-Expression**
  Kann für DHEA auch ein Effekt auf die PBMC RNA-Expression proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden?

Im oben genannten Versuchsansatz erfolgte eine verkürzte DHEA Behandlung von PBMC für die RNA-Extraktion. Zusätzlich wurde auch eine RNA-Extraktion aus mit DHEA behandeltem Vollblut durchgeführt. Der quantitative Nachweis erfolgte durch Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction (PCR) und nachfolgender Gelelektrophorese.

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign und Rekrutierung der Patienten

In einer prospektiven, klinisch-experimentellen Studie wurde *in vitro* die Funktion peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) von chirurgischen Patienten untersucht.

3.1.1 Kriterien für die Rekrutierung

Die Größe des chirurgischen Traumas beeinflusst die postoperativ resultierende Immundysfunktion. Als Ausgangspunkt für die Untersuchungen dieser Studie sollte eine deutliche Suppression der PBMC-Funktion dienen. Demzufolge wurden nur solche Patienten rekrutiert, bei denen auf Grund des zeitlichen und chirurgischen Operationsausmaßes eine postoperative Beeinträchtigung der PBMC Zellfunktion zu erwarten war. Die Auswahl beschränkte sich vorwiegend auf Patienten mit Resektionen im Gastrointestinaltrakt und Leber(teil)resektionen. Die zugrunde liegende Erkrankung war jedoch von untergeordnetem Interesse, es wurden sowohl Patienten mit benignen als auch Patienten mit malignen Erkrankungen rekrutiert.

Die Arbeit untersucht die Immunfunktion und deren Modulation durch Hormone. Die Immunfunktion und das hormonelle Milieu sollten deshalb zu Beginn der Studie weitgehend frei von störenden Einflüssen sein. Um dies sicherzustellen, wurden folgende *Ausschlusskriterien* festgelegt: Schwangerschaft, Hormontherapie, Multimorbidität, bestehender Alkohol- und Drogenabusus, akut dekompensierte Herzinsuffizienz, Leberzirrhose (> Stadium Child A), portale Hypertension, respiratorische Insuffizienz (pO_2 bei Raumluft < 60mmHg), Zustand nach Bestrahlung oder Chemotherapie.

3.1.2 Patienten

Zwischen Oktober 2001 und März 2003 wurden insgesamt 10 Frauen und 20 Männer mit abdominal-chirurgischen Operationen aus der Chirurgischen Klinik

des Klinikums Großhadern in die Studie zur Modulation der perioperativen Immunfunktion aufgenommen.

Die Durchführung der Untersuchungen zur perioperativen Immunfunktion bei männlichen und weiblichen Patienten aus der Chirurgischen Klinik wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt (Projektnummer 178/00). Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie.

Die Studie schloss Patienten im Alter von 32 bis 72 Jahren ein, das mittlere Alter der Patienten lag bei 60,4±10,0 Jahren. Das Durchschnittsalter der männlichen Patienten war 64,4±9,9 Jahre, während die weiblichen Patienten durchschnittlich 58,3±10,5 Jahre alt waren. Die Patienten unterzogen sich einer präoperativen Diagnostik entsprechend der zugrunde liegenden Erkrankung, bestehend aus Röntgen-Thorax, Computertomographie des Abdomens und gegebenenfalls des Thorax, Abdomen-Sonographie, Routine-Laboruntersuchungen und weiterführenden Laboruntersuchungen (Tumormarker) sowie kombinierter Rekto-Koloskopie. Bei allen Patienten wurden in Dauer und Größe des Eingriffs vergleichbare abdominal-chirurgische Operationen durchgeführt. Überwiegend waren das Resektionen im Gastrointestinaltrakt (vgl. Tab.1). Die durchschnittliche Operationsdauer betrug 3 Stunden ± 1¼ Stunden.

Tab. 1

Operationen		**N**	**Anteil in %**
Resektionen im Gastrointestinaltrakt		**21**	**70**
	Hemicolektomie	8	
	Sigma-Resektion	6	
	Rektumresektion	4	
	Gastrektomie	2	
	Whipple-OP	1	
Resektionen der Leber		**5**	**16,7**
	Hemihepatektomie	3	
	Leber-Segmentresektion	2	
Sonstige		**4**	**13,3**

Tab. 1 Tabellarische Übersicht über die an den Patienten durchgeführten Operationen und deren Anteil an der Studie.

Für die Durchführung wurde das gesamte Patientenkollektiv auf die verschiedenen Versuchsansätze aufgeteilt. Einzelne Patienten sind durch eine zeitliche Überschneidung in der Versuchsdurchführung in mehr als einer Gruppe vertreten.

3.2 Untersuchungsmethoden

Aufgabe dieser Arbeit war die Untersuchung möglicher immunstimulatorischer Effekte von DHEA auf eine gestörte Funktion peripherer mononukleärer Zellen. Für die Erfassung der durch die Operation verursachten Störung wurden zwei Blutabnahmen gewählt: eine Blutprobe wurde präoperativ im Operationssaal und eine zweite Blutprobe zwei Stunden nach Operationsende entnommen. Die Blutproben wurden jeweils unmittelbar nach Entnahme verarbeitet.

3.2.1 Gewinnung von Gewebe

Durch venöse Punktion der Armvenen oder aus dem liegenden Zentralvenenkatheter wurde zu den oben genannten Zeitpunkten jeweils 40 ml Blut entnommen. Die Entnahme erfolgte mit zwei heparinisierten 20 ml Spritzen (0,5 ml Heparin pro Spritze). Bei einem Teil der Patienten wurde zusätzlich 10 ml Blut in Serumröhrchen zur Bestimmung des prä- und postoperativen DHEA-Plasmaspiegels abgenommen.

3.2.1.1 Vollblut, Plasma

Das heparinisierte Blut wurde in 50 ml Röhrchen (Falcon BlueMax, Becton Dickinson Labware, NJ, USA) für 8 Minuten bei 4 °C und 520 × g zentrifugiert und anschließend vom obenauf stehenden Plasma durch Abpipettieren getrennt. Das so gewonnene Plasma wurde bis zur Weiterverarbeitung in 50 ml Röhrchen auf Eis gelagert. Für die RNA-Extraktion aus Vollblut wurden unbearbeitete heparinisierte Blutproben verwendet.

3.2.1.2 Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC)

Die Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) erfolgte über einen Dichtegradienten mittels Ficoll-Trennung. Dafür wurde das vom Plasma getrennte Blut mit HBSS-Lösung (BioWhittaker, Europe) auf das Doppelte des

Ausgangsvolumens (vor Zentrifugation) verdünnt und vorsichtig auf 10 ml Biocoll Separating Solution (Ficoll, Biochrom AG, Deutschland) in ein 50 ml Röhrchen pipettiert. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 950 × g und Raumtemperatur wurde die Monolayer-Zellschicht aufgenommen und nachfolgend zweimalig mit 50 ml HBSS-Lösung gewaschen (450 × g, 15 Minuten, 10 °C, mit anschließender Resuspension). Die so gewonnenen PBMC wurden in RPMI 1640 Medium (BioWhittaker, Europe) mit 1 % Gentamycin überführt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

3.2.2 Dehydroepiandrosteron (DHEA)

Das 1931 von A. Blutenandt (deutscher Chemiker und Nobelpreisträger) im menschlichen Urin entdeckte C19-Steroid besitzt die Strukturformel 3β-Hydroxy-5-androsten-17-on (vgl. Abb.3). Für die Untersuchung des Einflusses von DHEA auf die postoperative PBMC-Funktionsstörung wurde in dieser Studie Dehydroepiandrosteron (DHEA) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) verwendet. Das Pulver wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) als Trägersubstanz gelöst, in Stock-Lösungen verschiedener Konzentrationen (10^{-2}M, 10^{-3}M, 10^{-5}M, 10^{-7}M) aliquotiert und bei –20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Am Tag des Experiments erfolgte die weitere Verdünnung des in DMSO gelösten DHEA mit Kulturmedium (RPMI 1640 mit Gentamycin). Der DMSO-Anteil am Kulturmedium betrug 1 ‰ DMSO.

Abb. 3

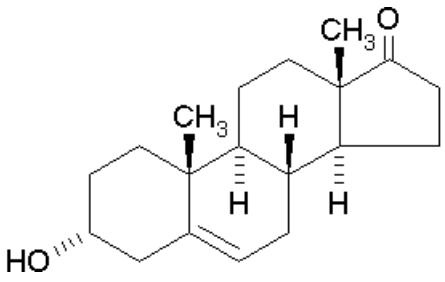

Abb. 3 Strukturformel des Steroidhormons DHEA.

3.2.3 *In vitro* Zellkulturverfahren

3.2.3.1 Kulturverfahren für die Messung der Zytokinsekretion

Die wie oben beschrieben isolierten PBMC wurden unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer mit Trypanblau als Vitalitätsmarker gezählt, aliquotiert und $0{,}5\times10^6$ Zellen pro well (500 µl) in einer 24-well Platte (TPP®, Schweiz) bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dem Kulturmedium wurde zusätzlich autologes, prä- bzw. postoperatives Plasma (entsprechend den kultivierten Zellen) in den Anteilen 33,3 % und 20 % des Gesamtvolumens zugesetzt. Auf den in Zellkulturen üblichen Einsatz von FCS (fetal calf serum) wurde wegen des eingesetzten Patientenplasmas - auch im Hinblick auf dessen zu untersuchende Wirkung - verzichtet. Die Stimulation der PBMC erfolgte mit 1 µg/ml Lipopolysaccharid W (LPS, aus E. coli 055:B5, Sigma Chemicals) für die Dauer von 16 Stunden.

3.2.3.2 Kulturverfahren für die RNA-Extraktion

Für die nachfolgende Isolierung von RNA aus den PBMC wurden diese zu je $5–10\times10^6$ Zellen pro well einer 6-well Platte (TPP®, Schweiz) bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dem Kulturmedium (RPMI 1640 mit Gentamycin) wurden zusätzlich anteilige 33,3 % prä- oder postoperatives Patientenplasma zugesetzt. Die Stimulation der PBMC erfolgte mit 1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS) für insgesamt 2 Stunden.

Das zur RNA-Isolierung ebenfalls verwendete Vollblut wurde in 14 ml Röhrchen (TPP®, Schweiz) bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit unter ständiger Rotation kultiviert. Um eine mögliche zeitabhängige RNA Produktion zu erfassen, wurden die Proben mit 1 µg/ml LPS für die Dauer von 2 Stunden sowie für 4 und 8 Stunden stimuliert.

3.2.4 Durchführung der Versuchsansätze

3.2.4.1 Effekt von DHEA auf die postoperative PBMC-Funktion

Die in Kultur gebrachten Zellen wurden zum Teil mit den ansteigenden DHEA Konzentrationen 10^{-10}M, 10^{-8}M, 10^{-6}M und 10^{-5}M im Kulturmedium behandelt. Dabei entspricht 10^{-8}M der physiologischen Konzentration im Plasma. Dem anderen Teil der Zellen wurde eine gleiche Menge an Medium zugesetzt. Nach der Inkubation mit DHEA für den Zeitraum von 1 Stunde folgte die Stimulation mit LPS (siehe oben) bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit für die Dauer von 16 Stunden.

Abb. 4

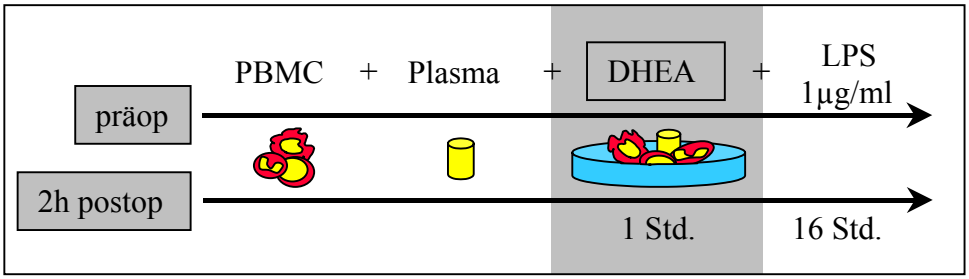

Abb. 4 Schematische Darstellung des Versuchablaufs der DHEA Behandlung.

3.2.4.2 Einfluss von Plasma und PBMC auf die DHEA-Wirkung

Zur Beantwortung der Frage, welchen Effekt präop. Plasma und postop. Plasma bzw. präop. und postop. PBMC auf die Wirkung von DHEA besitzen, wurde neben der Inkubation der Zellen mit dem jeweils entsprechenden Plasma zusätzlich präoperatives Plasma mit postoperativen PBMC und postoperatives Plasma mit präoperativen PBMC kultiviert. Die Behandlung mit DHEA und die Stimulierung erfolgten unter den oben beschriebenen Bedingungen.

Abb. 5

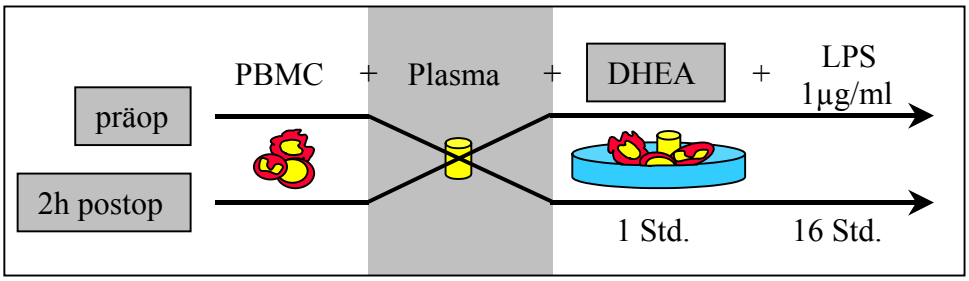

Abb. 5 *Schematische Darstellung des Versuchablaufs zur Untersuchung des Einflusses von prä- und postoperativem Plasma und PBMC auf die DHEA-Wirkung.*

Zur Untersuchung der Wirkung des Plasmas selbst wurden zusätzlich postoperative PBMC mit prä- und postoperativem Plasma ohne dem Beisein von DHEA untersucht.

3.2.4.3 LPS-Sensitivität von PBMC

Um synergistische Effekte von DHEA und LPS zu erfassen, wurde die oben beschriebene DHEA Behandlung peripherer mononukleärer Blutzellen sowohl ohne Stimulation, als auch mit den ansteigenden LPS Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml durchgeführt.

Abb. 6

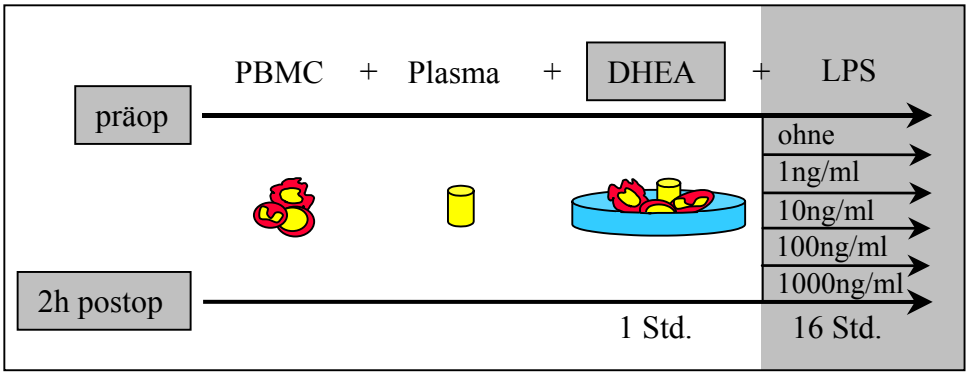

Abb. 6 *Schematische Darstellung des Versuchablaufs mit unterschiedlicher LPS Stimulation.*

3.2.4.4 Einfluss von Tamoxifen auf die DHEA-Wirkung

Zur Untersuchung des vermuteten Wirkmechanismus wurden ausgewählte Proben vor der Zugabe von DHEA mit dem Östrogenrezeptorblocker Tamoxifen (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) (10^{-6}M) für die Dauer von einer Stunde vorbehandelt. Diesbezüglich blockte die Zugabe von Tamoxifen eine Stunde vor DHEA den stimulatorischen Effekt von DHEA auf die Splenozytenproliferation bei Mäusen (29). Anschließend erfolgte die Behandlung mit 10^{-5}M DHEA für 1 Stunde und die LPS-Stimulation wie oben beschrieben.

Abb. 7

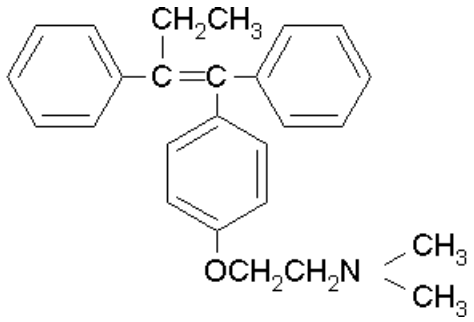

Abb. 7 *Strukturformel des Östrogenrezeptorblockers Tamoxifen (als Citrat).*

Abb. 8

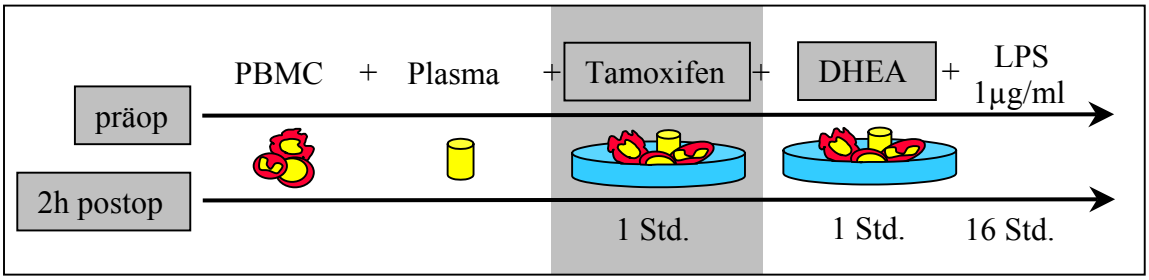

Abb. 8 *Schematische Darstellung des Versuchablaufs der Östrogenrezeptor-Blockung mit Tamoxifen und anschließender DHEA Behandlung.*

3.2.4.5 Effekt von DHEA auf die RNA-Expression

Sowohl die in Kultur gebrachten PBMC (siehe 3.2.3.2) als auch das Vollblut wurden zum Teil mit 10^{-5}M DHEA für die Dauer von 1 Stunde behandelt. Dem anderen Teil wurde die gleiche Menge Medium zugesetzt. Anschließend folgte

eine zweistündige, für das Vollblut zusätzlich eine vier- sowie achtstündige LPS-Stimulation und Inkubation wie oben beschrieben.

