Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf E. Mutschler

ANALYSE DER ZYTOKINSYNTHESE-KAPAZITÄT VON MONOZYTEN POLYTRAUMATISIERTER PATIENTEN

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

vorgelegt von
Chlodwig Maria Kirchhoff
aus
München
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. W. E. Mutschler
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. G. Kuhnle
	Priv. Doz. Dr. med. M. Angele
Promovierter Betreuer:	Priv. Doz. Dr. med. P. Biberthaler
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	23.11.2006

Gewidmet meinen geliebten Eltern

Inhalt

1. EINLEITUNG UND HINTERGRUND 1

1.1. Induktion und Pathophysiologie des posttraumatischen SIRS 2

1.2. Unspezifische und spezifische Mechanismen 6
1.2.1. Humorale Mediatoren 7
1.2.2. Zelluläre Mechanismen 9

1.3. Proinflammatorische Zytokine 12
1.3.1. Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) 14
1.3.2. Interleukin-1β (Il-1β) 16
1.3.3. Interleukin-6 (Il-6) 17
1.3.4. Interleukin-8 (Il-8) 19

1.4. Methodische Aspekte 21

2. FRAGESTELLUNG 23

3. MATERIAL UND METHODEN 25

3.1. Stufe I – Validierung des experimentellen Protokolls 26
3.1.1. Probanden 26
3.1.2. Stimuli 26
3.1.3. Sekretionsblockade 27
3.1.4. Inkubationszeit 29

3.2. Stufe II - Klinisch-experimenteller Abschnitt 30
3.2.1. Patienten und Kontrollkollektiv 30
3.2.2. Probengewinnung 31
3.2.3. Stimulation und Inkubation 32
3.2.4. Zellpräparation und Antikörper-Markierung 35
3.2.5. Durchflußzytometrische Analyse 38
3.2.6. Analyse der systemischen Konzentration mittels ELISA 41
3.2.7. Statistische Auswertung 41

4. ERGEBNISSE 43

4.1. Stufe I – Validierung des experimentellen Protokolls 43
4.1.1. Probanden 43
4.1.2. Stimuli 43
4.1.3. Sekretionsblockade 44
4.1.4. Inkubationszeit 45

4.2. Stufe II - Klinisch-experimenteller Abschnitt 47
4.2.1. Patienten und Kontrollkollektiv 47
4.2.2. Durchflußzytometrische Analyse 49
4.2.3. Analyse der systemischen Konzentration mittels ELISA 60

5. DISKUSSION 63

5.1. Stufe I – Validierung des experimentellen Protokolls 63
5.1.1. Stimuli 64
5.1.2. Sekretionsblockade 66
5.1.3. Inkubationszeit 67

5.2. Stufe II - Klinisch-experimenteller Abschnitt 68
5.2.1. Patienten und Kontrollkollektiv 68
5.2.2. Probengewinnung 70
5.2.3. Durchflußzytometrische Analyse 72
5.2.4. Serumanalyse mittels ELISA 77

5.3. Relevanz für die Klinik 78

6. ZUSAMMENFASSUNG 80

7. LITERATUR 83

8. GLOSSAR 99

9. LEBENSLAUF 102

10. DANKSAGUNG 104

1. Einleitung und Hintergrund

Unter dem Begriff *Polytrauma* versteht man die gleichzeitige Verletzung mehrerer Körperregionen oder Organsysteme, wobei eine der Verletzungen allein, oder die Kombination mehrerer Verletzungen lebensbedrohlich ist (184).

Die Hauptursache von Polytraumata sind mit 56,7–71% Verkehrsunfälle (198). Trauma ist in der westlichen Welt die führende Todesursache in der Altersgruppe bis 45 Jahre, so beträgt die Letalität nach solch massiven Verletzungen in der Literatur 18,6–35% (13;129). In Deutschland starben 2004 insgesamt 5.844 Menschen an den Folgen eines Unfalles (175). Durch eine verbesserte medizinische Versorgung dieser Patienten im Verlauf der letzten Jahrzehnte konnte seit den 70er Jahren eine Reduktion der Todesrate um etwa 20% erreicht werden. Die Gründe für diese Entwicklung sind vielfältig (13). So konnten Verbesserungen im Fahrzeugbau und der allgemeinen Verkehrssicherheit ebenso zu einer Verminderung der frühen Mortalität und der Gesamtverletzungsschwere beitragen wie die Verkürzung der Rettungszeiten, die verbesserte Ausstattung des Rettungsdienstes und die Verzahnung der präklinischen Therapie mit der Schockraumversorgung.

Als Folge der steigenden Anzahl von Patienten, die trotz schwerster Verletzungen oder Verbrennungen lebend die Klinik erreichen, ist die Häufigkeit von Komplikationen trotz verbesserter intensivmedizinischer Möglichkeiten gestiegen (65;91;128).

Während die frühe Letalität innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Unfall hauptsächlich durch das schwere Schädel-Hirn-Trauma und ausgedehnte Massenblutungen nach Verletzung von großen Gefäßen oder stark durchbluteten Organen determiniert ist (183), wird die Spätletalität durch die pathophysiologischen Folgen der ausgedehnten Verletzungen, wie hämorrhagischem Schock, Hypoxie, Reperfusionsschäden, Freisetzung aktiver Gewebsfaktoren, Komplementaktivierung und Endotoxinämie, hinführend zu einer

systemischen Entzündungsreaktion determiniert (60;130). Die hierfür verantwortlichen Mechanismen werden im Folgenden näher dargestellt:

1.1. Induktion und Pathophysiologie des posttraumatischen SIRS

Nach schwerem Trauma sowie posttraumatischen Insulten, wie operativen Eingriffen, Transfusionen oder Infekten, konnten sowohl in klinischen als auch in experimentellen Studien signifikante Veränderungen der immunologischen Funktionen beobachtet werden (73;88). Induziert werden sie durch immunologisch aktive Zellen, wie z.B. das Monozyten/Makrophagen-System, welches unter traumatischem Stress rasch zu einer beträchtlichen Synthese und Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer Zytokine, Proteasen, Sauerstoffradikale, Wachstumsfaktoren etc. stimuliert wird (47). Diese Mediatoren spielen zum einen eine bedeutende Rolle bei der Heilung des verletzten Gewebes, zum anderen bilden sie aber auch die Grundlage der Pathogenese von Kreislaufversagen und Zelläsionen, infolge derer u.a. die Granulozytenadhäsion am Endothel, das *capillary leakage syndrome,* und die Verbrauchskoagulopathie auftreten (67;150).

Die unkontrollierbare Exazerbation der inflammatorischen Phänomene wird als *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) beschrieben (24), die Funktionsstörungen initial nicht betroffener Organe als *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* (MODS) (23;141), das bis zum Multi-Organ-Versagen (*Multiple Organ Failure*, MOF) führen kann.

Obschon die Häufigkeit posttraumatischer Organfunktionsstörungen sich nicht zuletzt aufgrund zunehmender intensivmedizinischer Optionen stetig reduzieren ließ, bleibt die Ausbildung eines MOF der determinierende Faktor für die Spät-Letalität (129). Gemäß einer aktuellen Studie von *Nast-Kolb et al.* entwickeln immer noch 33% der schwerverletzten Patienten im klinischen Behandlungsverlauf ein vorübergehendes Versagen mindestens eines

Organsystems, etwa 15% der polytraumatisierten Patienten entwickeln ein MODS. Im internationalen Vergleich finden sich vergleichbare Zahlen bezüglich der Inzidenz dieser posttraumatischen Komplikation (157;172). Aufgrund der umfassenden intensivmedizinischen Maßnahmen und neuer operativer Therapiekonzepte (Konzept des *damage control*) konnte die Inzidenz des MODS in den letzten Jahrzehnten zwar signifikant gesenkt werden, allerdings versterben immer noch bis zu 50% der polytraumatisierten Patienten, die im Behandlungsverlauf ein manifestes MOF entwickeln (42;129).

Zusammenfassend gehen die derzeit gängigsten Hypothesen zur Entstehung des posttraumatischen MOF davon aus, daß die initiale Phase nach einem Polytrauma oder elektiven Operationen im Wesentlichen von einer systemischen proinflammatorischen Inflammation (SIRS) gekennzeichnet ist, wohingegen im späteren Verlauf vor allem eine Immunsuppression oder Immunparalyse zu beobachten ist (112). Dies schließt allerdings nicht aus, daß schon in der frühen Phase auch Zeichen einer eingeschränkten Immunantwort (z.B. verminderte Antigenpräsentation durch Makrophagen, vermehrte Produktion antiinflammatorischer Moleküle) beschrieben wurden. Auch wenn eine endgültige Klärung des genauen zeitlichen und örtlichen Auftretens der Aktivierung der Systeme noch aussteht (2;23;30;138;163;190), ist die individuelle posttraumatische immunologische Reaktion zweifelsfrei durch zahlreiche humorale und zelluläre Faktoren sowohl des unspezifischen als auch des spezifischen Immunsystems charakterisiert.

Zahlreiche Untersuchungen der vergangenen zwei Jahrzehnte ließen folgendes Bild von der Entwicklung des SIRS entsprechend den kürzlich von *Mannick et al.* zusammenfassend dargestellten Grundlagen entstehen (112):

Polytraumatisierte Patienten entwickeln meist direkt nach der initialen Stabilisierungsphase ein SIRS, dem in einem bestimmten Prozentsatz von Patienten multiple

Organfunktionsstörungen folgen (*early* MODS/MOF). Überlebt der Patient diese Phase, kann sich eine kompensatorische Immundysfunktion (*compensatory antiinflammatory response syndrome:* CARS) mit verminderter Resistenz gegenüber Infektionen entwickeln. Tritt eine solche Infektion in dieser Phase mit den begleitenden Entzündungsreaktionen auf, können sich wiederum multiple Organfunktionsstörungen bis hin zum multiplen Organversagen ausbilden (*late* MODS/MOF) **(siehe Abbildung 1)**. In diesem Zusammenhang wurde bereits vor mehr als 20 Jahren erkannt, daß die zu frühe Exposition eines polytraumatisierten Patienten gegenüber einem weiteren starken Stress (wie z.B. aufwendige, lang dauernde Operationen zur intramedullären Stabilisierung von langen Röhrenknochen) zu einer zusätzlichen Freisetzung von immunologisch hoch aktiven Knochenmarksinhalten führt, die dann das bereits durch das initiale Trauma *(first hit)* aus der Balance geratene Immunsystem derart entgleisen lassen, daß es zu einer unvermeidbaren Ausbildung eines posttraumatischen Organversagens kommt. Weiter hat sich gezeigt, daß der Gastrointestinaltrakt besonders empfindlich auf Schockexposition reagiert. Persistierende gastrointestinale Perfusionsstörungen auch nach erfolgreicher Schocktherapie sind maßgeblich an den Mukosaschäden des Darmes beteiligt. Als deren Folge resultiert eine klinisch oft kaum nachweisbare Translokation von Bakterien und Endotoxin über mesenteriale Lymphknoten und –bahnen in die systemische Zirkulation (37). Zusätzlich erreicht die Translokation über das Pfortadersystem die Leber, in der ortsständige Lebermakrophagen durch die vorangegangene Schockphase aktiviert, bei Endotoxin-Kontakt erhebliche Mengen an Mediatoren freisetzen. Dadurch werden sowohl lokale Umstellungen des Leberstoffwechsels auf Akut-Phase Proteine als auch systemische Reaktionen, wie Alveolarschäden in der Lunge etc., induziert (84). Die klinische Entität dieser sekundären Schädigungen nach Überwindung der initialen Stabilisierungsphase wurde als *second hit*-Phänomen beschrieben (136).

Zahlreiche Studien der jüngsten Literatur weisen darauf hin, daß proinflammatorischen Zytokinen im Rahmen des posttraumatischen und postoperativen SIRS sowie der möglicherweise assoziierten Entwicklung eines MODS eine besondere Bedeutung zukommt (52;159;202). So konnte die Infusion rekombinanter, proinflammatorischer Zytokine im Tierversuch ein reversibles MODS hervorrufen, und die Blockade dieser Zytokine die Entwicklung eines Kreislaufversagens im Rahmen eines MODS hemmen (148). Des Weiteren wurden signifikant erhöhte systemische Zytokin-Konzentrationen bei polytraumatisierten Patienten mit manifestem MOF im Vergleich zu Patienten ohne MOF nachgewiesen (6;168;194).