Abb. 9

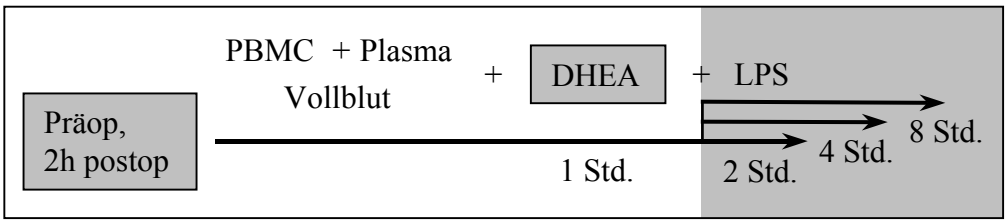

Abb. 9 *Schematische Darstellung des Versuchablaufs der DHEA Behandlung für die RNA-Extraktion.*

3.2.5 Zytokinbestimmung in den Zellüberständen

Die Zellkulturüberstände wurden nach 16-stündiger Inkubation mit LPS, DHEA und Tamoxifen bei 37 °C und 5 % CO_2 durch Zentrifugation der Zellsuspension (5 Min., 4 °C und 4400 × g) isoliert und anschließend in Aliquots bei –70 °C aufbewahrt. Als Funktionsparameter der PBMC wurden die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1β, TNF-α und IL-12p70 sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 in den Überständen mittels Sandwich ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) bestimmt.

Zur Messung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1β, TNF-α wurden spezifische ELISA-Kits (DuoSet®) der Firma R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) entsprechend der Beschreibung der Hersteller eingesetzt. Die Bestimmung von IL-12p70 und IL-10 erfolgte mittels hochsensitiven OptEIA™ Elisa Kits der Firma BD Biosciences (San Diego, CA, USA) ebenfalls nach dem vorgegebenen Protokoll. Die Sensitivität der ELISA-Kits war wie folgt: 4,7 pg/ml für IL-6, 3,9 pg/ml für IL-1β, 15,6 pg/ml für TNF-α, 4 pg/ml für IL-12p70 und 2 pg/ml für IL-10. Alle verwendeten Antikörper und Reagenzien waren in den Kits enthalten oder wurden nach den Vorgaben der Hersteller angesetzt. Um die Sensitivität des ELISA zu erhöhen und die O.D.-Werte (optical density) im mittleren Bereich der Standardkurve zu halten, erfolgte vor Verarbeitung eine Verdünnung der Proben gemäß den Herstellervorgaben.

3.2.5.1 Bestimmung von IL-6, IL-1β und TNF-α mittels ELISA

Zur Durchführung wurden 96-well Kulturplatten (Nunc-Immuno™Plate, Maxisorp™, Dänemark) über Nacht bei Raumtemperatur mit 2 µg/ml eines monoklonalen Maus Anti-human IL-6 Antikörpers oder 4 µg/ml monoklonalen Maus Anti-human IL-1β bzw. TNF-α Antikörper in PBS (phosphate buffered saline), pH 7,3 inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Proben und der Standard (300 pg/ml rekombinantes human IL-6, 250 pg/ml rekombinantes human IL-1β bzw. 1000 pg/ml rekombinantes human TNF-α mit seriellen zweifachen Verdünnungen) in zweifacher Ausführung aufgetragen und für die Dauer von 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten nach mehrmaligem Waschen für weitere 2 Stunden mit einem biotinylierten Ziege Anti-human Antikörper (200 ng/ml für IL-6, 100 ng/ml für IL-1β und 300 ng/ml für TNF-α) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Platten wurden nochmals gereinigt und Horseradish Peroxidase für 20 Min. bei RT hinzugefügt. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl der Substrate Solution (1:1 Gemisch aus Tetramethylbenzidin (TMB) und H_2O_2) in jedes well pipettiert. Dadurch wurde eine Farbreaktion ausgelöst, deren Intensität mit der Menge von IL-6, IL-1β bzw. TNF-α korreliert. Die Farbreaktion wurde nach 20 Min. durch Zugabe von 50 µl 2 N H_2SO_4 gestoppt. Die Absorption wurde bei 450nm mit einem Mikroplatten-Lesegerät (v_{max} kinetic microplate reader, Molecular Devices) erfasst. Die Konzentration an IL-6, IL-1β und TNF-α wurde mit Hilfe der Standardkurve aus human IL-6, human IL-1β und human TNF-α ermittelt und in der Einheit pg/ml angegeben.

3.2.5.2 Bestimmung von IL-12p70 und IL-10 mittels ELISA

Für die Bestimmung von IL-12p70 und IL-10 wurden die im Kit enthaltenen und bereits mit monoklonalen Anti-human IL-12p70 bzw. IL-10 Antikörper vorbehandelten Platten verwendet (adhärenter primärer Antikörper). Die Proben und der Standard (500 pg/ml für IL-12p70 und IL-10 mit seriellen zweifachen Verdünnungen) wurden in zweifacher Ausführung aufgetragen und für die Dauer von 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten nach fünfmaligem Waschen mit biotinylierten, monoklonalen Anti-human IL-12p70 bzw. IL-10 Antikörpern zusammen mit Avidin-horseradish Peroxidase für 1 Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Platten sorgfältig jeweils mit einer Einwirkdauer von bis zu 1 Min. siebenmal gewaschen. Durch Zugabe von 100 µl TMB One-Step Substrate Reagenz in jedes well wurde eine Farbreaktion ausgelöst, die nach 30 Min. Reaktionszeit (bei Raumtemperatur und im Dunkeln) mit 50 µl/well 1M Phosphorsäure gestoppt wurde. Die Absorption wurde bei 450nm mit einem Mikroplatten-Lesegerät (v_{max} kinetic microplate reader, Molecular Devices) erfasst. Die Konzentration von IL-12p70 und IL-10 wurde mit Hilfe der Standardkurven ermittelt und in der Einheit pg/ml angegeben.

3.2.6 RNA-Extraktion und *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Zum Nachweis und zur Quantifizierung der RNA-Expression von IL-6, IL-1β und TNF-α wurde die RNA aus PBMC unter Verwendung des RNeasy Mini Total RNA Systems von Qiagen® (Hilden, Deutschland) und die RNA aus Vollblut unter Verwendung des QIAamp® RNA Blood Mini Kits (Qiagen®) isoliert und so die Gesamt RNA aus den Zellen gewonnen. Die Bestimmung erfolgte in Anlehnung an die Protokolle des Herstellers wie folgt: die PBMC wurden mit 600 µl Lysis Puffer (RLT Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol, RNeasy Mini Kit) durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren lysiert. Nach Zugabe der gleichen Menge (600 µl) an 70 % Ethanol wurde das Gemisch in „RNeasy spin columns“ pipettiert und die RNA durch Zentrifugation bei 8000 × g für 20 Sekunden an die Säulenmembran gebunden. Im Anschluss wurde die RNA mehrmals gewaschen, zunächst mit 700 µl RW1 Puffer (RNeasy Mini Kit) bei 8000 × g für 20 Sek. und anschließend mit je 500 µl RPE Puffer (RNeasy Mini Kit) bei 8000 × g für 20 Sek. sowie weitere 2 Min. bei voller Geschwindigkeit (20.000 × g). Nach darauf folgender Leerzentrifugation bei voller Geschwindigkeit für 1 Min. wurden 50 µl RNase freies Wasser auf die Membran pipettiert und die RNA durch einminütige Zentrifugation (8000 × g) aus der Membran gelöst.

Zur Isolation der RNA aus dem Vollblut wurde 1,5 ml des kultivierten Blutes mit 7,5 ml EL Puffer (QIAamp® RNA Blood Mini Kit) zur Erythrozytenlyse versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 400 × g und 4 °C. Anschließend wurde das Pellet mit 3 ml EL

Puffer resuspendiert und nochmals bei 400 × g und 4 °C für 10 Min. zentrifugiert. Das so gewonnene Leukozyten-Pellet wurde durch Zugabe von 600 µl Lysis Puffer (RLT Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol, QIAamp® RNA Blood Mini Kit) und vorsichtiges Auf- und Abpipettieren lysiert. Das Lysat wurde in „QIAshredder spin columns“ pipettiert und durch 2-minütige Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit homogenisiert. Nach Zugabe von 600 µl Ethanol 70 % wurde das Gemisch in „QIAamp spin columns“ pipettiert und die RNA durch Zentrifugation bei 8000 × g für 15 Sekunden an die Säulenmembran gebunden. Im Anschluss wurde die RNA mehrmals gewaschen, zunächst mit 700 µl RW1 Puffer (QIAamp® RNA Blood Mini Kit) bei 8000 × g für 15 Sek. und anschließend mit je 500 µl RPE Puffer (QIAamp® RNA Blood Mini Kit) bei 8000 × g für 15 Sek. sowie weitere 3 Min. bei voller Geschwindigkeit (20.000 × g). Nach darauf folgender Leerzentrifugation bei voller Geschwindigkeit für 1 Min. wurden 50 µl RNase freies Wasser auf die Membran pipettiert und die RNA durch 1-minütige Zentrifugation (8000 × g) aus der Membran gelöst. Anschließend wurde die Gesamt RNA der so erhaltenen Proben spektrophotometrisch quantifiziert (Absorption bei 260 nm und 280 nm).

Aliquots der Proben wurden in einer reversen Transkription in die stabilere cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden 2 µg der RNA verwendet und mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 15,7 µl aufgefüllt. Es folgte die Denaturierung der RNA bei 75 °C für 3 Minuten. Im Anschluss wurden 14,3 µl des Master Mix hinzugegeben und die Proben für die Dauer von 1 Std. bei 37 °C inkubiert. Die Zusammensetzung des Master Mix war wie folgt: je Probe 1 µl Oligo-Primer $p(dT)_{15}$, 6 µl 5 × MMLV Puffer, 1,5 µl dNTP’s, 0,8 µl RNase Inhibitor, 3 µl RNase freies Wasser und 2 µl Moloney-Murine-Leukemia-Virus (MMLV) Reverse Transcriptase. Die reverse Transkription wurde mit 10-minütiger Inkubation bei 94 °C beendet und die cDNA bei –40 °C konserviert.

In einer nachfolgenden PCR wurde aus der zuvor gewonnenen cDNA mit spezifischen Primern der Firma Metabion (Martinsried) die mRNA für IL-1β, TNF-α und IL-6 amplifiziert (vgl. Tab. 2). Außerdem wurde von jeder Probe eine PCR für das housekeeping gene GAPDH durchgeführt, um eine semiquantitative Auswertung der Ergebnisse zu ermöglichen. Für alle Untersuchungen wurde der Thermocycler „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf verwendet. Im Einzelnen wurden je Probe 47 µl des PCR Master Mix eingebracht und 3 µl der cDNA zugegeben. Der

PCR Master Mix setzte sich wie folgt zusammen: je Probe 5 µl Taq-Puffer (10 ×), 1 µl dNTP's, 0,5 µl Primer forward, 0,5 µl Primer reverse, 39,8 µl RNase freies Wasser und 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/ µl). Nach 2-minütiger Denaturierung erfolgten insgesamt 25 Zyklen mit folgendem Ablauf: 30 Sekunden Denaturierung der DNA bei 94 °C, 30 Sekunden Primer-Anlagerung bei 64 °C (für GAPDH 65 °C) und 30 Sekunden DNA-Synthese bei 72 °C. Nachfolgend wurden je 10 µl des PCR Produkts mit 2 µl eines Farbstoffs und Elektrophoreseträgers (6 × Loading Dye Solution, MBI Fermentas) vermischt, in einem Agarosegel (1,2 %, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) mit Ethidiumbromid (3 µl je 100 ml Gel) (BioRad Laboratories, Hercules, USA) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (120 V, 100 mA, 12,5 W). Als Marker diente der 100 bp DNA ladder GeneRuler™ der Firma MBI Fermentas. Anschließend wurde das Gel im ultravioletten Licht sichtbar gemacht und photographiert (Gel-Pro® Imager). Die mRNA Menge der Zytokine IL-1β, TNF-α und IL-6 sowie der GAPDH im photographierten Ethidiumbromidgel wurde anhand des Analysenprogrammes „Gel-Pro® Analyzer 4.0" (Media Cybernetics) densitometrisch quantifiziert. Aus den resultierenden OD-Werten wurde der Quotient aus OD-Wert des jeweiligen Zytokins (Zähler) und OD-Wert der GAPDH (Nenner) für jede einzelne Probe gebildet und die so in Relation gesetzten Ergebnisse untereinander verglichen.

Tab. 2

Zytokin	**Primer-Sequenz**
IL-1β	5´-CTG ATG GCC CTA AAC AGA TGA AG-3´ (forward) 5´-GGT CGG AGA TTC GTA GCA GCT GGA T-3´ (reverse)
TNF-α	5´- ATC TTC TCG AAC CCC GAG TGA-3´ (forward) 5´- CGG TTC AGC CAC TGG AGC T-3´ (reverse)
IL-6	5´-ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC-3´ (forward) 5´-GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G-3´ (reverse)
Housekeeping Gene	**Primer-Sequenz**
GAPDH	5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3'(forward) 5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3' (reverse)

Tab. 2 Tabellarische Übersicht über die verwendeten Primer der Firma Metabion.

3.2.7 Verwendung von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel für DHEA

Der in der Literatur beschriebene Einsatz des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) als Trägersubstanz für DHEA hatte keinen Einfluss auf die Zytokinsekretion von PBMC (119). Um auch in dieser Studie eine direkte Wirkung des verwendeten DMSO auf die *in vitro* kultivierten PBMC zu erkennen, wurde in einem extra Versuchsansatz der Einfluss von verschiedenen DMSO Konzentrationen untersucht. Dafür wurden PBMC von drei gesunden Probanden unter den schon beschriebenen Bedingungen kultiviert. Zusätzlich wurde dem Kulturmedium die 0-, 0,1-, 1-, 5-, 10- und 100-fache Menge des in den anderen Versuchsansätzen verwendeten DMSO zugesetzt. Der Einfluss von DMSO auf die PBMC-Funktion wurde anhand der mittels ELISA bestimmten IL-6 Ausschüttung analysiert.

3.2.8 PBMC Subpopulationen

Um eine Beeinflussung der PBMC-Subpopulationen durch das operative Trauma erkennen zu können, wurden die Zellen sowohl präoperativ als auch postoperativ mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Bestimmung der Subpopulationen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie des Klinikum Großhadern.

3.2.8.1 Probenvorbereitung

Für die Untersuchung wurde durch venöse Punktion das Blut mit EDTA Sammelröhrchen (Kabe, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) entnommen. Mit Hilfe eines Coulter STKS Analysiergerätes (Beckman Coulter, Hialeah, Fla., USA) erfolgte die automatische Bestimmung der Leukozyten-Zellzahlen. Zusätzlich erfolgte eine manuelle Differenzierung der Zellen.

Die immunphänotypische Differenzierung der Lymphozyten erfolgte unter Verwendung des Simultest™ IKM Lymphocyte Kit der Firma Becton Dickinson (BD, San Jose, California, USA) und in Anlehnung an die Protokolle der Hersteller. Zur Markierung wurden fluorochrommarkierte (Fluorescein-Isocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE)) monoklonale Antikörper von der Maus verwendet (vgl. Tab. 3). Hierfür wurden je 50 µl Vollblut mit 10 µl des monoklonalen Antikörpers (anti-CD3,

anti-CD4 und anti-CD8 (T-Zellen), anti-CD16 und anti-CD56 (NK-Zellen), anti-CD19 (B-Zellen)) für 10 Min. im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch Zusatz von FACS Lysing Solution (Becton Dickinson) für die Dauer von 10 Minuten. Nach Zentrifugation bei 300 × g und RT für 5 Min. wurde das Pellet resuspendiert und mit 2 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden nochmals zentrifugiert (300 × g, RT, 5 Min.) und in 150 µl PBS resuspendiert. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines FACScan-Gerätes (Becton Dickinson) innerhalb von 60 Minuten durchgeführt.

Tab. 3

Oberflächenmarker	**Antikörper**
LeucoGATE (CD45/ CD14)	CD45 FITC (Klon 2D1), CD14 PE (KlonMΦP9)
Negativ-Kontrolle	IgG_1 FITC (Klon X40), IgG_{2a} PE (Klon X39)
CD3/ CD19	CD3 FITC (Klon SK7), CD19 PE (Klon 4G7)
CD3/ CD4	CD3 FITC (Klon SK7), CD4 PE (Klon SK3)
CD3/ CD8	CD3 FITC (Klon SK7), CD8 PE (Klon SK1)
CD3/ CD16 + CD56	CD3 FITC (Klon SK7); CD16+56 PE (CD16 Klon B73.1) (CD56 Klon MY31)

Tab. 3 Tabellarische Übersicht über die im Simultest™ IKM Lymphocyte Kit der Firma Becton Dickinson enthaltenen Antikörper aus der Maus. Anhand ihrer Oberflächenmarker konnten die Zellen durchflusszytometrisch analysiert werden: (CD45) Leukozyten, (CD14) Monozyten, (CD3/ CD19) T-Zellen/ B-Zellen, (CD3/ CD4) T-Helfer-Zellen, (CD3/ CD8) T-Suppressor/ Zytotoxische Zellen, (CD3/ CD16 + CD56) NK Zellen.

3.2.8.2 Durchflusszytometrie

Die FACS (fluorescence activated cell sorter) Analyse wurde mit einem FACScan Durchflusszytometer nach Kalibrierung mit CaliBRITE beads (Becton Dickinson) unter Verwendung des AutoCOMP Software-Pakets (BD) durchgeführt. Es wurden 10.000 Zellen pro Bestimmung gemessen. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des SimulSET Software Pakets (BD) und lieferte sowohl quantitative als auch prozentuale Werte der Lymphozytenpopulationen und Subpopulationen. Die Lymphozytenpopulationen wurden automatisch mit Einschluss von mindestens 98 % der gemessenen Lymphozyten je Probe analysiert.