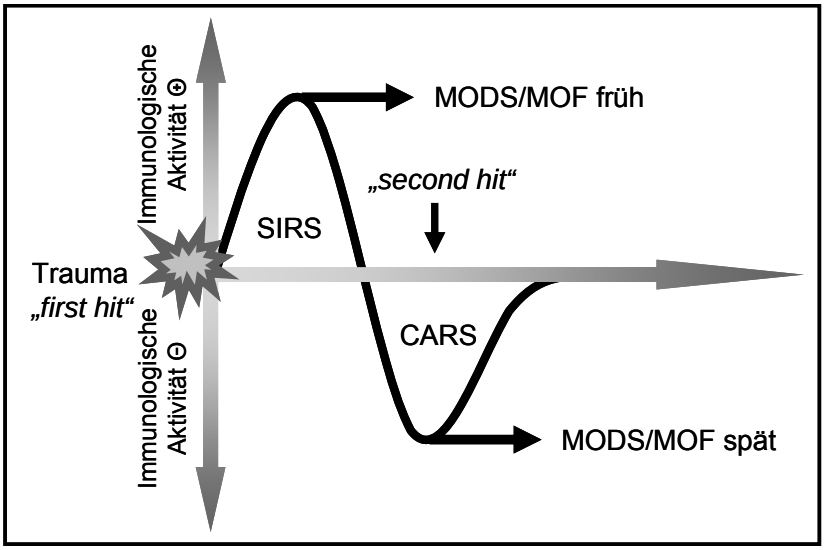

Abbildung 1, Schematische Darstellung der Entwicklung eines posttraumatischen Organversagens: Diese Graphik wurde nach der maßgeblichen Veröffentlichung von *Moore* (124) modifiziert und gibt die derzeit aktuelle Vorstellung von der Dynamik und Ausprägung posttraumatischer Entzündungsreaktionen (SIRS) und deren Zusammenhang mit der Ausbildung von Organfunktionsstörungen (*multiple organ dysfunction syndrome*=MODS) bis hin zum multiplen Organversagen (*multiple organ failure*=MOF) wider. Fällt die Ausbildung eines MODS oder eines Organversagens in die frühe posttraumatische hyperinflammatorische Phase, spricht man von einem frühen, fällt sie in die antiinflammatorische Phase (*compensatory antiinflammatory response syndrome*=CARS) von einem späten MODS bzw. MOF.

Obwohl die initialen auslösenden Mechanismen zur Induktion dieser immunologischen Phänomene bislang nicht eindeutig identifiziert werden konnten, ergaben sich in der jüngeren Vergangenheit jedoch klare Hinweise dafür, daß zunächst eine Aktivierung des unspezifischen, gefolgt vom spezifischen Immunsystem vorzuliegen scheint.

1.2. Unspezifische und spezifische Mechanismen

Das Immunsystem läßt sich im Wesentlichen wie folgt charakterisieren. Unter dem unspezifischen System versteht man physiologische Barrieren, wie Schleimhäute, unspezifische humorale Faktoren (z.B. das Komplementsystem) und phagozytierende Zellen wie Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten (PMN). Unter dem spezifischen System werden auf humoraler Ebene die Bildung von spezifischen Antikörpern und auf zellulärer Ebene differenzierte T- und B-Lymphozyten subsumiert.

Zunächst wiesen Untersuchungen darauf hin, daß sich das SIRS zeitlich der Aktivierung des unspezifischen Immunsystems und das CARS der des spezifischen Immunsystems zuordnen läßt (35;46;86;187;200). In neueren Studien fanden sich dann vermehrt Hinweise dafür, daß beide Abwehrsysteme mit beiden Phänomenen verknüpft sind. Weiter gibt es Daten dafür, daß beide Phänomene gleichzeitig in verschiedenen Lokalisationen auftreten können. So soll das SIRS vermehrt an den Orten der Verletzung zu finden sein, während das CARS eher in den primär nicht betroffenen Arealen ausgeprägt ist (23;30;112;138;160). Auch wenn damit eine endgültige Klärung des genauen zeitlichen und örtlichen Auftretens der immunologischen Phänomene noch aussteht, ist die individuelle posttraumatische Immunantwort zweifelsfrei durch zahlreiche humorale und zelluläre Faktoren sowohl des unspezifischen als auch des spezifischen Immunsystems charakterisiert.

1.2.1. Humorale Mediatoren

Das unspezifische Immunsystem stellt die initiale Barriere des Organismus zur Abwehr von Gefahr für das Individuum dar. Die lokale traumatische Gewebezerstörung geht einher mit dem Kontakt von Abwehrzellen mit immunlogisch aktiver Gewebematrix sowie mit dem Auftreten von Ischämie und Reperfusion (103;112). Hierdurch wird die Aktivierung des Komplement-Systems über den klassischen und den alternativen Weg als integraler Bestandteil des unspezifischen Immunsystems ausgelöst (53;74;196). Die dabei freigesetzten Komplementprotein-Spaltprodukte aktivieren ihrerseits zelluläre Bestandteile des Immunsystems (s.u.), indem sie chemotaktisch wirken und die Opsonierung bzw. Phagozytose von Gewebetrümmern und eingedrungenen Mikroorganismen anregen. Findet eine überschießende Komplement-Aktivierung durch ein ausgeprägtes Trauma statt, so kann es zur Depletierung der Komplement-Faktoren und damit zum Zusammenbruch der initialen Abwehrkette des Individuums kommen (36). Weiter haben Untersuchungen an einem Tiermodell eines Komplement-induzierten Lungenschadens gezeigt, daß das aktivierte Komplementprotein C5a wichtig für die lokale Bildung von Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) ist, sowie in Kombination mit Interferon-γ (INF-γ) die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine aus Monozyten/Makrophagen induzieren kann (127;133). Obwohl die Frage nach einer initialen Beteiligung von Aktivierungsmechanismen bakteriellen Ursprungs bislang nicht eindeutig geklärt ist, hat sich zudem gezeigt, daß der Kontakt mit bakteriellen Antigenen eine ausgeprägte Aktivierung des Komplement-Systems induzieren kann (111).

Wichtiger Bestandteil der unspezifischen Abwehr sind auch neutrophile Granulozyten, deren postoperative Dysfunktion, wie *Alexander et al.* bereits in den siebziger Jahren zeigten, einen wichtigen Überlebensparameter darstellt (5). Die Eigenschaft neutrophiler Granulozyten, infektiöse Mikroorganismen abtöten zu können, ist in erster Linie auf ihre Fähigkeit zurückzuführen, reaktive Sauerstoffmetabolite (ROI) zu bilden (149). Bei Hypoxie und

Ischämie, wie sie nach Gewebetrauma auftreten, kommt es initial durch die Expression von Hypoxie-sensitiven Transskriptionsfaktoren, wie NF-kB oder HIF zur Ausschüttung von Mediatoren und Adhäsionsmolekülen (17;18). Die daran anbindenden neutrophilen Granulozyten setzen ihrerseits ebenfalls aktivierende Zytokine, wie Sauerstoffradikale, frei. Kontinuierliche Messungen der Aktivität dieses, als *Respiratory Burst* bezeichneten Phänomens haben gezeigt, daß eine Verminderung der Funktion neutrophiler Granulozyten mit einem erhöhten Risiko einhergeht ein posttraumatisches MOF zu entwickeln (145). Phagozytierende Zellen der Monozyten/Makrophagenreihe, welche sich zu 95% ortsständig in Leber und Milz befinden (*retikuloendotheliales System*, RES), leisten einen wichtigen Beitrag zur Klärung des Blutes von Mikroorganismen und Nekrosepartikeln.