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Die Analysen wurden zum großen Teil mit kommerziell erhältlichen Kits durchgeführt (siehe Angaben in den entsprechenden Abschnitten). Die verwendeten Reagenzien waren entweder in den Kits enthalten oder wurden nach den Vorgaben der Hersteller angesetzt. Dafür benötigte Chemikalien sind der folgenden Liste zu entnehmen.

3.3.1 Chemikalien

2 N H_2SO_4	Merck
5 × MMLV (First Strand) Puffer	Gibco
6 × Loading Dye Solution	MBI Fermentas
50 × TAE Puffer	Eppendorf
Agarose	peqlab Biotechnologie GmbH
Aqua dest.	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG
BSA	Biomol GmbH
β-Mercaptoethanol	Sigma
Color Reagent A (H_2O_2)	R&D Systems
Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)	R&D Systems
Desoxyribonukleotidmix dNTP‘s (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roche
DNA ladder GeneRuler™, 100 bp	MBI Fermentas
DHEA	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
Ethanol, absolut	Merck
Ethanol, 70%	Merck
Ethidiumbromid	BioRad
FACSFlow™	Becton Dickinson
Gentamycin	Bio Whittaker
Heparin-Natrium Braun 25000 IE/ 5 ml	B.Braun AG
HBSS	Bio Whittaker

IL-1β DuoSet® ELISA Kit	R&D Systems
IL-6 DuoSet® ELISA Kit	R&D Systems
IL-10 OptEIA™ ELISA Kit	Pharmingen
IL-12(p70) OptEIA™ ELISA Kit	BD Biosciences
KCl	Merck
KH_2PO_4	Merck
MMLV Reverse Transcriptase	Gibco
NaCl	Merck
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	Merck
NaN_3	Sigma
$Oligo(dT)_{15}$ Primer	Roche
QIAamp® RNA Blood Mini Kit	Quiagen
RNase freiese Wasser	Sigma
RNase Inhibitor	Eppendorf
RPMI 1640 Kulturmedium	Bio Whittaker
Simultest™ IKM Lymphocyte Kit (incl. Lysing Solution)	Becton Dickinson
Sucrose	Sigma
Tamoxifen	Sigma
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ µl)	Roche
Taq-Puffer (10 ×)	Roche
TNF-α DuoSet® ELISA Kit	R&D Systems
Trizma base	Sigma
Trypanblaulösung	Gibco
Tween 20	Merck-Schuchardt

3.3.2 Reaktionslösungen (ELISA)

PBS	NaCl 137 mM KCl 2,7 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ 8,1 mM KH_2PO_4 1,5 mM
Wash-Buffer	0,05 % Tween 20 in PBS

Block Buffer	1 % BSA, 5 % Sucrose in PBS mit 0,05% NaN_3
Reagent Diluent für IL-1β	1 % BSA in PBS
Reagent Diluent für TNF-α, IL-6	0,1 % BSA, 0,05 % Tween 20 in Tris-buffered saline (20 mM Trizma Base, 150 mM NaCl)
Substrate Solution	1:1 Gemisch Color Reagent A und Color Reagent B
Stop Solution	2 N H_2SO_4

3.4 Statistik

Die Zellüberstände enthielten große Mengen der untersuchten Zytokine. Die individuelle Variabilität in der Reaktion von PBMC auf LPS-Stimulation resultierte in großen Standardabweichungen (SD) der absoluten Zytokinkonzentrationen. Diese großen SD erschwerten die Beurteilung von Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen. Deshalb wurde eines jeden Patienten präoperative (oder postoperative) PBMC-Reaktion auf LPS als Ausgangswert (100 %) festgesetzt, mit dem folgende Änderungen der Zytokinsekretionsfähigkeit verglichen wurden. Demnach sind in dieser Arbeit die Werte als Änderung der Zytokinsekretionsfähigkeit in Prozent, verglichen mit dem präoperativen oder postoperativen Ausgangswert, angegeben. Die Ergebnisse sind als Durchschnitt ± SEM dargestellt. Die Unterschiede zwischen den experimentellen Durchschnittswerten wurden (sofern nicht anders angegeben) anhand des One Way Repeated Measures ANOVA (analysis of variance) oder Repeated Measures ANOVA on Ranks, gefolgt vom Student-Newman-Keuls (SNK) Test als post-hoc Test für multiple Vergleiche durchgeführt. Für alle statistischen Untersuchungen wurde ein Niveau von $p<0,05$ als signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Effekt von DHEA auf die postoperative PBMC-Funktion

DHEA führte im Tiermodell zu einer Normalisierung der durch Trauma und hämorrhagischen Schock unterdrückten Sekretionsfähigkeit peripherer mononukleärer Blutzellen. Für die Beantwortung der Frage, ob DHEA auch bei Patienten mit abdominal-chirurgischen Operationen immunprotektive Effekte besitzt, wurden perioperativ gewonnene PBMC *in vitro* mit DHEA behandelt und ihre Sekretionsleistung mittels ELISA analysiert.

4.1.1 Proinflammatorische Zytokine IL-6, IL-1β und TNF-α

Die als Ausgangswert dienenden präoperativen Zytokin-Konzentrationen für mit LPS stimulierte und ohne DHEA kultivierte PBMC waren 1898±1195 pg/ml für IL-1β, 1264±817 pg/ml für TNF-α und 11310±4554 pg/ml für IL-6. Das operative Trauma resultierte in einer unterdrückten IL-1β und TNF-α Sekretionsfähigkeit von postoperativen PBMC verglichen mit präoperativen Zellen (-36,6 % für IL-1β und -26,1 % für TNF-α). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der IL-6 Ausschüttung durch präoperative oder postoperative Zellen. Der Zusatz von klinisch relevanten DHEA Konzentrationen zum Kulturmedium führte zu einer signifikanten Steigerung der IL-1β, TNF-α und IL-6 Sekretionsfähigkeit postoperativer Zellen (vgl. Abb. 10 A-C) verglichen mit unbehandelten PBMC. Dieser immunstimulierende Effekt zeigte sich für alle DHEA Konzentrationen (10^{-10}M, 10^{-8}M, 10^{-6}M, 10^{-5}M) und war am ausgeprägtesten für die höchste DHEA Konzentration, 10^{-5}M (+33,2 % für die IL-1β Ausschüttung, +26,0 % für IL-6 und +38,7 % für TNF-α, postoperativ + DHEA vs. postoperativ). Diesbezüglich normalisierte 10^{-5}M DHEA die TNF-α Sekretionsfähigkeit von PBMC zu präoperativ gemessenen Werten (vgl. Abb.10 C). Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den gewählten DHEA Konzentrationen.

Tab. 4

Änderung in %	**IL-1β**	**TNF-α**	**IL-6**
Präoperativ ohne DHEA	100	100	100
Postoperativ ohne DHEA	63,3 ± 18,2*	73,9 ± 16,0*	100,6 ± 19,3
Postoperativ + 10^{-10}M DHEA	80,5 ± 18,0#	87,8 ± 17,3#	116,0 ± 21,0#
Postoperativ + 10^{-8}M DHEA	80,1 ± 19,8#	88,5 ± 16,7#	116,5 ± 20,9#
Postoperativ + 10^{-6}M DHEA	81,8 ± 20,0#	95,3 ± 17,7#	120,3 ± 21,7#
Postoperativ + 10^{-5}M DHEA	84,3 ± 18,4#	102,5 ± 19,1#	126,8 ± 21,7#

*Tab. 4 Prä- und postoperative PBMC wurden in Anwesenheit von 33,3 % prä- und postoperativem Plasma für die Dauer von 16 Stunden unter LPS-Stimulation kultiviert. Postoperative Zellen wurden zusätzlich 1 Std. vor LPS Zugabe mit 10^{-10}M, 10^{-8}M, 10^{-6}M und 10^{-5}M DHEA behandelt. Die Zytokine wurden in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. N=15 Patienten. *p<0,05 vs. Präoperativ, #p<0,05 vs. Postoperativ unbehandelt.*

Abb. 10 A-C Behandlung mit DHEA

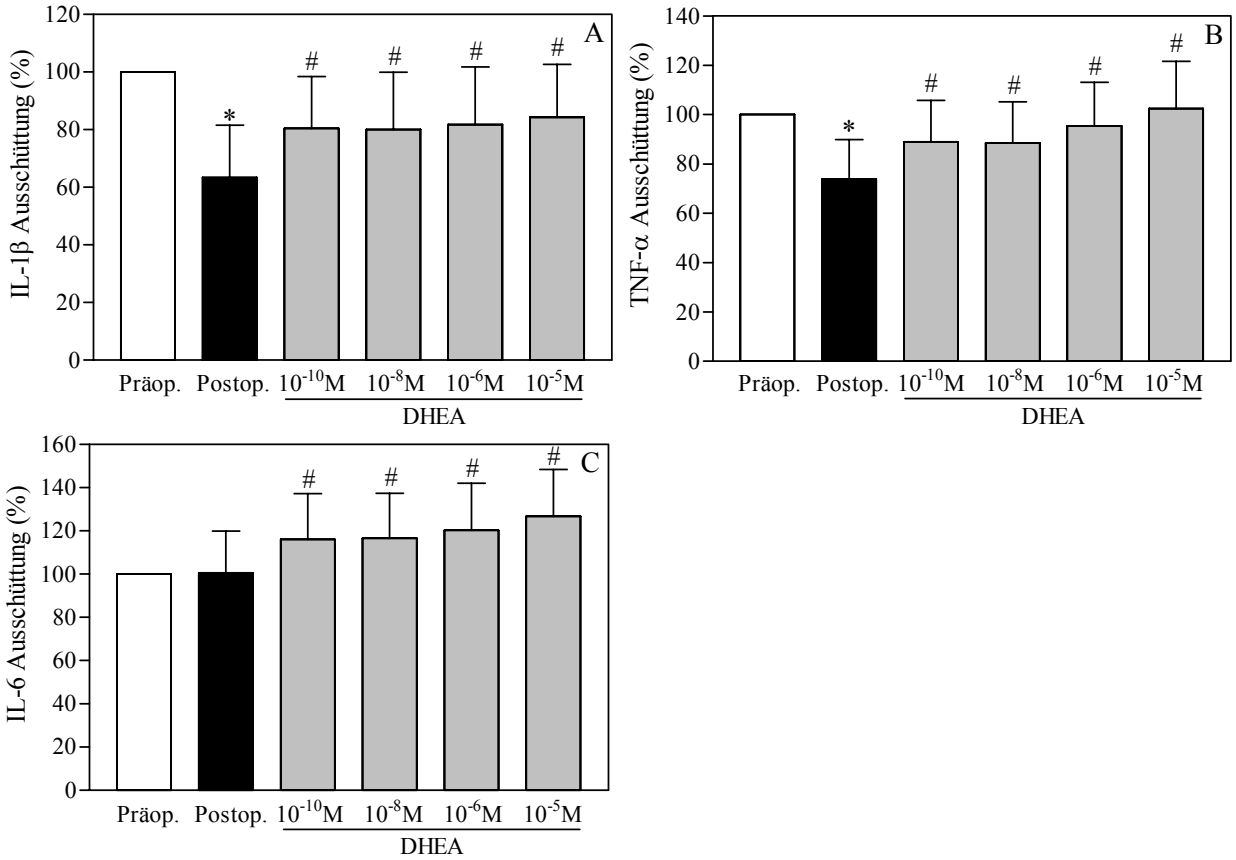

*Abb. 10 A-C Prä- und postoperative PBMC wurden in Anwesenheit von 33,3 % prä- und postoperativem Plasma für die Dauer von 16 Stunden unter LPS-Stimulation kultiviert. Postoperative Zellen wurden zusätzlich 1 Std. vor LPS Zugabe mit DHEA (10^{-10}M, 10^{-8}M, 10^{-6}M, 10^{-5}M) behandelt. Die Zytokine wurden in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. N=15 Patienten. *p<0,05 vs. Präoperativ, #p<0,05 vs. Postoperativ unbehandelt.*

Neben der Kultivierung der Zellen mit 33,3 % Plasma erfolgte eine Inkubation unter Zusatz von 20 % Plasma. Vergleichbar mit den Ergebnissen der Kultur mit 33 % Plasma resultierte das operative Trauma auch bei Verwendung von 20 % Plasma im Kulturmedium in einer Unterdrückung der IL-1β und TNF-α Ausschüttung von PBMC. Es zeigte sich keine Änderung in der postoperativen IL-6 Sekretion. Der Einsatz von 10^{-8}M DHEA führte zu einer signifikanten Steigerung der TNF-α und IL-1β Sekretionsfähigkeit postoperativer Zellen im Vergleich zu unbehandelten PBMC. Die IL-6 Ausschüttung wurde bei der verwendeten DHEA Konzentration nicht signifikant gesteigert (vgl. Abb. 11 A-C).

Abb. 11 A-C Behandlung mit DHEA (10^{-8}M)

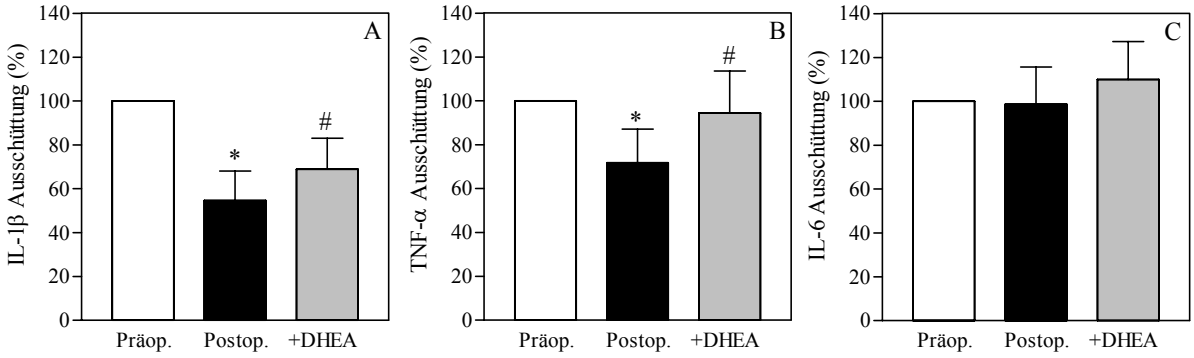

*Abb. 11 A-C Prä- und postoperative PBMC wurden in Anwesenheit von 20 % prä- und postoperativem Plasma für die Dauer von 16 Stunden unter LPS-Stimulation kultiviert. Postoperative Zellen wurden zusätzlich 1 Std. vor LPS Zugabe mit DHEA (10^{-8}M) behandelt. Die Zytokine wurden in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. N=13 Patienten. *p<0,05 vs. Präoperativ, #p<0,05 vs. Postoperativ unbehandelt.*

In der Literatur wird eine unterdrückte Zytokinausschüttung (unter anderem IL-6) durch PBMC infolge von operativem Trauma vorbeschrieben. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen eine postoperativ supprimierte IL-1β und TNF-α Sekretionsfähigkeit von PBMC. Es zeigte sich jedoch eine im Kollektiv unveränderte IL-6 Ausschüttung nach der Operation. Diesbezüglich wurden in der IL-6 Bestimmung mittels ELISA zwei gegenläufige Reaktionen auf den chirurgischen Eingriff deutlich. Bei einem Teil der Patienten („*gesteigert*“) war eine im Vergleich zu der präoperativen Sekretion postoperativ deutlich gesteigerte IL-6 Ausschüttung zu erkennen. Der andere Teil („*unterdrückt*“) zeigte, wie schon zuvor in der Literatur beschrieben, eine Unterdrückung der IL-6 Sekretionsfähigkeit von PBMC durch das

Trauma. In beiden Gruppen („*gesteigert*“ und „*unterdrückt*“) wurde die IL-6 Sekretion durch Behandlung mit 10^{-5}M DHEA (weiter) gesteigert (vgl. Abb. 12 A-C).

Abb. 12 A-C Gegenläufige Reaktionen auf das operative Trauma

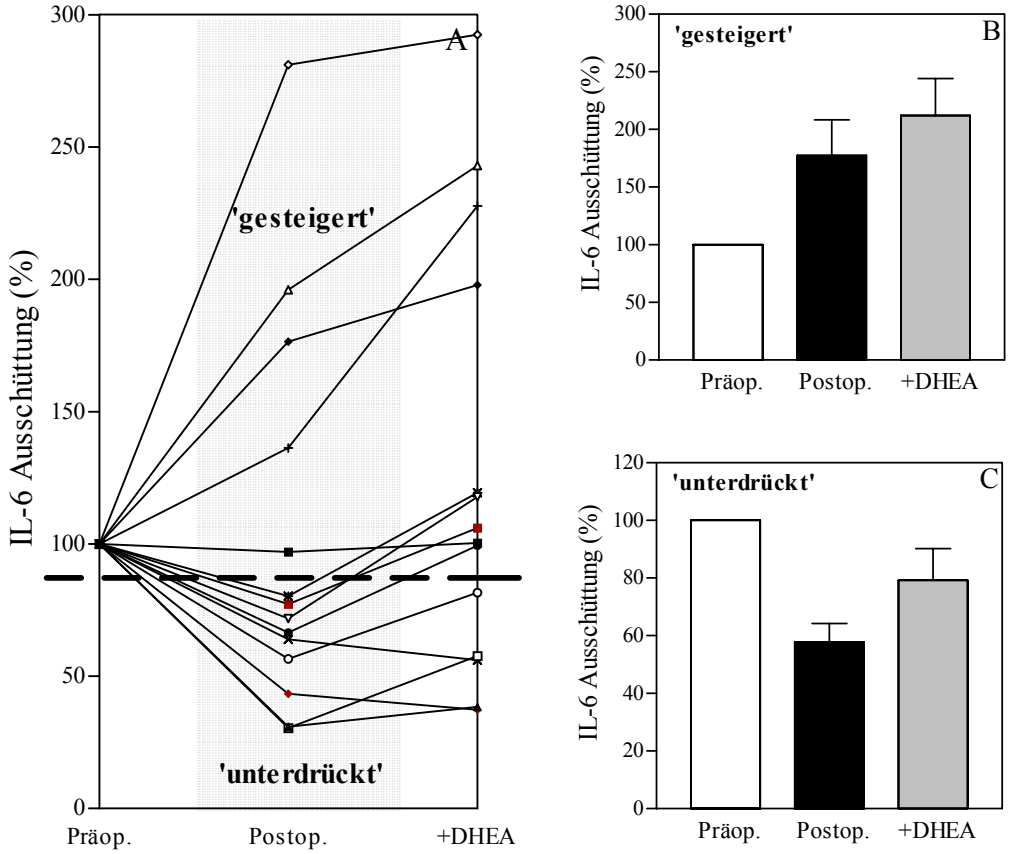

Abb. 12 A-C Postoperative PBMC wurden in Anwesenheit von 33,3 % postoperativem Plasma für die Dauer von 16 Stunden unter LPS-Stimulation kultiviert. Zusätzlich wurden die Zellen 1 Std. vor LPS Zugabe mit 10^{-5}M DHEA behandelt. Die Zytokine (IL-6) wurden in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt.
A N=14 Patienten B N=5 Patienten C N=9 Patienten.