Daß diese Clearence-Leistung nach Trauma, ausgedehnter Operation und Verbrennung sowie im hämorrhagischen Schock deutlich eingeschränkt ist, wurde bereits vor längerer Zeit erkannt (26). Zusammenfassend soll darauf hingewiesen werden, daß die Vielzahl der oben genannten Erkenntnisse aus Untersuchungen gewonnen wurden, die entweder aus der systemischen Zirkulation entnommenes Serum analysierten oder im Tierversuch gewonnen wurden. Dabei ist klar, daß beispielsweise die Herkunft systemischer Mediatoren weitgehend ungeklärt bleibt. Diese Tatsache bedingt nicht zuletzt, daß diese pathophysiologischen Phänomene bislang nur inkomplett verstanden wurden und darüber hinaus die Wirksamkeit therapeutischer Konzepte, die bislang monokausal die Blockade der einzelnen systemischen Mediatoren versuchten, in klinischen Studien nicht nachgewiesen werden konnte. Die Rolle systemischer Mediatoren bleibt damit weitgehend ungeklärt und das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es unter anderem diesen Aspekt weiter aufzuklären.

1.2.2. Zelluläre Mechanismen

Wie eingangs bereits erwähnt, scheint in der initialen posttraumatischen Phase vor allem die Aktivierung des unspezifischen zellulären Immunsystems (PMN-Granulozyten, Monozyten/Makrophagen) als Vermittler und Verstärker der immunologischen Antwort eine zentrale Rolle zu spielen. Für die spezifische Immunantwort ist charakteristisch, daß Antigene beim ersten Kontakt mit dem Organismus die Abwehrreaktion einleiten. Verantwortliche Zellen sind dabei die Antigen-präsentierenden Monozyten (MØ), sowie T- und B-Lymphozyten (28;31). Bei der zellvermittelten Immunabwehr proliferieren die T-Zellen nach Antigenerkennung auf den MØ und differenzieren sich in T-Effektorzellen einerseits und langlebige T-Gedächtniszellen andererseits (16;43). Bei den T-Effektorzellen lassen sich verschiedene Typen unterscheiden. T-Killerzellen sind wichtige Komponenten der zellulären Abwehr; sie können ganz spezifisch diejenigen Zellen lysieren, die das Antigen tragen, welches die Aktivierung ausgelöst hat. T-Helferzellen fördern über die Freisetzung verschiedener Zytokine die Differenzierung von B-Lymphozyten, die MØ-Aktivierung und die Induzierung einer weiteren T-Zellaktivierung (85;108;140). T-Suppressorzellen sind für die zytotoxischen Effekte verantwortlich. Unter physiologischen Bedingungen beträgt das Verhältnis von T-Helfer zu T-Suppressorzellen (CD4/CD8) 2:1.

Bei der humoralen Abwehr entwickelt sich ein Teil der B-Lymphozyten nach Erstkontakt mit dem Antigen zu Antikörper-bildenden Plasmazellen. Diese humoralen Antikörper sind für das stimulierende Antigen spezifisch (156;178). Die Aktivierung der B-Lymphozyten wird von verschiedenen Faktoren gefördert, z.B. von T-Helferzellen und Monokinen. Die Antigen-Antikörperkomplexe werden von gewebsständigen Makrophagen des RES aufgenommen. Ein kleiner Teil der B-Lymphozyten kehrt nach Antigenkontakt zu lymphoidem Gewebe zurück und verbleibt dort als Gedächtniszellen, die ihre Antigenspezifität stets behalten und bei Zweitkontakt rasch zur Bildung aktiver Plasmazellen stimuliert werden können (203). Die

rasche Verfügbarkeit ausreichender Antikörper (Sofortwirkung) ist die Basis für Immunität gegen eine Zweiterkrankung und findet in der Impf-Medizin Anwendung.

Darüber hinaus konnte jedoch nachgewiesen werden, daß die unspezifische Entzündungsreaktion auch die mit einer gewissen Latenz auftretende Modifikation des spezifischen Immunsystems (Th1/Th2-Lymphozyten) vermittelt (85;204). Zentraler Punkt der zellassoziierten Immunantwort scheint die Interaktion des Monozyten/Makrophagen-Systems mit dem T/B-Zell-System. Die Antigen-präsentierenden Zellen (v.a. Makrophagen) verarbeiten das phagozytierte Fremdantigen und bieten es den ruhenden T-Lymphozyten an. Zusammen mit der Expression des *Major Histocompatibility Complex* (MHC) der Klasse II sowie der Produktion und Ausschüttung von Zytokinen durch die Antigen-präsentierende Zelle sind damit die Voraussetzungen für eine Aktivierung der T-Lymphozyten geschaffen. Die nunmehr aktivierten T-Lymphozyten synthetisieren ihrerseits spezielle Zytokine, die auch als Lymphokine bezeichnet werden. Hierdurch wird sowohl eine weitere Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten-Population als auch eine erneute Stimulation der Antigen-präsentierenden Zellen induziert.

Aufgrund der Tatsache, daß für diesen Aktivierungsmechanismus die Präsentation spezifischer Antigene Voraussetzung ist, wurde die Beteiligung von Bakterien an der Ausbildung des SIRS lange Zeit kontrovers diskutiert. Klar scheint mittlerweile, daß bei polytraumatisierten Patienten das gastrointestinale Versorgungsgebiet häufig von passagerer Ischämie (ausgelöst durch direktes Trauma z.B. bei Zerreißung mesenterialer Arterien) oder indirekt als Folge der Zentralisation im hämorrhagischen Schock betroffen ist (37). Dadurch kommt es nach Reperfusion zu den oben erwähnten lokalen IRS-Phänomenen mit Einschwemmung von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren und Translokation pathogener Keime aus dem Pool der Darmbakterien (81;106;107;151). Andererseits findet

sich das posttraumatische SIRS auch bei Patienten ohne gastrointestinale Perfusionsstörung, das dann am wahrscheinlichsten durch IRS-Phänomene der Peripherie ausgelöst wurde.