4.1.2 Die Zytokine IL-12p70 und IL-10

Bei allen Patienten wurden außerdem die Konzentrationen von IL-12p70 und IL-10 in den Zellkulturüberständen bestimmt. Für IL-12p70 lagen diese um den Bereich der Nachweisgrenze, so dass lediglich für 3 Patienten Werte berechnet werden konnten. Dennoch deuten die vorhandenen Daten auf eine postoperativ unterdrückte IL-12p70 Sekretion durch PBMC und deren Steigerung durch DHEA hin (vgl. Tab. 5).

Tab. 5

Präoperativ	Postoperativ	+ 10^{-6}M DHEA	+10^{-5}M DHEA
100	77,9 ± 18,2	117,5 ± 51,2	91,2 ± 28,1

Tab. 5 Prä- und postoperative PBMC wurden in Anwesenheit von 33,3 % prä- und postoperativem Plasma für die Dauer von 16 Stunden unter LPS-Stimulation kultiviert. Postoperative Zellen wurden zusätzlich 1 Std. vor LPS Zugabe mit 10^{-6}M und 10^{-5}M DHEA behandelt. IL-12p70 wurde in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. N=3 Patienten.

Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 konnte bei 11 Patienten in den Zellüberständen bestimmt werden. Wie auch schon bei IL-6 zeigten sich für IL-10 zwei unterschiedliche Reaktionen auf das operative Trauma. Ein Teil der Patienten zeigte postoperativ eine unveränderte oder unterdrückte Sekretion durch PBMC. Die Behandlung mit 10^{-5}M DHEA führte zu keiner Änderung der IL-10 Sekretion (vgl. Abb. 13). Bei dem anderen Teil (vgl. Abb. 13, Kasten) wurden im Vergleich zu den Ausgangskonzentrationen postoperativ höhere Werte gemessen. 10^{-5}M DHEA führte bei diesen Zellen zu einer Verringerung der IL-10 Ausschüttung (nicht signifikant).

Abb. 13

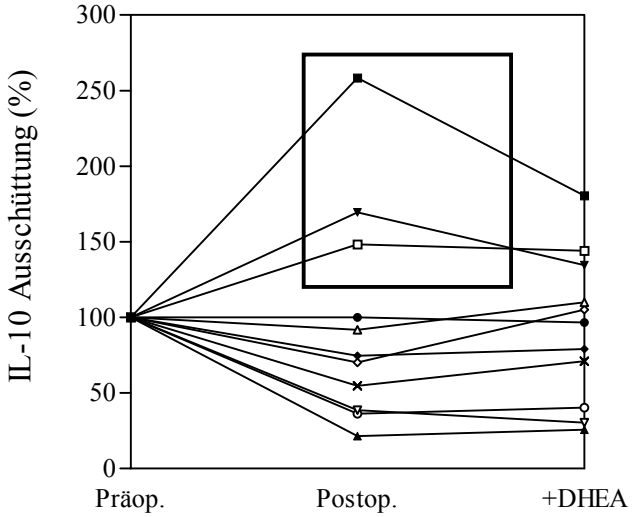

Abb. 13 Prä- und postoperative PBMC wurden in Anwesenheit von 33,3 % prä- und postoperativem Plasma für die Dauer von 16 Stunden unter LPS-Stimulation kultiviert. Postoperative Zellen wurden zusätzlich 1 Std. vor LPS Zugabe mit 10^{-5}M DHEA behandelt. IL-10 wurde in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. N=11 Patienten.

4.2 Einfluss von Plasma und PBMC auf die DHEA-Wirkung

Durch die Inkubationen von präop. Zellen mit postop. Plasma und postop. Zellen mit präop. Plasma sollte der Einfluss von Zellen und Plasma auf die DHEA-Wirkung untersucht werden.

4.2.1 Einfluss von prä- und postoperativen Zellen auf die DHEA-Wirkung

DHEA führte in Anwesenheit von postoperativem Plasma zu einer signifikanten Stimulation der IL-1β (+66,6 %) und IL-6 (+22,5 %) Zytokinsekretion durch präoperative PBMC im Vergleich zu unbehandelten Zellen (vgl. Abb. 14 A, C). Es gab keine signifikante Änderung der TNF-α Ausschüttung durch die Behandlung präoperativer PBMC mit DHEA (Abb. 14 B). Des Weiteren stimulierte DHEA die Ausschüttung von IL-1β (+101,6 %), TNF-α (+104,6 %) und IL-6 (+31,5 %) durch postoperative Zellen. Im direkten Vergleich zeigte sich ein signifikant (+78,4 %) stärkerer DHEA Effekt auf die TNF-α Ausschüttung durch postoperative Zellen im Vergleich zu der Zytokinsekretion präoperativer Zellen (Abb. 14 B). Für IL-6 und IL-1β war der gleiche Trend zu erkennen, es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der DHEA-Wirkung auf präoperative Zellen und der Wirkung auf postoperative PBMC (vgl. Abb. 14 A-C).

Abb. 14 A-C

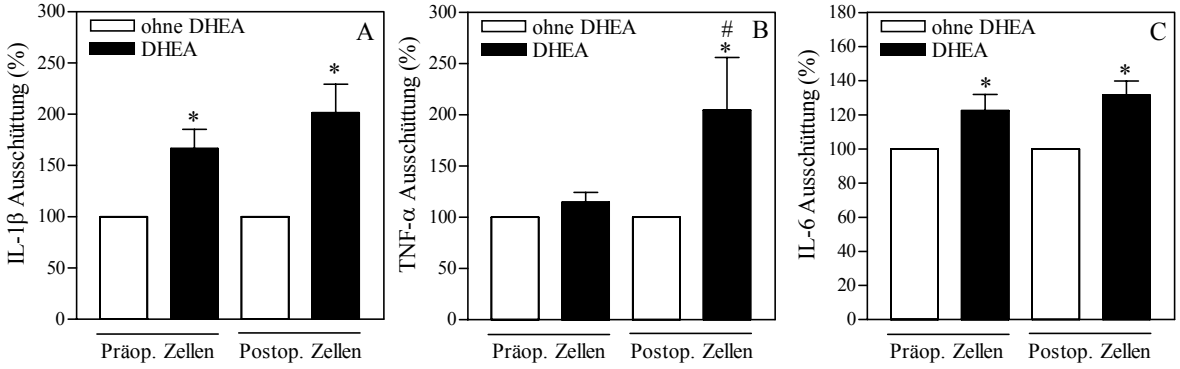

*Abb. 14 A-C Prä- und postoperative PBMC wurden in Anwesenheit von 33,3 % postoperativem Plasma für die Dauer von 16 Stunden unter LPS-Stimulation kultiviert. Die Zellen wurden zusätzlich 1 Std. vor LPS Zugabe mit 10^{-5}M DHEA behandelt. Die Zytokine wurden in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. N=14 Patienten. *p<0,05 vs. ohne DHEA. #p<0,05 vs. Präop. Zellen mit DHEA.*

4.2.2 Einfluss von prä- und postoperativem Plasma auf die DHEA-Wirkung

Der Einsatz von DHEA führte in Anwesenheit von präoperativem Plasma zu einer signifikanten Steigerung der IL-1β (+28,6 %) und TNF-α (+20,6 %) Zytokinsekretion postoperativer Zellen verglichen mit unbehandelten PBMC. Es gab keine Änderung der IL-6 Ausschüttung infolge DHEA Behandlung. Im Beisein von postoperativem Plasma führte DHEA zu einer signifikanten Steigerung der Zytokinsekretionsfähigkeit für IL-1β (+85,7 %), TNF-α (+95,5 %) und IL-6 (+28,1 %)(vgl. Abb. 15 A-C). Postoperatives Plasma bewirkte eine statistisch signifikante Steigerung (+62,1 %) des immunstimulatorischen DHEA Effekts auf die TNF-α Sekretion postoperativer Zellen im Vergleich zu präoperativem Plasma (vgl. Abb. 15 C).

Abb. 15 A-C

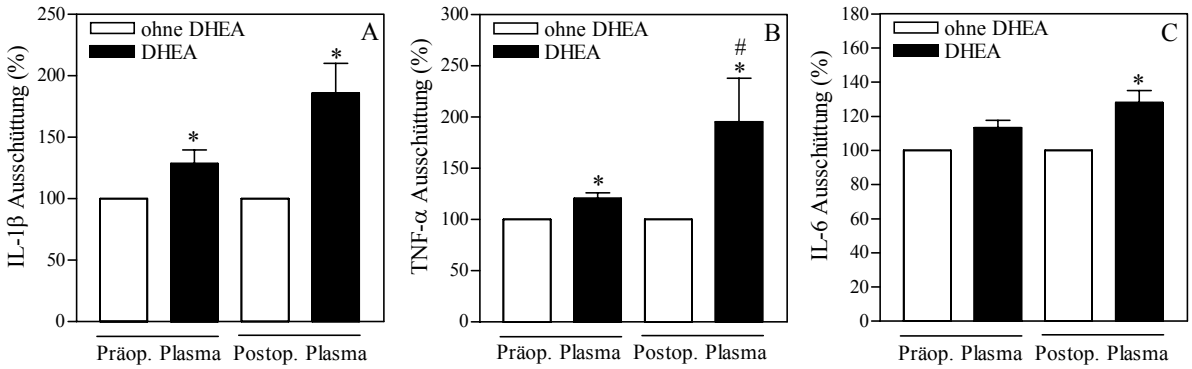

*Abb. 15 A-C Postoperative PBMC wurden in Anwesenheit von 33,3 % prä- und postoperativem Plasma für die Dauer von 16 Stunden unter LPS-Stimulation kultiviert. Die Zellen wurden zusätzlich 1 Std. vor LPS Zugabe mit 10^{-5}M DHEA behandelt. Die Zytokine wurden in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. N=17 Patienten. *p<0,05 vs. ohne DHEA. #p<0,05 vs. Präop. Plasma mit DHEA.*

4.2.2.1 Wirkung von prä- und postoperativem Plasma auf postoperative PBMC

Im direkten Vergleich des Einflusses von präoperativem und postoperativem Plasma zeigte sich ohne dem Beisein von DHEA kein signifikanter Unterschied in der Wirkung auf postoperative PBMC. Unter Verwendung von postoperativem Plasma war ein Trend zur geringeren Zytokinausschüttung im

Vergleich zu präop. Plasma zu erkennen (vgl. Abb. 16 A-C). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Abb. 16 A-C

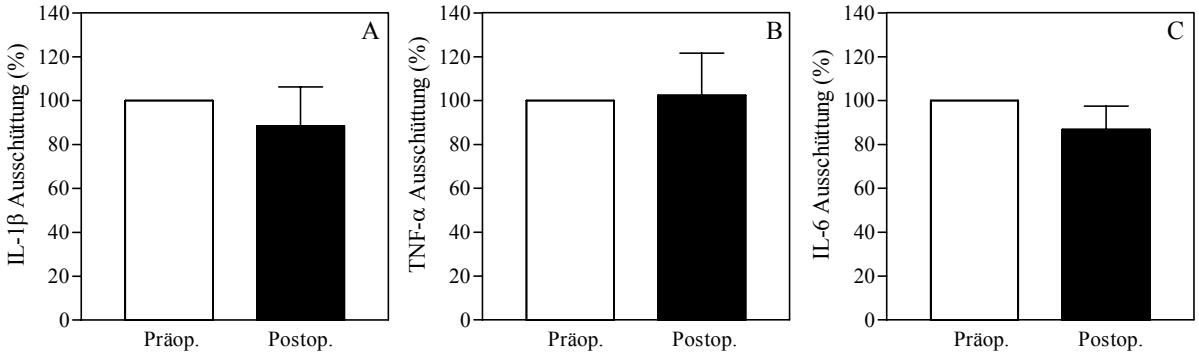

Abb. 16 A-C Postoperative PBMC wurden in Anwesenheit von 33,3 % prä- und postoperativem Plasma für die Dauer von 16 Stunden unter LPS-Stimulation kultiviert. Die Zytokine wurden in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. N=17 Patienten.

Bei der Bestimmung der DHEA Konzentrationen fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den präoperativen und postoperativen DHEA-Plasmaspiegeln (vgl. Abb. 17).

Abb. 17 A-B

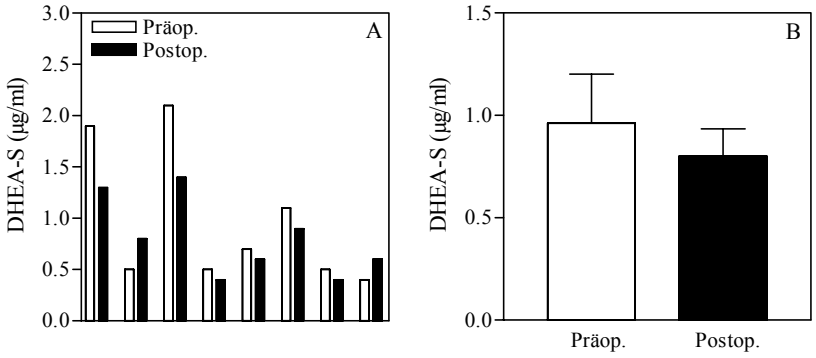

Abb. 17 Die DHEA-Spiegel wurden bei einem Teil der Patienten im Plasma sowohl präoperativ als auch postoperativ bestimmt. A: Änderung der DHEA Spiegel der einzelnen Patienten. B: Änderung der DHEA Spiegel im gesamten Kollektiv. N=8 Patienten.

4.3 LPS-Sensitivität von PBMC

In diesem Versuchsansatz sollte ein möglicher synergistischer Effekt von DHEA und LPS untersucht werden. Die Stimulation mit unterschiedlichen LPS Konzentrationen (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml) resultierte in einer dosisabhängigen IL-6 Ausschüttung durch postoperative PBMC (vgl. Abb. 18). Der

stimulatorische Effekt war am stärksten ausgeprägt für die Stimulation mit 1000 ng/ml LPS (+75 % im Vergleich zur Stimulation mit 1 ng/ml). Nicht stimulierte Zellen sezernierten keine nachweisbaren Zytokinkonzentrationen. Die DHEA Behandlung führte zu einer signifikanten Steigerung der LPS induzierten Zytokinsekretionskapazität (+35,4 % für die Stimulation mit 1 ng/ml LPS, +26,3 % für 100 ng/ml und +25,3 % für 1000 ng/ml) im Vergleich zu unbehandelten Zellen mit vergleichbarer LPS-Stimulation. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der mit 10 ng/ml stimulierten IL-6 Ausschüttung zwischen unbehandelten und mit DHEA behandelten PBMC.

Abb. 18 LPS-Sensitivität von PBMC

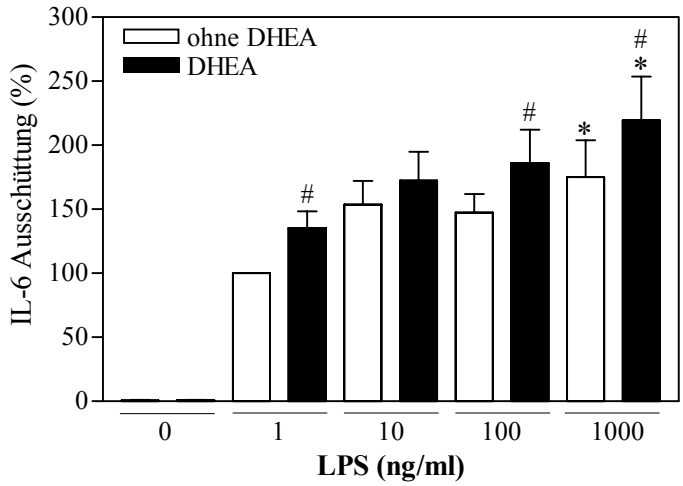

*Abb. 18 Postoperative PBMC wurden in Anwesenheit von 33,3 % postoperativem Plasma für 1Std. mit oder ohne 10^{-5}M DHEA behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation ohne Stimulation sowie mit Stimulation mit den LPS Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml für die Dauer von 16 Stunden. IL-6 wurde in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. N=8 Patienten. *p<0,05 vs. 1 ng/ml LPS. #p<0,05 vs. ohne DHEA (bei gleicher LPS Konzentration).*

4.4 Einfluss von Tamoxifen auf die DHEA-Wirkung

Zur Untersuchung eines möglichen Wirkmechanismus wurde dem Kulturmedium vor der DHEA Behandlung Tamoxifen zugesetzt. Diese Vorbehandlung mit dem Östrogenrezeptorantagonisten führte zu einer vollständigen Blockung des immunstimulatorischen Effekts von DHEA auf die IL-6 und IL-1β Zytokinausschüttung postoperativ kultivierter PBMC (-35,4 % für IL-1β und –27,1 % für IL-6 versus +DHEA ohne Tamoxifen-Vorbehandlung). Im Gegensatz dazu resultierte der Einsatz von Tamoxifen in einer signifikant gesteigerten TNF-α

Sekretion durch postoperative PBMC (vgl. Abb. 19 A-C) im Vergleich zu alleiniger DHEA Behandlung (+60,4 %).

Abb. 19 A-C

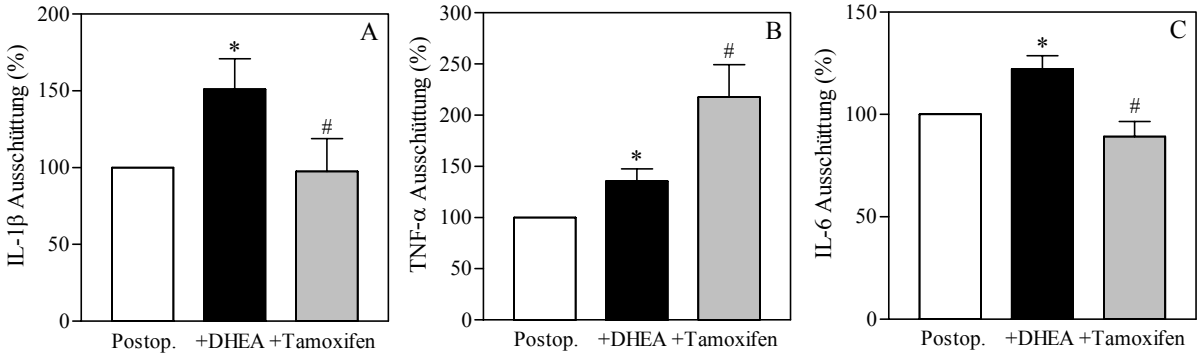

*Abb. 19 A-C Postoperative PBMC wurden in Anwesenheit von 33,3 % postoperativem Plasma für 1Std. mit oder ohne 10^{-6}M Tamoxifen vorbehandelt. Danach erfolgte der Zusatz von 10^{-5}M DHEA. Nach 1 Std. erfolgte die LPS-Stimulation (1 µg/ml) für die Dauer von 16 Stunden. Die Zytokine wurden in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. N=12 Patienten. *p<0,05 vs. Postoperativ. #p<0,05 vs. Postoperativ mit DHEA.*

4.5 Effekt von DHEA auf die RNA-Expression

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Einfluss von DHEA auf die mRNA-Expression der Zytokine IL-1β, TNF-α und IL-6 durch postoperative PBMC untersucht. Mittels PCR erfolgte die Bestimmung der mRNA-Expression nach einer zwei-, vier- oder achtstündigen (nur IL-6) LPS-Stimulation mit oder ohne DHEA Zusatz zum Kulturmedium. Die semiquantitative Auswertung erfolgte anhand des Bezugs der einzelnen Zytokin-Expression zu der Expression des housekeeping gene GAPDH. Die Behandlung mit 10^{-5}M DHEA führte zu keiner signifikanten Änderung der IL-1β, TNF-α und IL-6 mRNA-Expression an allen Zeitpunkten (vgl. Tab. 6, Abb. 20).

Abb. 20 Gelelektrophorese für IL-6

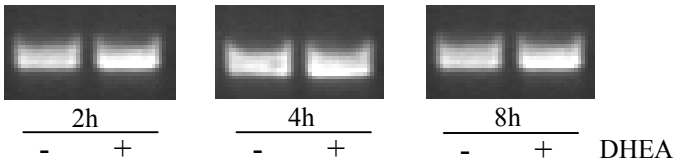

Abb. 20 Photographie der Gelelektrophorese des PCR Produkts IL-6. Die mRNA wurde nach 2h,4h und 8h Inkubation ohne oder mit 10^{-5}M DHEA isoliert und in cDNA umgewandelt. Anschließend folgte die PCR und Gelelektrophorese.

Tab. 6

	2h ohne	2h +DHEA	4h ohne	4h +DHEA	8h ohne	8h +DHEA
IL-1β	100	99,6 ± 3,8	100	121,9 ± 9,8	-	-
TNF-α	100	97,0 ± 4,4	100	109,9 ± 16,1	-	-
IL-6	100	91,5 ± 6,8	100	90,7 ± 11,7	100	79,2 ± 7,1

Tab. 6 mRNA wurde aus postoperativen PBMC nach einer 2-, 4- oder 8- (nur IL-6) stündigen LPS-Stimulation (1 µg/ml) isoliert. Anschließend erfolgte die Umwandlung in cDNA und die Gewinnung der PCR Produkte IL-1β, IL-6, und TNF-α sowie deren Darstellung mittels Gelelektrophorese. Um die semiquantitative Auswertung zu ermöglichen, wurde zusätzlich für alle Proben eine PCR für das housekeeping gene GAPDH durchgeführt. Der Vergleich der Proben erfolgte anhand des Quotienten Zytokin-Expression / GAPDH-Expression.
N=8 Patienten für 2h Stimulation. N=3 Patienten für 4h und 8h Stimulation.

4.6 Verwendung von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Träger für DHEA

DMSO hatte bis zu der in dieser Studie eingesetzten Menge keinen Einfluss auf die IL-6 Sekretionsfähigkeit von PBMC. Mit steigendem DMSO Anteil im Kulturmedium schien auch die IL-6 Ausschüttung gesteigert zu sein. Eine 100-fach größere Menge wirkte sich negativ (zytotoxisch) auf die PBMC Kultur aus; es konnte kein IL-6 in den Zellüberständen bestimmt werden (vgl. Abb. 21).

Abb. 21

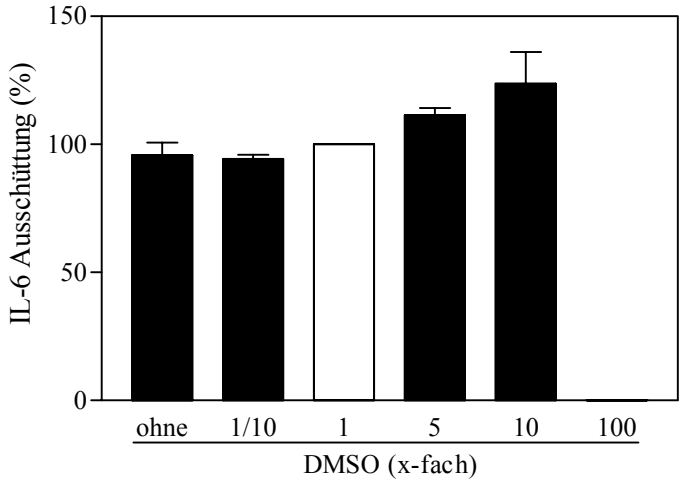

Abb. 21 PBMC wurden in Anwesenheit von 33,3 % Plasma für 1Std. mit oder ohne DMSO versetzt. Anschließend erfolgte die LPS-Stimulation (1 µg/ml) für die Dauer von 16 Stunden. IL-6 wurde in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. N=3 Probanden.

4.7 PBMC Subpopulationen

Um eine Beeinflussung der PBMC Subpopulationen durch das operative Trauma zu erkennen, erfolgte sowohl präoperativ als auch postoperativ die Differenzierung der Leukozyten und Lymphozyten. Postoperativ war ein signifikanter Rückgang des Lymphozytenanteils an der Gesamtleukozytenzahl im Vergleich zu dem präoperativen Anteil zu erkennen. Die Granulozyten stellten postoperativ einen signifikant höheren Prozentsatz der Leukozyten verglichen mit dem präoperativen Wert. Es zeigte sich eine Abnahme der Monozyten innerhalb der Leukozytenzellreihe (vgl. Abb.22).

Abb. 22

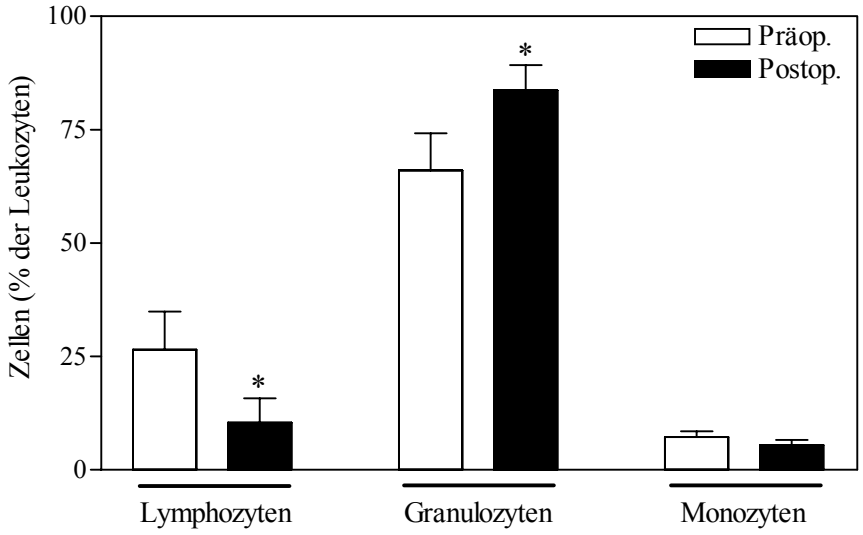

*Abb. 22 Prozentualer Anteil der Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten an der prä- und postoperativen Leukozyten-Gesamtzahl. Das Differential-Blutbild wurde mit Hilfe eines automatisierten Analysegerätes (BD) durchgeführt.. *p<0.01 vs. Präoperativ, t-Test; N=8 Patienten.*

Bei der Lymphozytendifferenzierung zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung von T-Helfer-Zellen (CD3+, CD4+), T-Suppressor-/Zytotoxische Zellen (CD3+, CD8+), Natural Killer (NK) Zellen (CD3-, CD16+ und/ oder CD56+) und B-Zellen (CD19+) nach operativem Trauma (vgl. Abb. 23). Ebenso gab es keine signifikante Änderung in dem Verhältnis von CD4+ T-Helfer-Zellen zu CD8+ T-Suppressor/ zytotoxischen Zellen (CD4/CD8-Ratio).

Abb. 23

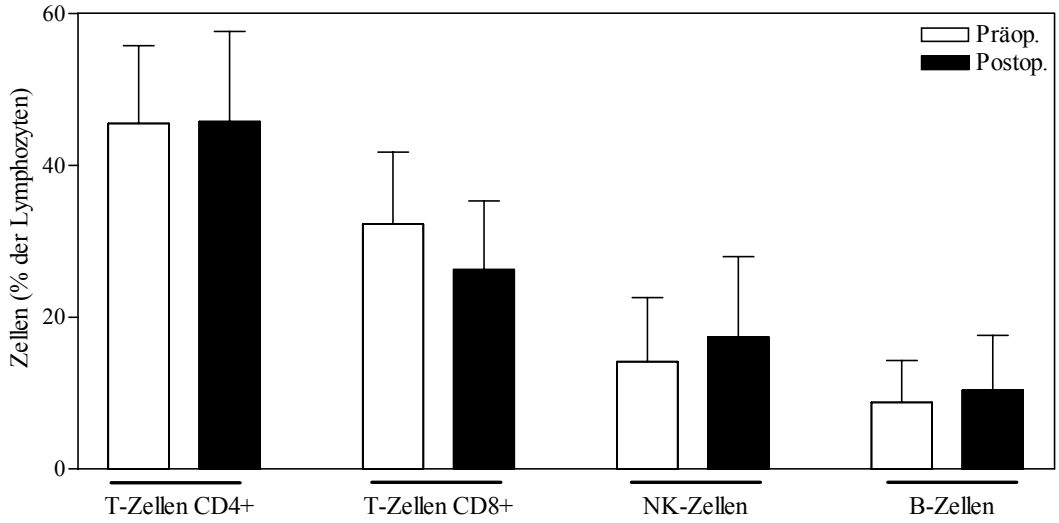

Abb. 23 Zur Differenzierung der peripheren Blutzellen erfolgte präoperativ und postoperativ die durchflusszytometrische Bestimmung der T-Helfer-Zellen (CD3+,CD4+), T-Suppressor/ zytotox. Zellen (CD3+, CD8+), NK-Zellen (CD3-, CD16+ und/oder CD56+) und B-Zellen (CD19+) anhand ihrer Oberflächenmarker. Die Abbildung gibt die prozentuale Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation wieder. N=8 Patienten.

5 Diskussion

5.1 Auswahl und Bedeutung der untersuchten Parameter

Eine Reihe von klinischen und tierexperimentellen Studien zeigen, dass operatives Trauma, Blutverlust und Schock unterdrückende Effekte auf die Immunantwort auslösen (48,59,99,125,136,138,139). Unter anderem führten Trauma und Blutverlust zu einer unterdrückten Antigenpräsentation durch Makrophagen sowie zu einer verringerten Expression der für die Antigenpräsentation notwendigen MHC Klasse II Moleküle durch eine direkte Beeinflussung der Makrophagen-Funktion (16,18,111). Ebenso zeigte sich die Reaktivität zirkulierender Monozyten gegenüber bakterieller Stimulation nach operativem Trauma signifikant verringert (49,58). Des Weiteren hatte chirurgisches Trauma einen stark reduzierenden Effekt auf die Proliferationsfähigkeit von mit Phytohämagglutinin (PHA) stimulierten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) *in vitro* (47). In weiteren Studien konnte eine Unterdrückung der Sekretionsfähigkeit von proinflammatorischen Zytokinen durch periphere mononukleäre Blutzellen nach abdominal-chirurgischem Trauma beobachtet werden (4,47). Diese postoperativen Beeinträchtigungen waren mit höheren Infektionsraten und einer schlechteren Prognose assoziiert (3,47).

Neuere Studien verdeutlichen die Bedeutung von Sexualhormonen und Geschlecht in der Regulierung der Immunantwort nach Trauma und Blutverlust (7). Im Gegensatz zu unterdrückten Immunreaktionen bei männlichen Versuchstieren zeigten weibliche Mäuse eine bessere Immunfunktion nach traumatisch-hämorrhagischem Schock (71,73,76). Diesbezüglich wurden bei Testosteron immunsuppressive Eigenschaften beobachtet, während Östradiol einer Immundysfunktion nach Trauma und schwerem Blutverlust vorzubeugen scheint (1,5,6,74,75). Darüber hinaus wurden für DHEA, dem Steroidhormon mit der höchsten Plasmakonzentration beim Menschen, potente immunmodulatorische Eigenschaften beobachtet (3,29). In dieser Hinsicht normalisierte die Behandlung männlicher Mäuse mit DHEA die unterdrückte Immunantwort nach Blutverlust oder Verbrennung und senkte die Sterblichkeit nach darauf folgender Sepsis (3,29). Bei weiblichen Proestrus Mäusen führte die Gabe von DHEA zu einer Steigerung der Zytokinsekretionsfähigkeit nach Trauma und Blutverlust (70). Zudem verhinderte

DHEA bei Mäusen mit traumatisch-hämorrhagischem Schock einen exzessiven Anstieg der proinflammatorischen Zytokine im Plasma (12,36). Die Reduzierung der Plasmazytokine korrelierte dabei mit einer gesteigerten Widerstandskraft gegenüber Infektion mit *Listeria monocytogenes* (12) und einem gesteigerten Überleben nach induzierter Sepsis (34,35,90,113,124). Trotz dieser beschriebenen Beobachtungen bei Mäusen blieb der Effekt von DHEA auf PBMC von operativen Patienten unklar. Als Ziel dieser Studie galt es festzustellen, ob DHEA einen modulierenden Effekt auf die nach abdominal-chirurgischem Trauma unterdrückte PBMC-Funktion von chirurgischen Patienten besitzt.

Um dies zu untersuchen wurden PBMC präoperativ und zwei Stunden postoperativ aus Patientenblut isoliert und *in vitro* mit verschiedenen DHEA Konzentrationen eine Stunde vor LPS-Stimulation behandelt**.** Dieser zeitliche Ablauf wurde gewählt, da die *in vitro* LPS-Stimulation einer postoperativ auftretenden Infektion *in vivo* entsprechen sollte. Diesbezüglich resultierte der Einsatz von DHEA bei Mäusen mit traumatisch-hämorrhagischem Schock vor Induktion einer Sepsis in signifikant gesteigerten Überlebensraten (3). Die beschriebene einstündige Exposition der PBMC gegenüber DHEA vor LPS-Stimulation würde demnach einer postoperativen DHEA Behandlung vor einer möglicherweise folgenden infektiösen Komplikation entsprechen.

Dem Kulturmedium wurden zusätzlich anteilig 33 % des korrelierenden Plasmas zugesetzt, um perioperative Veränderungen in der *in vivo* Situation zu imitieren. Diesbezüglich konnten steigernde Effekte von DHEA auf die zellvermittelte Immunantwort bei Mäusen mit traumatisch-hämorrhagischem Schock gefunden werden, wohingegen bei kontroll-operierten Tieren keine vergleichbaren Effekte nachgewiesen werden konnten. Demzufolge wurde ein hoher Plasmaanteil am Kulturmedium verwendet. Es sollte erwähnt werden, dass immunstimulierende Effekte von DHEA auch bei Verwendung von 20 % Plasma beobachtet werden konnten.

Die Fähigkeit von PBMC, als Reaktion auf die Stimulation mit LPS Zytokine auszuschütten, wurde als Marker für die Immunzellfunktion verwendet. Die Bedeutung einer intakten PBMC-Funktion für die Immunabwehr wird in Studien deutlich, bei denen die unterdrückte PBMC Zytokinsekretion von chirurgischen Patienten mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen und septischen Komplikationen korrelierte (3,4,47,58). Zytokine spielen dabei eine wesentliche

Rolle in der Initiation und Regulation der Immunabwehr (103,112). Nach LPS-Stimulation von Vollblut stammen diese Zytokine zum großen Teil aus PBMC, v. a. aus Monozyten (42). Insbesondere sind es die drei proinflammatorischen Zytokine IL-1, TNF-α und IL-6, die eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der Entzündungskaskade spielen. Ihre Ausschüttung ist für die Immunzellinteraktion (u.a. mit T-Zellen) und damit für eine intakte Immunreaktion von Bedeutung (49,66,97,135). Zusammen mit den oben beschriebenen Gründen scheint somit die *in vitro* Untersuchung der IL-1, TNF-α und IL-6 Sekretion von PBMC chirurgischer Patienten zur Beurteilung der perioperativen Immunfunktion geeignet zu sein. Dennoch liefert die Untersuchung der PBMC als Gesamtheit lediglich die Summe der Reaktion aller Zellen. Die Reaktion (und Interaktion) einzelner an der Immunantwort beteiligter Zellen auf das operative Trauma sowie deren Modulationsmöglichkeiten können mit dieser Arbeit nicht erfasst werden und könnten somit Gegenstand fortführender Studien sein.