In diesem Zusammenhang konnten die prinzipiellen Mechanismen der maßgeblich an der Schadensausprägung beteiligten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (LEI) hauptsächlich unter der Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie näher aufgeklärt und insbesondere die Reperfusionsphase des ischämischen Gewebes als kritisch für die LEI erkannt werden (102;115). Obwohl die Reperfusion essentiell für das ischämische Gewebe ist, verstärkt sich der parenchymatöse Schaden nach der Reperfusion erheblich durch die dabei eingespülten aktivierten Leukozyten, allen voran durch die PMN-Granulozyten und Monozyten/Makrophagen, die im sog. *reflow-paradoxon* mit dem Endothel des geschädigten Gewebes interagieren (118). Voraussetzung hierfür ist die Expression von Selektinen auf ischämischen Endothelzellen (P-Selektin, E-Selektin) ebenso wie auf Leukozyten (L-Selektin). Als weitere Interaktionspartner wurden Immunglobulin-ähnliche Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, PECAM-1, VCAM-1 etc.) und Integrine identifiziert, die das Rollen bzw. die Adhärenz der Leukozyten und deren Migration durch das geschädigte Endothel mediieren und somit die Phagozytose von geschädigtem Gewebe durch die primären Abwehrzellen ermöglichen (92).

Wie oben ausgeführt ist die Verbindung zum spezifischen Immunsystem in diesem Zusammenhang bislang nur unzureichend charakterisiert. Möglicherweise könnten jedoch neueste Erkenntnisse über alternative Aktivierungswege des T-Zell-Systems in Zukunft weitere Auskunft zur Frage der Interaktion zwischen unspezifischer und spezifischer Immunreaktion geben. So läßt sich beispielsweise eine Aktivierung von *Natural Killer Cells* (NK-Zellen) durch Faktoren des aktivierten Komplement-Systems oder durch den u.a. auch von Monozyten exprimierten Faktor *Linker of activated T-cells* (LAT) ohne Präsentation eines spezifischen Antigens auslösen (79).

Zudem unzureichend charakterisiert sind auch die verantwortlichen intrazellulären Initialmechanismen, welche die Steuerung der posttraumatischen Abwehrfunktion von Monozyten/Makrophagen und Granulozyten induzieren. In diesem Zusammenhang weisen neuere Veröffentlichungen darauf hin, daß die Bildung von immunmodulatorisch wirksamen Effektor-Proteinen (Zytokine/Chemokine, Zell-Oberflächenmoleküle, Proteasen, Inhibitoren etc.) über spezielle intrazelluläre Signal-Transduktions-Kaskaden gesteuert wird (174).

1.3. Proinflammatorische Zytokine

Zytokine sind zentrale Regulatoren der körpereigenen Immunabwehr, deren Freisetzung durch verschiedene Faktoren, wie Infektionen, Trauma und Entzündungen initiiert werden kann. Mit einem Molekulargewicht von 8–50.000 Dalton stellen sie dabei verhältnismäßig kleine Proteine dar. In der erstmaligen Beschreibung wurden diese Mediatoren als „Lymphokine“ oder auch als „Monokine“ beschrieben, was auf ihrem zellulären Ursprung basierte. Die Tatsache, daß die Zytokine jedoch von fast jeder zellkernhaltigen Zelle produziert werden können, führte zu dem aktuell benutzten Namen (40).

Eine gebräuchliche Einteilung dieser Mediatoren in pro- und antiinflammatorische Zytokine erfolgt anhand ihrer Rolle im Rahmen von Entzündungsreaktionen. Eine starre Einteilung hat sich hierbei allerdings nicht als sinnvoll erwiesen, da einige Zytokine sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungsmechanismen aufweisen.

Miyaoka et al. konnten nachweisen, daß die Entwicklung eines SIRS am ersten postoperativen Tag nach einem elektiven Eingriff mit signifikant erhöhten Il-6-Plasmakonzentrationen assoziiert war (120). Am 3. postoperativen Tag konnten die SIRS-Kriterien bei keinem der Patienten mehr nachgewiesen werden. Parallel hierzu zeigte sich zu diesem Zeitpunkt auch eine signifikante Reduktion der Il-6-Plasmakonzentrationen. Die

Autoren schlossen hieraus, daß Il-6 einen adäquaten Parameter zur Bestimmung des Schweregrads der postoperativen Entzündungsreaktion darstellt.

In anderen klinischen Studien konnte zusätzlich gezeigt werden, daß die postoperativen Il-6-Plasmaspiegel mit der Entwicklung von Komplikationen (Sepsis, MODS) korreliert waren (121;152). So konnte nach einem signifikanten Operationstrauma bei einer postoperativen Il-6-Plasmakonzentration von mehr als 310pg/µl mit einer Sensitivität von 90% die Entwicklung einer Sepsis vorhergesagt werden (121). Auch für das Il-8 konnte ebenso ein signifikanter Anstieg der systemischen Spiegel nach abdominellen Operationen gezeigt werden. Dieser signifikante Anstieg war mit der Entwicklung eines posttraumatischen MODS assoziiert (142).

Der perioperative Anstieg der systemischen Il-6-Plasmakonzentrationen scheint erheblich vom Ausmaß (33), der Lokalisation und der Dauer des chirurgischen Eingriffes abhängig zu sein (170). Insbesondere der Lokalisation und dem damit assoziierten Ausmaß des Gewebetraumas scheint dabei eine signifikante Bedeutung zuzukommen. So konnte gezeigt werden, daß abdominelle Eingriffe mit höheren perioperativen Il-6-Plasmakonzentrationen assoziiert sind, als die Implantation einer Hüftprothese (118). Des Weiteren waren laparoskopische Operationen am Abdomen im Vergleich zu offenen Verfahren mit einer verminderten Freisetzung von Il-6 assoziiert. Übereinstimmend hiermit sind die perioperativen Il-6-Plasmaspiegel bei der Implantation einer Hüftprothese im Vergleich zu Osteosynthesen am Sprunggelenk signifikant erhöht (135).

Interessanterweise konnte in der gleichen Studie nachgewiesen werden, daß bereits in der unmittelbaren Phase nach der Einbringung der Implantate ein systemischer Anstieg der Il-6-Plasmakonzentrationen zu beobachten war. Patienten mit einer hohen perioperativen Il-6-Synthese wiesen dabei auch einen prolongierten intensivmedizinischen Verlauf auf (135).

Im Gegensatz zum Il-6 konnten in der überwiegenden Mehrzahl der Studien weder für systemische noch für lokale TNF-α- und Il-1β-Konzentrationen signifikante Assoziationen mit dem Operationstrauma und dem klinischen Verlauf hergestellt werden (56;72;94). Diese Ergebnisse stehen zwar im Gegensatz zu der zuvor beschrieben zentralen Rolle der beiden Mediatoren in der Pathophysiologie der postoperativen Entzündungsreaktion, sind aber im Wesentlichen durch die kurzen Halbwertszeiten des TNF-α (12–16min) und des Il-1β (6min) zu erklären. Durch die kurzen Halbwertszeiten wird der perioperative Nachweis dieser primären Zytokine deutlich unwahrscheinlicher als beim Il-6, das 4–48h nach operativen Eingriffen die höchsten systemischen Konzentrationen erreicht (11;21;38).

Diese Überlegungen werden durch die Ergebnisse einer Studie unterstützt, die mit sehr engmaschigen perioperativen Probeentnahmen einen sehr frühen und kurzen Il-1β-Anstieg nach einem chirurgischen Eingriff nachweisen konnte (11).

1.3.1. Tumornekrosefaktor-α (TNF-α)

Beim TNF handelt es sich um einen der früh auftretenden, proinflammatorischen Mediatoren in der Kaskade der Zytokine. Es wurde erstmals 1975 als ein durch Endotoxininjektion entstandener, muriner Serumfaktor, der die Nekrose von Tumorzellen induzieren kann, beschrieben und isoliert. TNF-α, das v.a. von Makrophagen, Monozyten (MØ) und T-Lymphozyten gebildet wird, ist hauptsächlich an inflammatorischen Reaktionen beteiligt (29). Sowohl gram-negative als auch gram-positive Bakterien, Pilze, Mykoplasmen, Tumorzellen, Zytokine wie TNF-α selbst, IFN-γ, Il-1, Il-2 und verschiedene CSFs, Mitogen, Proteinkinase C (PKC)-Aktivatoren können die TNF-α-Synthese induzieren (68). Daneben gehören Fieber und Schock zu physiologischen Stimuli. Lipopolysaccharid (LPS) eine Komponente von gramnegativen Bakterien, gebunden an LPS Binding Protein (LPB) aktiviert Monozyten

(MØ) zur TNF-α-Synthese durch Interaktion mit CD14, einem monozytären Oberflächenmolekül (201). Nach LPS-Stimulation kommt es bereits nach 2-4 Stunden zu einer maximalen mRNA-Expression; das Protein wird nach 4-6 Stunden freigesetzt (139). TNF-α besitzt ein extrem breites Spektrum biologischer Aktivitäten und ist einer der Hauptmediatoren bei toxischem Schock und gram-negativer Sepsis **(siehe Abbildung 2)**. So stimuliert TNF-α die Proliferation aktivierter T- und B- Lymphozyten und aktiviert die Expression von MHC-Klasse I und II-Antigen und die Expression von Adhäsionsmolekülen und Endothelzellen (40). Am Endothel hemmt es die antikoagulatorischen Mechanismen, begünstigt damit thrombotische Ereignisse und führt außerdem zu einer Prostaglandin E2 (PGE2)-Freisetzung (3). Neben spezifisch bindenden Proteinen sind lösliche TNF-Rezeptoren dafür verantwortlich, daß TNF-α im Plasma nur eine kurze Halbwertszeit von 14–18min aufweist.

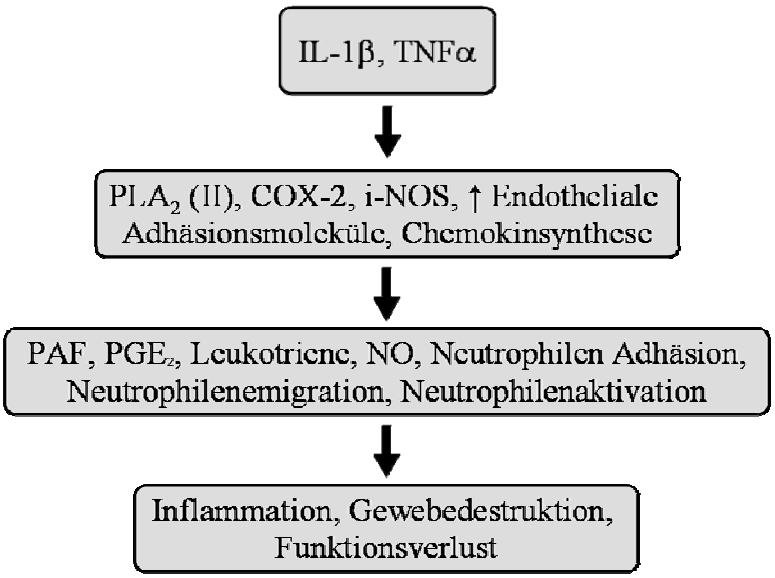

Abbildung 2, Triggerung der Inflammationskaskade durch TNF-α und Il-1β (Abbildung entliehen aus *Dinarello et al.* Chest 2000 (40)

1.3.2. Interleukin-1β (Il-1β)

Interleukin 1 (Synonyme: *Catabolin, B-Cell Differentiation Factor, Endogenous Pyrogen*) wird neben TNF-α als Prototyp des proinflammatorischen Zytokins beschrieben (40). Es gibt zwei funktionell gleichwertige Hauptformen des Il-1, nämlich Il-1α (17kDA, 159 Aminosäuren) und Il-1β (17kDA, 153 Aminosäuren), die durch zwei verschiedene Gene kodiert werden (8;104). Beide Formen binden an den gleichen membranständigen Rezeptor (Il-1R) auf den Zielzellen und zeigen daher nahezu identische biologische Wirkungen (93;182).

Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, daß letztendlich nur Il-1β biologische Relevanz hat, da Il-1α nur in zu vernachlässigenden Mengen synthetisiert wird (15). Die Freisetzung aus Monozyten (MØ), Makrophagen und Endothelzellen wird durch Ischämie, Hämorrhagie und mikrobielle Substanzen, sowie durch inflammatorische Mediatoren, wie C5a und TNF induziert (39). Der Effekt von Il-1β nach Anbindung an den spezifischen Membranrezeptor wird über *second messenger* (cAMP, IP_3, DAG, CA^{++} und PKV-Aktivatoren) vermittelt (39;101). Die Transkription beider Il-1-Gene durch Monozyten (MØ) beginnt ca. 15min nach Stimulation mit Endotoxin oder anderen Triggersubstanzen; die mRNA-Akkumulation erreicht ihr Maximum nach 4-6h (15). Ähnlich wie TNF-α weist Il-1β eine sehr kurze Halbwertszeit von etwa 6min auf (101).