5.2 Auswirkung der Operation auf die PBMC-Funktion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Unterdrückung der IL-1β und TNF-α Sekretionsfähigkeit von PBMC nach abdominal-chirurgischem Trauma. Diese Daten bestätigen bisherige tierexperimentelle und klinische Studien, die sowohl für PBMC als auch für Milz- und Peritonealmakrophagen eine durch das Trauma unterdrückte Ausschüttung der Zytokine IL-6, IL-1β und TNF-α zeigten (3,41,47,58,69,129,140). Im Gegensatz zu IL-1β und TNF-α war die durchschnittliche IL-6 Ausschüttung nach der Operation unverändert, obwohl bei etwa 70 % der Patienten eine postoperativ unterdrückte IL-6 Ausschüttung nachweisbar war. Möglicherweise lässt sich die Divergenz der postoperativen IL-6 Sekretion durch die Heterogenität der an der Studie beteiligten Patienten bzw. deren Operationen erklären. Die postoperative Blutabnahme erfolgte zum festgesetzten Zeitpunkt zwei Stunden nach Operationsende, so dass Variationen im Stadium der Immunreaktion zum Abnahmezeitpunkt infolge unterschiedlicher Operationsdauer für diese Ergebnisse verantwortlich sein könnten. Ebenso wäre die Beeinflussung der Immunantwort durch eine unterschiedliche Organbeteiligung im Rahmen der Operation denkbar. Bei der Auswertung der Daten konnte diesbezüglich jedoch keine Einflussgröße ausgewiesen werden. Ferner sind Aussagen auch im Hinblick auf

Geschlechts- oder Alterseinflüsse aufgrund der zu geringen Patientenzahl nicht möglich.

5.3 Effekt von DHEA auf die postoperative PBMC-Funktion

Der Einsatz von DHEA führte zu einer signifikanten Stimulation der IL-6 Ausschüttung sowie einer signifikanten Steigerung der unterdrückten IL-1β und TNF-α Sekretion peripherer mononukleärer Blutzellen. In experimentellen *in vivo* Studien bei Mäusen zeigten sich vergleichbare immunstimulatorische Effekte auf die Zytokinsekretionsfähigkeit nach Trauma, Blutverlust und Verbrennung (3,29,41,92). Auch in klinischen Studien waren nach *in vitro* und *in vivo* DHEA Behandlung immunstimulierende Effekte im Sinne einer Zunahme der NK-Zellen Zytotoxizität zu erkennen (28,118). Im Gegensatz zu den oben beschriebenen immunstimulierenden Eigenschaften wurde für DHEA auch von einem unterdrückenden Effekt auf die IL-6 Ausschüttung durch PBMC nach LPS-Stimulation berichtet (119). Dabei erfolgte die Stimulation der PBMC von 6 gesunden Spendern mit 1 ng/ml LPS zusammen mit der DHEA Gabe. Möglicherweise kommen die unterschiedlichen Ergebnisse dadurch zustande, dass in dieser Arbeit DHEA bereits 1 Std. vor LPS-Stimulation zugesetzt und für die Inkubation zusätzlich Patientenplasma verwendet wurde (im Gegensatz zu der zeitgleichen Applikation bei Straub et. al). In der vorliegenden Arbeit war der stimulatorische Effekt für Zytokine mit proinflammatorischen Eigenschaften (IL-1β, IL-6 und TNF-α) bei allen DHEA Konzentrationen zu erkennen. Die Ausschüttung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch PBMC zeigte sich postoperativ nicht einheitlich verändert. Eine nach der Operation unveränderte oder verringerte IL-10 Sekretion wurde durch Behandlung mit 10^{-5}M DHEA nicht beeinflusst. Bei 3 Patienten fand sich eine gesteigerte IL-10 Sekretion. Diese erhöhte postoperative Ausschüttung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 wurde jedoch durch DHEA gesenkt. Diesbezüglich zeigte sich in klinischen und tierexperimentellen Studien ebenfalls eine nach operativem Trauma gesteigerte IL-10 Ausschüttung (17,59,70,101). Im Vergleich hierzu fand sich bei mit DHEA behandelten Mäusen eine durch DHEA signifikant verringerte IL-10 Produktion (70). Diese Ergebnisse sind nicht einheitlich. Auch gegensätzliche Berichte, dass IL-10 durch operatives Trauma nicht beeinflusst werde, wurden veröffentlicht (26). Der Zeitpunkt der postoperativen Blutentnahme im Bezug auf den Beginn des operativen Traumas

scheint hier einen entscheidenden Einfluss zu haben. Grundsätzlich wird erhöhten IL-10 Plasmaspiegeln eine Reihe immunsuppressiver Eigenschaften zugesprochen (17,87). Unsere Daten zeigen, dass diese erhöhten IL-10 Spiegel durch DHEA gesenkt werden. Aufgrund der geringen Patientenzahl sind jedoch weitere Studien notwendig, um diesen Trend genauer untersuchen zu können. Die Ergebnisse dieser Studie deuten ferner auf eine Steigerung der postoperativ verringerten IL-12 Sekretion durch Einsatz von DHEA hin. Die Bedeutung einer intakten IL-12 Sekretionsfähigkeit wird in Studien deutlich, in denen eine gestörte IL-12 Produktion durch Monozyten mit einem gesteigerten Auftreten postoperativer Komplikationen in Verbindung gebracht wird (60). Des Weiteren konnte die exogene Zufuhr von IL-12 das Überleben von traumatisierten Mäusen steigern (100). Vergleichbar zu IL-10 ist auch für IL-12 eine genaue Zuordnung der Ergebnisse zu den beschriebenen Beobachtungen anderer Studien aufgrund der verringerten Patientenzahl nur eingeschränkt möglich. Als Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von IL-10 und IL-12 an der postoperativ veränderten PBMC Funktion und deren Modulation durch DHEA bilden sie jedoch den Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen in zukünftigen Studien.

Der immunstimulatorische Effekt auf die IL-1β, TNF-α und IL-6 Zytokinsekretionsfähigkeit von PBMC schien dosisabhängig zu sein und zeigte höchste Werte bei 10^{-5}M DHEA. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Vergleichbar dazu hatte DHEA auch bei Mäusen einen dosisabhängigen stimulatorischen Effekt auf Immunzellen *in vivo* und *in vitro* (3,29). Eine Konzentration von 10^{-8}M entspricht dabei der physiologischen Plasmakonzentration bei jungen Erwachsenen (109). Die Konzentration 10^{-5} M DHEA, welche in dieser Arbeit die wirkungsstärkste Dosierung war, wird selbst durch pharmakologische Dosierung schwierig zu erreichen sein. Höhere Konzentration waren auch *in vitro* nicht zu erreichen, da DHEA dann nicht mehr löslich war und im Kulturmedium ausfiel (unveröffentlichte Daten). Nichtsdestotrotz zeigten sich auch bei niedrigeren Konzentrationen immunstimulierende Effekte. Diese Konzentrationen liegen innerhalb eines physiologisch relevanten Bereiches. Interessanterweise nimmt der Plasmaspiegel mit dem Alter kontinuierlich ab, ausgehend von den höchsten Werten um das 20. Lebensjahr. Er erreicht um das 80. Lebensjahr etwa 10 bis 20 % der Maximalwerte (44,110,114). Durch diese physiologisch reduzierten DHEA-Spiegel

würde bei älteren Patienten die Effektivität einer DHEA Substitution möglicherweise weiter gesteigert werden. So senkte DHEA bei regelmäßiger Einnahme die Infektanfälligkeit älterer Menschen (11,20,62). In klinischen Studien gab es zudem Hinweise auf eine Korrelation zwischen niedrigen DHEA-Spiegeln und einer Immundefizienz älterer Patienten (37). Diesbezüglich vermutet man einen kausalen Zusammenhang zwischen den im Alter niedrigen DHEA Konzentrationen und den gleichzeitig erhöhten IL-6 Serumspiegeln (38,119).

In dieser Studie wurden DHEA Konzentrationen innerhalb des physiologischen Bereichs verwendet. In Anlehnung an die Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien und den immunstimulatorischen Eigenschaften von DHEA auf PBMC würde eine Dosierung von 4mg/kg Körpergewicht für weitere Studien *in vivo* sinnvoll erscheinen (3,12). In einer Reihe von Studien, in denen DHEA in Dosierungen von bis zu 20mg/kg Körpergewicht und über einen Zeitraum von bis zu einem Jahr eingesetzt wurde, erwies sich DHEA als ein gut verträgliches Medikament ohne ernstzunehmende Nebenwirkungen (13-15,53,83,96,137). Es sollte erwähnt werden, dass DHEA in dieser Studie den PBMC *in vitro* zugesetzt wurde und daher keine Aussage möglich ist, ob die präoperative Administration des Steroidhormons die PBMC-Funktion aufrechterhalten würde.

Obwohl noch keine Patientenstudien mit einer *in vivo* DHEA Behandlung vor und nach abdominal-chirurgischen Operationen durchgeführt wurden, lassen die bislang vorliegenden Ergebnisse gemeinsam den kurzzeitigen Einsatz von DHEA zur Verhinderung von Immunsuppression bei chirurgischen Patienten sinnvoll erscheinen.

5.4 LPS-Sensitivität von PBMC

In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass DHEA allein die Monozytenfunktion nicht beeinflusste, wohingegen DHEA in Kombination mit LPS zu einer signifikanten Aktivierung von kultivierten Monozyten führte (92). Dabei resultierte die gemeinsame Behandlung von Monozyten mit DHEA und 0,2 µg/ml LPS in einer gleichwertigen Stimulation, wie sie durch alleinige Verwendung von 1 µg/ml LPS erreicht wurde (41,92). Um zu testen, ob die stimulatorischen Effekte von DHEA in der vorliegenden Studie auf eine bestimmte LPS Dosierung begrenzt waren, wurden die Studien mit unterschiedlichen LPS Konzentrationen (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die

verwendeten LPS Dosierungen eine Immunstimulation erreicht wurde. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen waren durch den Einsatz von DHEA (10^{-5}M) geringere LPS Konzentrationen notwendig, um die gleiche PBMC Aktivierung zu erzielen. Diesbezüglich scheint DHEA die Sensitivität von PBMC zu erhöhen, indem es ihre Reaktivität bakteriellen Reizen gegenüber verbessert. Andererseits wären ohne DHEA oder in Situationen mit niedrigen DHEA Serumspiegeln höhere LPS Konzentrationen erforderlich, um eine Aktivierung von PBMC zu erreichen. Ein niedriger Serumspiegel könnte somit eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen nach sich ziehen. Von Bedeutung könnte dies möglicherweise in Situationen mit niedrigen DHEA Serumkonzentrationen sein, wie sie bei älteren Patienten oder in fortgeschrittenen Stadien von Infektionen, z.B. HIV-Infektion, zu finden sind. Diesbezüglich weisen eine Reihe von klinischen Studien auf eine Korrelation zwischen niedrigen Plasma DHEA Spiegeln und Immundefizienz hin (32,38,134). Interessanterweise zeigte sich bei älteren Patienten eine deutlich verringerte LPS induzierte Zytokinsekretion von PBMC verglichen mit jüngeren Patienten (54). Die gesteigerte Sensitivität von mit DHEA kultivierten PBMC gegenüber LPS könnte auch für das verbesserte Überleben schwerer Infektionen von mit DHEA behandelten Tieren verantwortlich sein. In dieser Hinsicht senkte DHEA die Sterblichkeit von Tieren nach viralen Infektionen wie *Herpes simplex virus type 2*, *Coxsackie virus B4* und bakteriellen Infektionen, z.B. *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* (22,55,85,102,121).

5.5 Einfluss von postop. Plasma und PBMC auf die DHEA-Wirkung

Um einen Unterschied in der DHEA-Wirkung zwischen präoperativen und postoperativen PBMC bzw. Plasma zu untersuchen, wurde zusätzlich präoperatives Plasma mit postoperativen PBMC und postoperatives Plasma mit präoperativen Zellen inkubiert.

Der Einsatz von DHEA führte sowohl für präoperative als auch für postoperative PBMC zu einer Steigerung der IL-1β, TNF-α und IL-6 Sekretionsfähigkeit. Die stimulatorischen Effekte von DHEA waren auf postoperative PBMC im Vergleich zu präoperativen Zellen stärker ausgeprägt (signifikant für TNF-α). Die Empfindlichkeit von PBMC gegenüber dem Einfluss von DHEA scheint somit durch das operative Trauma erhöht zu werden. Auch

zeigten die Ergebnisse dieser Studie eine ausgeprägtere DHEA-Wirkung in Anwesenheit von postoperativem Plasma verglichen mit präoperativem Plasma. Postoperatives Plasma scheint demnach DHEA in seiner Wirkung zu unterstützen. Ein genauer Mechanismus konnte anhand der durchgeführten Versuchsansätze jedoch nicht festgestellt werden. Möglicherweise wurden als Zeichen einer Aktivierung der Immunabwehr bereits intraoperativ Substanzen freigesetzt, die im verwendeten postoperativen Plasma die Empfindlichkeit der PBMC gegenüber DHEA erhöhten. Es sollte erwähnt werden, dass postoperatives Plasma selbst die IL-1β, TNF-α und IL-6 Zytokinsekretionsfähigkeit im Vergleich zu präoperativem Plasma nicht signifikant beeinflusste. Demnach hatten Mediatoren im postoperativen Plasma lediglich in Anwesenheit von DHEA einen Effekt auf die Zytokinantwort. Die Ergebnisse der Studie demonstrieren ebenfalls, dass sich die DHEA-Plasmakonzentrationen perioperativ nicht veränderten. Somit scheint postoperativ kein Mangel and DHEA zu bestehen, der durch die DHEA Gabe ausgeglichen worden wäre. Intrazelluläre DHEA-Konzentrationen bleiben jedoch unbekannt und müssten in weiteren Studien untersucht werden. Das operative Trauma selbst scheint einen großen Einfluss auf die DHEA-Wirkung bei Immunzellen auszuüben. Diesbezüglich ließ DHEA die Immunfunktion bei kontrolloperierten Mäusen unbeeinflusst, wohingegen es eine Immunsuppression nach größerem Trauma und Blutverlust verhinderte (3). All diese Ergebnisse demonstrieren, dass DHEA vorrangig stimulatorische Effekte bei immunologisch schwächeren Individuen besitzt. Veränderungen in der Aktivität von an dem Steroidmetabolismus beteiligten Enzymen (115) könnten für diesen unterschiedlichen Effekt von DHEA bei gesunden und traumatisierten Individuen verantwortlich sein. So hemmte DHEA bei nicht stimulierten Makrophagen die eigene Metabolisierung durch das Konversionsenzym Aromatase, wohingegen die Aktivität dieses Enzyms in Anwesenheit des typischen Makrophagenaktivators LPS durch DHEA nicht beeinträchtigt wurde (116). Die Konversion von DHEA führte unter dem Einfluss von LPS zu einem Anstieg von zahlreichen Effektorhormonen in Makrophagen (116) und könnte somit eine wichtige Rolle in der lokalen Immunmodulation spielen.

5.6 Einfluss von Tamoxifen auf die DHEA-Wirkung

Dennoch bleiben die genauen zugrunde liegenden Mechanismen, über die DHEA seinen stimulatorischen Effekt auf Immunzellen nach operativem Trauma vermittelt, bislang unklar. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie demonstrieren, dass der Östrogenrezeptorblocker Tamoxifen die stimulatorischen Effekte von DHEA auf die IL-1β und IL-6 PBMC Sekretionsfähigkeit vollständig unterdrückt. Die TNF-α Ausschüttung hingegen wurde *in vitro* durch Tamoxifen verstärkt. In dieser Hinsicht zeigte sich auch in einer anderen Studie, dass Tamoxifen die Ausschüttung von TNF-α durch PBMC steigert, ohne aber die Sekretion anderer proinflammatorischer Zytokine zu beeinflussen (120). Dementsprechend unterdrückte auch der Östrogenrezeptorblocker EM-800 die IL-6 Ausschüttung durch Kupffer Zellen von Mäusen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock, wohingegen die Ausschüttung von TNF-α unter diesen Bedingungen gesteigert wurde (72). Der hierfür verantwortliche Mechanismus ist unbekannt. Man könnte jedoch spekulieren, dass Unterschiede in der TNF-α und IL-6 Signalverarbeitung der Zellen für diesen abweichenden Effekt verantwortlich sind. Zur Aufklärung dieser Beobachtung sind weitere Studien notwendig. Die Fähigkeit von Tamoxifen zur Blockung der DHEA-Wirkung auf die IL-1β und IL-6 Ausschüttung *in vitro* erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion von DHEA mit dem Östrogenrezeptor. Andernfalls könnte DHEA als Zwischenprodukt der Steroidhormonsynthese auch zu 17β-Östradiol metabolisiert werden (44). Im Hinblick auf die in Studien beobachtete immunprotektive Wirkung von 17β-Östradiol (3,7,29,75,76,78,94,95,127) wäre es denkbar, dass DHEA seine Wirkung über eine intrazelluläre Metabolisierung zu 17β-Östradiol entfaltet. Eine Reihe von Studien weisen auf eine Interaktion von DHEA mit dem Östrogenrezeptor hin (29,64,88,98). Diesbezüglich zeigten Catania et al. in einer tierexperimentellen Studie, dass Tamoxifen die stimulatorischen Effekte von DHEA auf die Splenozytenproliferation *in vitro* vollständig blockte (29). Die positiven Effekte von DHEA auf kardiale und hepatozelluläre Funktionen nach hämorrhagischem Schock wurden durch Vorbehandlung mit dem Östrogenrezeptorblocker ICI 182.780 vollständig aufgehoben (64). Schließlich wird von einer direkten Interaktion des DHEA mit dem Östrogenrezeptor berichtet (88,98). Sowohl diese Studien als auch

die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit deuten auf eine Beteiligung der Östrogenrezeptoren an der Übermittlung immunmodulatorischer DHEA Effekte hin.