Die Hauptwirkung von Il-1β ist die Stimulation von T-Helferzellen zur Produktion von Il-2 und Expression von Il-2-Rezeptoren **(siehe Tabelle 1)**. Ferner wurde gezeigt, daß Il-1β die Freisetzung von G-CSF und M-CSF aus humanen Knochenmarkszellen fördert, sowie die Synthese von GM-CSF aus PBMC (50). Es stimuliert die Hämatopoese durch das Hochregulieren von Rezeptoren für *Colony Stimulating Factors* und Stimulation der Proliferation pluripotenter Vorläuferzellen im Knochenmark. Bedingungen beschrieben, z.B.

bei Infektionen, Tumoren, koronarer Herzerkrankung, Schädel-Hirn-Trauma oder bei gesunden Individuen nach anstrengender körperlicher Betätigung (159).

- Aktivierung von T-Zellen in Anwesenheit von Ko-Stimuli über den T-Zell-Rezeptor
- Stimulierung des Arachidonsäure-Metabolismus und Verstärkung der Synthese von Kollagenase
- Ko-Stimulation der Thymozytenproliferation
- Stimulation der prä-B-Zell-Differenzierung, Ko-Stimulation der B-Zellproliferation
- Erhöhung der Il-2- und IFN-γ-induzierten Aktivation der NK-vermittelten Zytotoxizität
- Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen durch Endothelzellen
- Aktivation von Osteoblasten und Endothelzellen
- Verstärkung der Kollagensynthese und Modulation von Reperaturmechanismen
- Induktion der Insulinsekretion und B-Inselzell-Zytotoxizität
- Induktion der Synthese von Akut-Phase-Proteinen durch Hepatozyten
- Zentralnervöse Induktion von Fieber

Tabelle 1: Biologische und immunologische Funktionen von Il-1β (40)

Experimentelle Studien konnten belegen, daß Il-1β im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion ähnliche Wirkungen wie das TNF-α aufweist (7). In diesem Zusammenhang werden Synergismen von TNF-α und Il-1β bei der Induktion von Fieber und Hypotension, der Adhäsion von Granulozyten an Endothelzellen, der Synthese von sekundären Zytokinen und der Chemotaxie von Makrophagen beschrieben.

1.3.3. Interleukin-6 (Il-6)

Interleukin-6 (Il-6) wurde erstmals in den 70er Jahren isoliert und zunächst u.a. als Interferon b2, *Hepatocyte stimulatory factor* (HSF), *B-Cell Differentiation factor* (BSF-2) und *Hybridoma growth factor* bezeichnet. Il-6 ist ein 21,5-28 kDA großes Zytokin, setzt sich aus 4 geraden α-Helizes zusammen und wird v.a. von T- und B-Lymphozyten, Monozyten (MØ) sowie von Endothelzellen gebildet (169;192). Die Induktion der Il-6-Synthese erfolgt durch LPS, Il-1β und TNF-α. In experimentellen Studien sowie im Rahmen von Versuchen an

gesunden Probanden konnte gezeigt werden, daß Il-6 nach der Applikation von Endotoxin später als TNF-α oder Il-1β freigesetzt wird und daß die Il-6 Synthese durch TNF-α oder Il-1β induziert werden kann (71).

Hauptproduktionsquellen sind aktivierte Makrophagen, Monozyten (MØ), T- und B-Zellen. T-Zellen können Il-6 nur in Gegenwart von Monozyten (MØ) synthetisieren, während Monozyten (MØ) selbst ohne Stimulus Il-6 produzieren können. Die monozytäre Il-6-mRNA erreicht 5h nach Stimulation ihr Maximum, während sie in T-Zellkulturen erst nach 48h ihren Höhepunkt erreicht (21;101). Il-6, das sowohl mit dem Il-6-Rezeptor (Il-6R)-α als auch mit Plasma-Membran-Rezeptoren interagiert, induziert die Proliferation von B-Lymphozyten und die damit assoziierte Erhöhung der Synthese von Immunglobulinen **(siehe Abbildung 3)**. Des Weiteren führt Il-6 zu einer verstärkten T-Lymphozytenproliferation, einer vermehrten Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen und einer erhöhten Aktivität der NK-Zellen (71). Ebenso wurde beschrieben, daß Il-6 die Apoptose von neutrophilen Granulozyten verzögert und somit deren potentiell schädigenden Effekte auf das Gewebe verlängern kann (62). Il-6 induziert in der Leber die Synthese verschiedener anderer Mediatoren, wie Fibrinogen, α_1-Antitrypsin, C-reaktives Protein (CRP) und Komplementfaktoren (121). In tierexperimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, daß Il-6 einen der wesentlichsten Mediatoren im Rahmen der pathophysiologischen Vorgänge bei Trauma und Sepsis darstellt und hohe Plasmaspiegel mit einem schlechten Outcome assoziiert sind (20). Neben diesen proinflammatorischen Eigenschaften wird jedoch auch ein antiinflammatorischer Wirkungsmechanismus des Il-6 angenommen. So konnte gezeigt werden, daß Il-6 die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen TNF-α und Il-1 reduziert sowie die Freisetzung von antiinflammatorischen Mediatoren, wie z.B. Glukokortikoiden, Il-1ra und löslichen TNF-Rezeptoren, erhöht (99). Aufgrund seines im Vergleich zu TNF-α und Il-1β

späteren Anstiegs und einer deutlich längeren Halbwertszeit erscheint Il-6 als Parameter sehr gut geeignet, um das Ausmaß und den Zeitpunkt sekundärer Operationen nach einem Polytrauma zu bestimmen (136).