In weiteren Studien über den Wirkungsmechanismus von DHEA zeigten Blauer et al., dass DHEA die supprimierenden Effekte von Dexamethason auf die Lymphozytenfunktion antagonisiert (23). Diesbezüglich wurden nach abdominellen Operationen erhöhte Glukokortikoid-Plasmaspiegel beobachtet (27,52,105). Dennoch erklären die antiglukokortikoiden Eigenschaften nicht vollständig die Wirksamkeit von DHEA im Hinblick auf eine verbesserte Immunantwort nach Trauma, Blutverlust, Verbrennung und Infektion (10). In der Studie von Araneo et al. zeigte sich nach Administration des Steroidrezeptorblockers RU386 nur eine unvollständige Verbesserung der Splenozytenfunktion, während DHEA die Unterdrückung der Splenozytenfunktion nach Verbrennung verhinderte (10). Andere Forschungsgruppen fanden Hinweise auf einen direkten Effekt von DHEA auf Immunzellen. So demonstrierten Meikle et al. die Anwesenheit eines interzellulären DHEA Rezeptors, über den DHEA die IL-2 und Interferon-γ (IFN-γ) Produktion in aktivierten murinen und humanen T-Zellen *in vitro* steigerte (93). Auch für Monozyten wurde der Besitz eines DHEA Rezeptors nachgewiesen (92). In interessanten neueren Studien mit Knock-out Mäusen zeigte sich eine Abhängigkeit des immunprotektiven DHEA Effekts von der Anwesenheit des IL-6 (61), das an der Signalkette beteiligt zu sein scheint. Möglicherweise wäre darin der Grund für den oben beschriebenen ausgeprägteren DHEA Effekt nach operativem Trauma zu suchen. Der TNF-α Rezeptor scheint für die DHEA-Wirkung keine Rolle zu spielen (61). Im Hinblick auf die beschriebenen Überlegungen sind weitere Studien notwendig, um den genauen zugrunde liegenden Mechanismus für die immunstimulierende Wirkung von DHEA auf Immunzellen zu untersuchen.

5.7 Effekt von DHEA auf die RNA-Expression

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten keine signifikante Änderung der IL-1β, TNF-α oder IL-6 mRNA-Expression durch postoperative PBMC nach Behandlung mit DHEA. Aufgrund des niedrigen Patientenkollektivs (8 Patienten für die zweistündige Inkubation und lediglich 3 Patienten für die vier- und achtstündige Inkubation) sind die Ergebnisse nur begrenzt aussagefähig. Sie tragen jedoch zur erstmaligen Abschätzung der DHEA-Wirkung auf die RNA-Expression von

postoperativen PBMC bei. Insgesamt war es überraschend, dass eine durch DHEA gesteigerte Zytokinsekretion nicht mit einer erhöhten RNA-Expression einherging. Obwohl Unterschiede zu erwarten gewesen wären, konnte für DHEA in dieser Studie keine Wirkung auf molekulargenetischer Ebene nachgewiesen werden. Auch in der Literatur fanden sich keine weitergehenden Erkenntnisse über den genauen Wirkmechanismus von DHEA auf die RNA-Expression. Möglicherweise wären zu einem nicht untersuchten Zeitpunkt Unterschiede bzw. eine Veränderung in der mRNA-Expression durch DHEA-Behandlung sichtbar gewesen. Alternativ könnte DHEA zur Freisetzung von präformierten Zytokinen beitragen, ohne die RNA-Expression selbst zu beeinflussen. Diesbezüglich sind weitere Studien erforderlich, um die zugrunde liegenden Wechselwirkungen erkennen zu können..

5.8 PBMC Subpopulationen

Bei der Durchführung dieser Arbeit wurde in allen verwendeten Versuchsansätzen eine definierte Zellzahl verwendet. Somit ist vor allem die prozentuale Verteilung der PBMC Subpopulationen von Bedeutung, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Änderungen innerhalb der PBMC und der in dieser Studie beobachteten postoperativ verringerten IL-1β und TNF-α Ausschüttung erkennen zu können. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen einen signifikanten Rückgang des Lymphozytenanteils, eine Steigerung der Granulozyten, sowie einen nahezu unveränderten Prozentsatz von Monozyten nach dem operativen Trauma. Diese Änderung in der Verteilung von Immunzellen könnte zu einem bestimmten Ausmaß für die Unterschiede in der prä- und postoperativen Zytokinsekretion verantwortlich sein. Jene Veränderungen in der Verteilung von Immunzellen treten jedoch auch bei chirurgischen Patienten auf und reflektieren daher die beeinträchtigten Zytokinprofile einer *in vivo* Situation. Es sollte betont werden, dass DHEA unabhängig von der Zellverteilung zu einer signifikanten Steigerung der Zytokin-Sekretionsfähigkeit von PBMC in Reaktion auf *in vitro* LPS-Stimulation führte. Dennoch sind weitere Studien mit separierten peripheren mononukleären Zellen notwendig, um zu klären, welche Immunzelle innerhalb der PBMC für die gesteigerte Sekretionskapazität infolge DHEA Behandlung verantwortlich ist. Möglicherweise liegt der Angriffspunkt innerhalb der Makrophagen-Zellreihe, die wesentlich an der postoperativ unterdrückten Immunantwort beteiligt zu sein scheint

(48). Diesbezüglich zeigte sich eine Reduktion der für die Makrophagen-T-Zell-Interaktion wichtigen Expression von MHC Klasse II Molekülen infolge operativen Traumas (16,18,111). Anhand der durchgeführten Untersuchungen kann jedoch keine Aussage über die Grundlage der sich postoperativ entwickelnden Anergie der Zellen getroffen werden. Eine Klärung der zugrunde liegenden Zusammenhänge müsste in weiterführenden Studien erfolgen.

Bei der durchflusszytometrischen Differenzierung der Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den relativen Subpopulationen von präoperativen und postoperativen PBMC. Auch gab es keine signifikante Änderung des Verhältnisses von CD4 und CD8 positiven T-Zellen. Diese Daten sind vereinbar mit Ergebnissen anderer Studien, in denen sich postoperativ keine relevanten Änderungen der relativen Lymphozytensubpopulationen oder des CD4+/CD8+-Quotienten zeigten (99,108). Die Verteilung der einzelnen Lymphozytenklassen scheint somit an den in dieser Studie beobachteten Änderungen nicht beteiligt zu sein.

6 Zusammenfassung

Experimentelle und klinische Studien weisen auf eine Immunsuppression nach großen abdominellen Operationen hin, die mit einer erhöhten Inzidenz septischer Komplikationen und einer nicht zu vernachlässigenden Mortalitätsrate verbunden ist. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass durch die Therapie mit dem Steroidhormon DHEA eine Immunsuppression nach Trauma und hämorrhagischem Schock verhindert werden kann. Ferner führte die Behandlung von Mäusen mit DHEA zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebensrate nach traumatisch-hämorrhagischem Schock und anschließend induzierter polymikrobieller Sepsis. Der Effekt von DHEA auf die Splenozytenproliferation konnte durch den Östrogenrezeptorantagonisten Tamoxifen geblockt werden. Auch am Menschen wirkte sich die Einnahme von DHEA aus verschiedenster Sicht positiv aus. Trotz dieser Tatsache und der vielversprechenden tierexperimentellen Beobachtungen stand eine klinische Bestätigung der immunprotektiven Effekte von DHEA bislang noch aus und sollte im Rahmen dieser prospektiven, klinisch-experimentellen Studie untersucht werden.

Hierfür wurde in dieser Arbeit die PBMC-Funktion chirurgischer Patienten in unterschiedlichen Versuchsansätzen untersucht. DHEA führte zu einer Steigerung der nach großen abdominal-chirurgischen Operationen unterdrückten TNF-α und IL-1β Sekretionsfähigkeit sowie der IL-6 Ausschüttung von mit LPS stimulierten PBMC. Dieser Effekt schien von der gewählten DHEA Konzentration abhängig zu sein. Zudem zeigte sich für DHEA ein zu LPS synergistischer Effekt auf die PBMC-Funktion, durch den geringere LPS Konzentrationen für die Aktivierung von PBMC nötig waren. Die Ergebnisse lassen ebenfalls eine bei postoperativem Plasma und postoperativen Zellen stärkere Wirkung von DHEA erkennen. Diesbezüglich scheint das operative Trauma selbst eine beeinflussende Rolle zu spielen, deren Mechanismus jedoch unklar bleibt. Die Klärung dieser Frage müsste in weiterführenden Studien erfolgen.

Die stimulierende DHEA-Wirkung auf die IL-6 und IL-1β Zytokinsekretion von PBMC wurde in dieser Studie durch den Einsatz des Östrogenrezeptorantagonisten Tamoxifen vollständig geblockt. Somit scheint der Östrogenrezeptor in den Wirkungsmechanismus involviert zu sein. Die durch DHEA

induzierte TNF-α Ausschüttung wurde dagegen durch Tamoxifen gesteigert. Auch hier müssten weitere Studien zur Klärung des Mechanismus durchgeführt werden.

Zusammenfassend führte DHEA zu einer Verbesserung der PBMC-Funktion nach abdominal-chirurgischem Trauma *in vitro*. Trotzdem bleibt es unklar, welchen Stellenwert diese *in vitro* Stimulation für den Patienten *in vivo* besitzt. Gemeinsam mit Tierstudien, die für DHEA *in vivo* immunprotektive und das Überleben steigernde Effekte zeigten, lassen diese Ergebnisse jedoch einen perioperativen Einsatz von DHEA zur Modulation der Immunfunktion chirurgischer Patienten sinnvoll erscheinen. Ein vergleichbarer immunprotektiver Effekt müsste deshalb in weiteren Patientenstudien *in vivo* validiert werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Testosterone: the culprit for producing splenocyte immune depression after trauma hemorrhage. *Am.J.Physiol* 1998; 274:C1530-C1536
2. 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
3. Angele MK, Catania RA, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Dehydroepiandrosterone: an inexpensive steroid hormone that decreases the mortality due to sepsis following trauma-induced hemorrhage. *Arch.Surg.* 1998; 133:1281-1288
4. Angele MK, Faist E: Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 2002; 6:298-305
5. 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
6. Angele MK, Knoferl MW, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Sex steroids regulate pro- and anti-inflammatory cytokine release by macrophages after trauma-hemorrhage. *Am.J.Physiol* 1999; 277:C35-C42
7. Angele MK, Schwacha MG, Ayala A, Chaudry IH: Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock. *Shock* 2000; 14:81-90
8. 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
9. Angele MK, Xu YX, Ayala A, Schwacha MG, Catania RK, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Gender dimorphism in trauma-hemorrhage-induced thymocyte apoptosis. *Shock* 1999; 12:316-322
10. Araneo B, Daynes R: Dehydroepiandrosterone functions as more than an antiglucocorticoid in preserving immunocompetence after thermal injury. *Endocrinology* 1995; 136:393-401

11. Araneo B, Dowell T, Woods ML, Daynes R, Judd M, Evans T: DHEAS as an effective vaccine adjuvant in elderly humans. Proof-of-principle studies. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1995; 774:232-248

12. Araneo BA, Shelby J, Li GZ, Ku W, Daynes RA: Administration of dehydroepiandrosterone to burned mice preserves normal immunologic competence. *Arch.Surg.* 1993; 128:318-325

13. Arlt W, Callies F, Koehler I, van Vlijmen JC, Fassnacht M, Strasburger CJ, Seibel MJ, Huebler D, Ernst M, Oettel M, Reincke M, Schulte HM, Allolio B: Dehydroepiandrosterone supplementation in healthy men with an age-related decline of dehydroepiandrosterone secretion. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2001; 86:4686-4692

14. Arlt W, Callies F, van Vlijmen JC, Koehler I, Reincke M, Bidlingmaier M, Huebler D, Oettel M, Ernst M, Schulte HM, Allolio B: Dehydroepiandrosterone replacement in women with adrenal insufficiency. *N.Engl.J.Med.* 1999; 341:1013-1020

15. Arlt W, Justl HG, Callies F, Reincke M, Hubler D, Oettel M, Ernst M, Schulte HM, Allolio B: Oral dehydroepiandrosterone for adrenal androgen replacement: pharmacokinetics and peripheral conversion to androgens and estrogens in young healthy females after dexamethasone suppression. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1998; 83:1928-1934

16. 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

17. Ayala A, Lehman DL, Herdon CD, Chaudry IH: Mechanism of enhanced susceptibility to sepsis following hemorrhage. Interleukin-10 suppression of T-cell response is mediated by eicosanoid-induced interleukin-4 release. *Arch.Surg.* 1994; 129:1172-1178

18. Ayala A, Perrin MM, Ertel W, Chaudry IH: Differential effects of hemorrhage on Kupffer cells: decreased antigen presentation despite increased inflammatory cytokine (IL-1, IL-6 and TNF) release. *Cytokine* 1992; 4:66-75

19. Baigrie RJ, Lamont PM, Kwiatkowski D, Dallman MJ, Morris PJ: Systemic cytokine response after major surgery. *Br.J.Surg.* 1992; 79:757-760

20. Barry NN, McGuire JL, van Vollenhoven RF: Dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus: relationship between dosage, serum levels, and clinical response. *J.Rheumatol.* 1998; 25:2352-2356

21. Baulieu EE, Thomas G, Legrain S, Lahlou N, Roger M, Debuire B, Faucounau V, Girard L, Hervy MP, Latour F, Leaud MC, Mokrane A, Pitti-Ferrandi H, Trivalle C, de Lacharriere O, Nouveau S, Rakoto-Arison B, Souberbielle JC, Raison J, Le Bouc Y, Raynaud A, Girerd X, Forette F: Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; 97:4279-4284

22. Ben Nathan D, Padgett DA, Loria RM: Androstenediol and dehydroepiandrosterone protect mice against lethal bacterial infections and lipopolysaccharide toxicity. *J.Med.Microbiol.* 1999; 48:425-431

23. Blauer KL, Poth M, Rogers WM, Bernton EW: Dehydroepiandrosterone antagonizes the suppressive effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation. *Endocrinology* 1991; 129:3174-3179

24. Bone RC: Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA* 1992; 268:3452-3455

25. Brown E, Atkinson JP, Fearon DT: Innate immunity: 50 ways to kill a microbe. *Curr.Opin.Immunol.* 1994; 6:73-74

26. Brune IB, Wilke W, Hensler T, Holzmann B, Siewert JR: Downregulation of T helper type 1 immune response and altered pro-inflammatory and anti-inflammatory T cell cytokine balance following conventional but not laparoscopic surgery. *Am.J.Surg.* 1999; 177:55-60

27. Calvano SE, Chiao J, Reaves LE, Antonacci AC, Shires GT: Changes in free and total levels of plasma cortisol and thyroxine following thermal injury in man. *Journal of Burn Care Rehabilitation* 1984; 5:143-151

28. Casson PR, Andersen RN, Herrod HG, Stentz FB, Straughn AB, Abraham GE, Buster JE: Oral dehydroepiandrosterone in physiologic doses modulates immune function in postmenopausal women. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 1993; 169:1536-1539

29. Catania RA, Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Dehydroepiandrosterone restores immune function following trauma-haemorrhage by a direct effect on T lymphocytes. *Cytokine* 1999; 11:443-450

30. Chaudry IH, Ayala A: Immunological Aspects of Hemorrhage. 1992; 1-132
31. Chaudry IH, Ayala A, Ertel W, Stephan RN: Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects. *Am.J.Physiol* 1990; 259:R663-R678
32. Christeff N, Gharakhanian S, Thobie N, Rozenbaum W, Nunez EA: Evidence for changes in adrenal and testicular steroids during HIV infection. *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.* 1992; 5:841-846
33. Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, Van Damme J, Shenkin A: Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin.Sci.(Lond)* 1990; 79:161-165
34. Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, Lamy M: Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann.Surg.* 1992; 215:356-362
35. Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, Franchimont P: Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med.* 1989; 17:975-978
36. Danenberg HD, Alpert G, Lustig S, Ben Nathan D: Dehydroepiandrosterone protects mice from endotoxin toxicity and reduces tumor necrosis factor production. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1992; 36:2275-2279
37. Daynes RA, Araneo BA: Prevention and reversal of some age-associated changes in immunologic responses by supplemental dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) therapy. *Aging Immunol Infect Dis* 1992; 3:135-141
38. Daynes RA, Araneo BA, Ershler WB, Maloney C, Li GZ, Ryu SY: Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative. *J.Immunol.* 1993; 150:5219-5230
39. De AK, Kodys K, Puyana JC, Fudem G, Pellegrini J, Miller-Graziano CL: Only a subset of trauma patients with depressed mitogen responses have true T cell dysfunctions. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1997; 82:73-82
40. Deitch EA: Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* 1998; 9:1-11
41. Delpedro AD, Barjavel MJ, Mamdouh Z, Bakouche O: Activation of human monocytes by LPS and DHEA. *J.Interferon Cytokine Res.* 1998; 18:125-135
42. Dinarello CA: The biology of interleukin-1. *Chem.Immunol.* 1992; 51:1-32

43. Diodato MD, Knoferl MW, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH: Gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis. *Cytokine* 2001; 14:162-169

44. Ebeling P, Koivisto VA: Physiological importance of dehydroepiandrosterone. *Lancet* 1994; 343:1479-1481

45. 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

46. Evans TG, Judd ME, Dowell T, Poe S, Daynes RA, Araneo BA: The use of oral dehydroepiandrosterone sulfate as an adjuvant in tetanus and influenza vaccination of the elderly. *Vaccine* 1996; 14:1531-1537

47. Faist E, Kupper TS, Baker CC, Chaudry IH, Dwyer J, Baue AE: Depression of cellular immunity after major injury. Its association with posttraumatic complications and its reversal with immunomodulation. *Arch.Surg.* 1986; 121:1000-1005

48. Faist E, Mewes A, Strasser T, Walz A, Alkan S, Baker C, Ertel W, Heberer G: Alteration of monocyte function following major injury. *Arch.Surg.* 1988; 123:287-292

49. Faist E, Storck M, Hultner L, Redl H, Ertel W, Walz A, Schildberg FW: Functional analysis of monocyte activity through synthesis patterns of proinflammatory cytokines and neopterin in patients in surgical intensive care. *Surgery* 1992; 112:562-572

50. Fearon DT, Locksley RM: The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272:50-53

51. Fiedler VB, Loof I, Sander E, Voehringer V, Galanos C, Fournel MA: Monoclonal antibody to tumor necrosis factor--alpha prevents lethal endotoxin sepsis in adult rhesus monkeys. *J.Lab Clin.Med.* 1992; 120:574-588

52. Fishman P, Nedivi R, Djaldetti M, Sredni B, Kayzer S, Chaimoff C: Kinetics of cortisol, interleukin-2 and interleukin-3-like activity levels following surgical intervention. *Nat.Immun.* 1993; 12:35-40

53. Flynn MA, Weaver-Osterholtz D, Sharpe-Timms KL, Allen S, Krause G: Dehydroepiandrosterone replacement in aging humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1999; 84:1527-1533

54. Gabriel P, Cakman I, Rink L: Overproduction of monokines by leukocytes after stimulation with lipopolysaccharide in the elderly. *Exp.Gerontol.* 2002; 37:235-247

55. Gianotti L, Alexander JW, Fukushima R, Pyles T: Steroid therapy can modulate gut barrier function, host defense, and survival in thermally injured mice. *J.Surg.Res.* 1996; 62:53-58

56. Glerup H, Heindorff H, Flyvbjerg A, Jensen SL, Vilstrup H: Elective laparoscopic cholecystectomy nearly abolishes the postoperative hepatic catabolic stress response. *Ann.Surg.* 1995; 221:214-219

57. Griffith JP, Everitt NJ, Lancaster F, Boylston A, Richards SJ, Scott CS, Benson EA, Sue-Ling HM, McMahon MJ: Influence of laparoscopic and conventional cholecystectomy upon cell-mediated immunity. *Br.J.Surg.* 1995; 82:677-680

58. Haupt W, Riese J, Mehler C, Weber K, Zowe M, Hohenberger W: Monocyte function before and after surgical trauma. *Dig.Surg.* 1998; 15:102-104

59. 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

60. Hensler T, Heidecke CD, Hecker H, Heeg K, Bartels H, Zantl N, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B: Increased susceptibility to postoperative sepsis in patients with impaired monocyte IL-12 production. *J.Immunol.* 1998; 161:2655-2659

61. Hildebrand F, Pape HC, Hoevel P, Krettek C, van Griensven M: The importance of systemic cytokines in the pathogenesis of polymicrobial sepsis and dehydroepiandrosterone treatment in a rodent model. *Shock* 2003; 20:338-346

62. Huppert FA, Van Niekerk JK, Herbert J: Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation for cognition and well-being. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* 2000; CD000304

63. Inoue T, Saito H, Fukushima R, Inaba T, Lin MT, Fukatsu K, Muto T: Growth hormone and insulinlike growth factor I enhance host defense in a murine sepsis model. *Arch.Surg.* 1995; 130:1115-1122

64. Jarrar D, Wang P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Mechanisms of the salutary effects of dehydroepiandrosterone after trauma-hemorrhage: direct or indirect effects on cardiac and hepatocellular functions? *Arch.Surg.* 2000; 135:416-422

65. Jarrar D, Wang P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: The female reproductive cycle is an important variable in the response to trauma-hemorrhage. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000; 279:H1015-H1021

66. Johnston RB, Jr.: Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *N.Engl.J.Med.* 1988; 318:747-752

67. Kahlke V, Angele MK, Ayala A, Schwacha MG, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Immune dysfunction following trauma-haemorrhage: influence of gender and age. *Cytokine* 2000; 12:69-77

68. Kahlke V, Angele MK, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Reversal of sexual dimorphism in splenic T lymphocyte responses after trauma-hemorrhage with aging. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2000; 278:C509-C516

69. Kleinschmidt S, Wanner GA, Bussmann D, Kremer JP, Ziegenfuss T, Menger MD, Bauer M: Proinflammatory cytokine gene expression in whole blood from patients undergoing coronary artery bypass surgery and its modulation by pentoxifylline. *Shock* 1998; 9:12-20

70. Knoferl MW, Angele MK, Catania RA, Diodato MD, Bland KI, Chaudry IH: Immunomodulatory effects of dehydroepiandrosterone in proestrus female mice after trauma-hemorrhage. *J.Appl.Physiol* 2003; 95:529-535

71. Knoferl MW, Angele MK, Diodato MD, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Female sex hormones regulate macrophage function after trauma-hemorrhage and prevent increased death rate from subsequent sepsis. *Ann.Surg.* 2002; 235:105-112

72. Knoferl MW, Angele MK, Schwacha MG, Anantha Samy TS, Bland KI, Chaudry IH: Immunoprotection in proestrus females following trauma-hemorrhage: the pivotal role of estrogen receptors. *Cell Immunol.* 2003; 222:27-34

73. Knoferl MW, Angele MK, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH: Preservation of splenic immune functions by female sex hormones after trauma-hemorrhage. *Crit Care Med.* 2002; 30:888-893

74. Knoferl MW, Diodato MD, Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Do female sex steroids adversely or beneficially affect the depressed immune responses in males after trauma-hemorrhage? *Arch.Surg.* 2000; 135:425-433

75. Knoferl MW, Jarrar D, Angele MK, Ayala A, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH: 17 beta-Estradiol normalizes immune responses in ovariectomized females after trauma-hemorrhage. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2001; 281:C1131-C1138

76. Knoferl MW, Schwacha MG, Jarrar D, Angele MK, Fragoza K, Bland KI, Chaudry IH: Estrogen pretreatment protects males against hypoxia-induced immune depression. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2002; 282:C1087-C1092

77. Kong LB, Lekawa M, Navarro RA, McGrath J, Cohen M, Margulies DR, Hiatt JR: Pedestrian-motor vehicle trauma: an analysis of injury profiles by age. *J.Am.Coll.Surg.* 1996; 182:17-23

78. Kuebler JF, Jarrar D, Toth B, Bland KI, Rue L, III, Wang P, Chaudry IH: Estradiol administration improves splanchnic perfusion following trauma-hemorrhage and sepsis. *Arch.Surg.* 2002; 137:74-79

79. Kujovich JL: Hormones and pregnancy: thromboembolic risks for women. *Br.J.Haematol.* 2004; 126:443-454

80. Labrie F, Belanger A, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Cusan L, Gomez JL, Candas B: DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: its role during aging. *Steroids* 1998; 63:322-328

81. Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J: DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol.* 2001; 22:185-212

82. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA: The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 1999; 11:153-159

83. Legrain S, Massien C, Lahlou N, Roger M, Debuire B, Diquet B, Chatellier G, Azizi M, Faucounau V, Porchet H, Forette F, Baulieu EE: Dehydroepiandrosterone replacement administration: pharmacokinetic and pharmacodynamic studies in healthy elderly subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2000; 85:3208-3217

84. Lennard TW, Shenton BK, Borzotta A, Donnelly PK, White M, Gerrie LM, Proud G, Taylor RM: The influence of surgical operations on components of the human immune system. *Br.J.Surg.* 1985; 72:771-776

85. Loria RM, Inge TH, Cook SS, Szakal AK, Regelson W: Protection against acute lethal viral infections with the native steroid dehydroepiandrosterone (DHEA). *J.Med.Virol.* 1988; 26:301-314

86. Lowisniewski T, Hilton CW, Morse EV, Svec F: The relationship to serum DHEA-S and cortisol levels to measures of immune function in human immunodificiency virus-related illness. *Am J Med Sci* 1993; 305:79-86

87. Lyons A, Goebel A, Mannick JA, Lederer JA: Protective effects of early interleukin 10 antagonism on injury-induced immune dysfunction. *Arch.Surg.* 1999; 134:1317-1323

88. Maggiolini M, Donze O, Jeannin E, Ando S, Picard D: Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor alpha. *Cancer Res.* 1999; 59:4864-4869

89. Majetschak M, Christensen B, Obertacke U, Waydhas C, Schindler AE, Nast-Kolb D, Schade FU: Sex differences in posttraumatic cytokine release of endotoxin-stimulated whole blood: relationship to the development of severe sepsis. *J.Trauma* 2000; 48:832-839

90. Marks JD, Marks CB, Luce JM, Montgomery AB, Turner J, Metz CA, Murray JF: Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock. Mortality rate, incidence of adult respiratory distress syndrome, and effects of methylprednisolone administration. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1990; 141:94-97

91. McGowan JE, Jr., Barnes MW, Finland M: 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

92. McLachlan JA, Serkin CD, Bakouche O: Dehydroepiandrosterone modulation of lipopolysaccharide-stimulated monocyte cytotoxicity. *J.Immunol.* 1996; 156:328-335

93. Meikle AW, Dorchuck RW, Araneo BA, Stringham JD, Evans TG, Spruance SL, Daynes RA: The presence of a dehydroepiandrosterone-specific receptor binding complex in murine T cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 1992; 42:293-304

94. Messingham KA, 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

95. Mizushima Y, Wang P, Jarrar D, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Estradiol administration after trauma-hemorrhage improves cardiovascular and hepatocellular functions in male animals. *Ann.Surg.* 2000; 232:673-679

96. Mortola JF, Yen SS: The effects of oral dehydroepiandrosterone on endocrine-metabolic parameters in postmenopausal women. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1990; 71:696-704

97. Nathan CF: Secretory products of macrophages. *J.Clin.Invest* 1987; 79:319-326

98. Nephew KP, Sheeler CQ, Dudley MD, Gordon S, Nayfield SG, Khan SA: Studies of dehydroepiandrosterone (DHEA) with the human estrogen receptor in yeast. *Mol.Cell Endocrinol.* 1998; 143:133-142

99. O'Mahony JB, Palder SB, Wood JJ, McIrvine A, Rodrick ML, Demling RH, Mannick JA: Depression of cellular immunity after multiple trauma in the absence of sepsis. *J.Trauma* 1984; 24:869-875

100. O'Suilleabhain C, O'Sullivan ST, Kelly JL, Lederer J, Mannick JA, Rodrick ML: Interleukin-12 treatment restores normal resistance to bacterial challenge after burn injury. *Surgery* 1996; 120:290-296

101. O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DH, Mannick JA, Rodrick ML: Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann.Surg.* 1995; 222:482-490

102. Oberbeck R, Dahlweid M, Koch R, van Griensven M, Emmendorfer A, Tscherne H, Pape HC: Dehydroepiandrosterone decreases mortality rate and improves cellular immune function during polymicrobial sepsis. *Crit Care Med.* 2001; 29:380-384

103. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL: Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med.* 2000; 28:N3-12

104. Offner PJ, Moore EE, Biffl WL: Male gender is a risk factor for major infections after surgery. *Arch.Surg.* 1999; 134:935-938

105. Offner PJ, Moore EE, Ciesla D: The adrenal response after severe trauma. *Am.J.Surg.* 2002; 184:649-653

106. Okabe T, Haji M, Takayanagi R, Adachi M, Imasaki K, Kurimoto F, Watanabe T, Nawata H: Up-regulation of high-affinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1995; 80:2993-2996

107. Olsen NJ, Kovacs WJ: Gonadal steroids and immunity. *Endocr.Rev.* 1996; 17:369-384

108. Ordemann J, Jacobi CA, Schwenk W, Stosslein R, Muller JM: Cellular and humoral inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections. *Surg.Endosc.* 2001; 15:600-608

109. Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, Vogelman JH: Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1984; 59:551-555

110. Orentreich N, Brind JL, Vogelman JH, Andres R, Baldwin H: Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in normal men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1992; 75:1002-1004

111. Polk HC, Jr., George CD, Wellhausen SR, Cost K, Davidson PR, Regan MP, Borzotta AP: A systematic study of host defense processes in badly injured patients. *Ann.Surg.* 1986; 204:282-299

112. Pruitt JH, Copeland EM, III, Moldawer LL: Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism in sepsis, systemic inflammatory response syndrome, and septic shock. *Shock* 1995; 3:235-251

113. Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, Shin J, Nemzek JA: Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock* 2002; 17:463-467

114. Salvini S, Stampfer MJ, Barbieri RL, Hennekens CH: Effects of age, smoking and vitamins on plasma DHEAS levels: a cross-sectional study in men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1992; 74:139-143

115. 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

116. Schmidt M, Kreutz M, Loffler G, SchOLmerich J, Straub RH: Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *J.Endocrinol.* 2000; 164:161-169

117. Schuurs AH, Verheul HA: Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J.Steroid Biochem.* 1990; 35:157-172

118. Solerte SB, Fioravanti M, Vignati G, Giustina A, Cravello L, Ferrari E: Dehydroepiandrosterone sulfate enhances natural killer cell cytotoxicity in humans via locally generated immunoreactive insulin-like growth factor I. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1999; 84:3260-3267

119. Straub RH, Konecna L, Hrach S, Rothe G, Kreutz M, SchOLmerich J, Falk W, Lang B: Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1998; 83:2012-2017

120. Teodorczyk-Injeyan J, Cembrzynska-Nowak M, Lalani S, Kellen JA: Modulation of biological responses of normal human mononuclear cells by antiestrogens. *Anticancer Res.* 1993; 13:279-283

121. van Griensven M, Dahlweid FM, Giannoudis PV, Wittwer T, Bottcher F, Breddin M, Pape HC: Dehydroepiandrosterone (DHEA) modulates the activity and the expression of lymphocyte subpopulations induced by cecal ligation and puncture. *Shock* 2002; 18:445-449

122. Verthelyi D: Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int.Immunopharmacol.* 2001; 1:983-993

123. Verthelyi D, Klinman DM: Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells in vivo. *Immunology* 2000; 100:384-390

124. Waage A, Halstensen A, Espevik T: Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet* 1987; 1:355-357

125. Walker CB, Bruce DM, Heys SD, Gough DB, Binnie NR, Eremin O: Minimal modulation of lymphocyte and natural killer cell subsets following minimal access surgery. *Am.J.Surg.* 1999; 177:48-54

126. Wheeler JG, Givner LB: Therapeutic use of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in neonatal rats with type III group B streptococcal sepsis. *J.Infect.Dis.* 1992; 165:938-941

127. 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; 8:242-248

128. 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

129. Wichmann MW, Ayala A, Chaudry IH: Severe depression of host immune functions following closed-bone fracture, soft-tissue trauma, and hemorrhagic shock. *Crit Care Med.* 1998; 26:1372-1378

130. Wichmann MW, Inthorn D, Andress 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

131. Wichmann MW, Muller C, Meyer G, Adam M, Angele MK, Eisenmenger SJ, Schildberg FW: Different immune responses to abdominal surgery in men and women. *Langenbecks Arch.Surg.* 2003; 387:397-401

132. Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH: Enhanced immune responses in females, as opposed to decreased responses in males following haemorrhagic shock and resuscitation. *Cytokine* 1996; 8:853-863

133. Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH: Mechanism of immunosuppression in males following trauma-hemorrhage. Critical role of testosterone. *Arch.Surg.* 1996; 131:1186-1191

134. Wisniewski TL, Hilton CW, Morse EV, Svec F: The relationship of serum DHEA-S and cortisol levels to measures of immune function in human immunodeficiency virus-related illness. *Am.J.Med.Sci.* 1993; 305:79-83

135. Wong GG, Clark SC: Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. *Immunol.Today* 1988; 9:137-139

136. Xu YX, Ayala A, Chaudry IH: Prolonged immunodepression after trauma and hemorrhagic shock. *J.Trauma* 1998; 44:335-341

137. Yen SS, Morales AJ, Khorram O: Replacement of DHEA in aging men and women. Potential remedial effects. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1995; 774:128-142

138. 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

139. Zellweger R, Ayala A, DeMaso CM, Chaudry IH: Trauma-hemorrhage causes prolonged depression in cellular immunity. *Shock* 1995; 4:149-153

140. Zellweger R, Zhu XH, Wichmann MW, Ayala A, DeMaso CM, Chaudry IH: Prolactin administration following hemorrhagic shock improves macrophage cytokine release capacity and decreases mortality from subsequent sepsis. *J.Immunol.* 1996; 157:5748-5754

8 Danksagung

Meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. med. Martin K. Angele möchte ich für die Überlassung dieses Themenbereiches zur Anfertigung meiner Dissertation und für die freundschaftliche Betreuung bei der Durchführung danken. Mein besonderer Dank gilt ihm auch für die Einführung in die wissenschaftliche Tätigkeit, insbesondere im Hinblick auf die Verfassung wissenschaftlicher Arbeiten sowie deren Präsentation im Rahmen von Kongressen.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Natasja van den Engel für ihre ständige Hilfsbereitschaft und kompetente Unterstützung bei der Optimierung von Arbeitsmethoden.

Ebenso möchte ich Herrn Niclas J. Prix danken, der mich während seiner Beschäftigung als Zivildienstleistender im Labor bei der Versuchsdurchführung unterstützt hat.

Meinen Mitdoktoranden Florian Wittmann, Stefan Mayr, Sebastian Brechenmacher und Johannes Dietz danke ich für die „Belebung“ der sterilen Laborarbeit.

Frau Katharina Engel danke ich von ganzem Herzen für ihre liebevolle Art, ihre Lebensfreude und ihre Liebe, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit beflügelt haben.

Meinen Eltern möchte ich diese Arbeit widmen und möchte ihnen für die langjährige Unterstützung während des Studiums von ganzem Herzen danken.

9 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Markus Christopher Frantz
Adresse:	Van-Gogh-Str. 2
	85521 Ottobrunn
	Telefon: 0177 4 13 78 07
	Email: markus.frantz@web.de
Geburtsdatum:	08.12.1977
Geburtsort:	München
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1987 – 1997:	Gymnasium Unterhaching

Universitätsausbildung

10/04:	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/03:	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/01:	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/00:	Ärztliche Vorprüfung
10/98:	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Praktische Ausbildung

Seit 01/05:	Assistenzarzt an der Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar
03/04:	Teilnahme an einem Kurs der Mikrochirurgie, Abteilung für Neurochirurgie, UniversitätsSpital Zürich, Schweiz

Praktisches Jahr

06/04 – 09/04:	Innere Medizin-Tertial in der Medizinischen Klinik des Lehrkrankenhauses München-Neuperlach
04/04 – 05/04:	Chirurgie-Tertial (2. Teil) in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der LMU München
02/04 – 03/04:	Chirurgie-Tertial (1. Teil) in der Neurochirurgischen Klinik des UniversitätsSpitals Zürich, Schweiz
10/03 – 01/04:	Wahlfach-Tertial in der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenkranke der LMU München

Famulaturen

02/03 – 03/03:	Famulatur in der Gemeinschaftspraxis für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Poing bei München (Dres. Funk, Weinberger, Lössl)
08/02 – 09/02:	Famulatur in der Chirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern, Universität München
03/01 – 04/01:	Famulatur in der Chirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern, Universität München
02/01 – 03/01:	Famulatur in der Kinderchirurgischen Klinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der Universität München