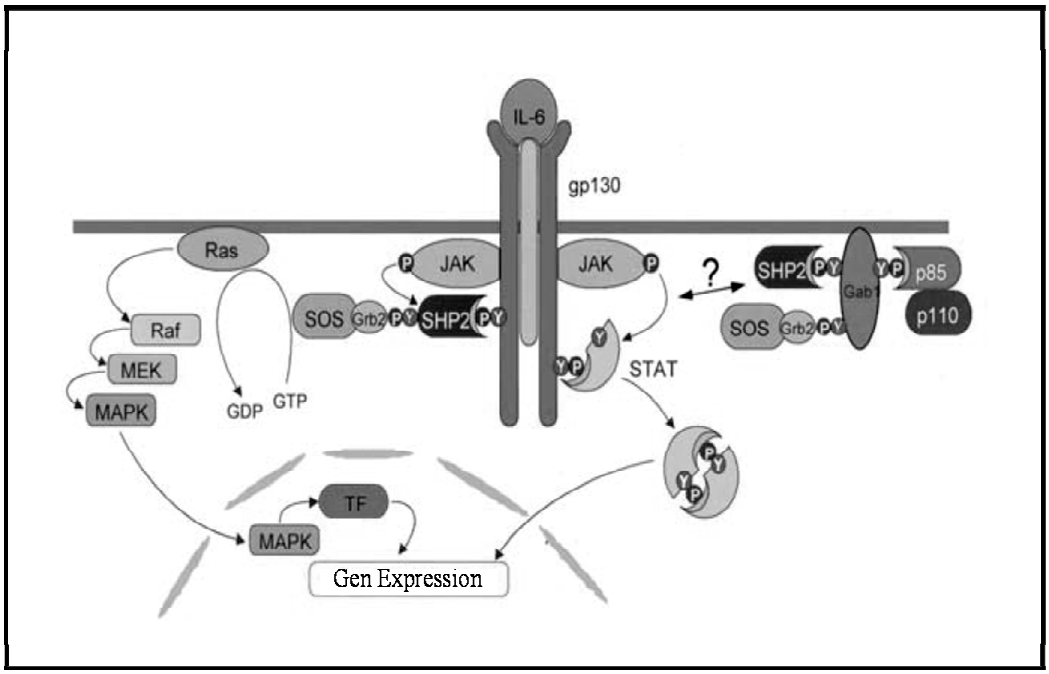

Abbildung 3, Interleukin 6 aktiviert den JAK/STAT Weg: Graphische Darstellung der durch Il-6 aktivierten Signalwege (20;71). (Abbildung übernommen aus *Biffl W*L et al. Ann Surg 1996)

1.3.4. Interleukin-8 (Il-8)

Ursprünglich wurde Il-8 als *Neutrophil Activating Factor* (NAF) beschrieben (191). Il-8 gehört zur Familie der Chemokine, seine Größe beträgt ca. 8kDA (10;185).

Produktionsquelle sind neben Endotoxin-exponierten Monozyten (MØ) Mitogen-stimulierte T-Lymphozyten (54). Die spezifische mRNA kann bereits nach 1 Stunde nachgewiesen werden und erreicht ihr Maximum nach etwas 6h, wobei aber nach mehr als 24h immer noch hohe mRNA Mengen nachgewiesen werden können (177).

Die Synthese des Il-8 wird von Il-1, TNF-α, LPS und durch Hypoxie induziert. Il-8 kann mit ähnlicher Affinität an zwei Rezeptoren (CXCR1 und CXCR2) binden. Im Rahmen einer

systemischen inflammatorischen Reaktion wird die Expression des CXCR2 reduziert, wodurch CXCR1 den wesentlichen Rezeptor zur Interaktion mit dem Il-8 darstellt (58;126). Spezifische Inhibitoren von Il-8 konnten bisher nicht nachgewiesen werden.

In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, daß Il-8 das Lösen (*Shedding*) des L-Selektins von der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten induziert und zusammen mit TNF-α, Il-1 und Il-6 die Expression von Adhäsionsmolekülen (β_2-integrins: CD11b/CD18 und CD11c/CD18) auf den Endothelzellen reguliert (116;126). Hierdurch kann eine Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an endothelialen Monolayern induziert werden (181). Des Weiteren stimuliert das Il-8 die anschließende Migration der neutrophilen Granulozyten durch das Endothel und die Freisetzung von Gewebe-schädigenden Substanzen (Proteasen, Superoxide etc.). In Folge kommt es zu einer fulminanten Stoffwechselsteigerung in den Neutrophilen (*Respiratory Burst*) mit Bildung von Peroxid-Radikalen und zu einer Exozytose spezifischer Granula aus den Zellen (114). Die *in-vitro*-Effekte von Il-8 auf Neutrophile sind: Stimulation der Chemotaxis und der Adhärenz, Induktion der Degranulation, Stimulation zur Phagozytose opsonierter Partikel und die Verstärkung einer indirekten antimykotischen Aktivität (203). Die Aktivierung zum *Respiratory Burst* in Neutrophilen wird zwar durch Il-8 ausgelöst, die Menge der freigesetzten Sauerstoffmetabolite ist dabei aber relativ gering (19). Il-8 führt über die Aktivierung der 5-Lipo-Oxygenase in Neutrophilen zur Generierung von neutrophil-chemotaktischen LTB4 führt und dadurch die Gewebsinfiltration mit Neutrophilen verstärkt (164). Übereinstimmend konnte in einem Tiermodell die Infiltration der Granulozyten und der anschließende Gewebeschaden durch eine Aktivitätsminderung des Il-8 reduziert werden (114). Neben diesen Wirkungen auf die neutrophilen Granulozyten scheint das Il-8 ebenso eine potenzielle Rolle bei der Interaktion von Makrophagen und Endothelzellen zu spielen, da auch hier durch Il-8 eine gesteigerte Adhäsion erreicht werden

konnte (126). Il-8 nimmt somit auch eine signifikante Rolle bei der Eradikation von invasiven Erregern ein (116).

Neben diesen für den Körper essentiellen Eigenschaften des Il-8 wurden auch potentiell schädigende Effekte nachgewiesen. In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, daß das Il-8 sowohl im Rahmen eines ARDS als auch eines Ischämie-Reperfusion-Syndroms nicht nur die Infiltration in das Gewebe durch neutrophile Granulozyten induziert, sondern auch durch eine Hemmung der Apoptose dieser Zellen den Gewebe-schädigenden Effekt verlängert (95). Die operative Behandlungsstrategie beim polytraumatisierten Patienten scheint dabei auch die systemischen Il-8 Konzentrationen zu beeinflussen, was eine diagnostische und prognostische Bedeutung dieses Markers wahrscheinlich macht (136).

1.4. Methodische Aspekte

Obwohl proinflammatorischen Zytokinen in der Immunreaktion nach Polytrauma eine große Bedeutung zukommt, war bislang die Aufklärung der verantwortlichen Mechanismen von erheblichen methodischen Problemen behaftet. So ließ sich bislang nicht zweifelsfrei feststellen aus welchen zellulären Kompartimenten die Mediatoren stammen.

Die bisherigen Erkenntnisse über posttraumatische Immundysfunktion wurden bislang anhand von Messungen der Zytokine aus Überständen von stimulierten Zellkulturen isolierter mononukleärer Leukozyten (PBMCs) gewonnen. Die Stimulation erfolgte dabei entweder mit polyklonalen Mitogenen oder mutmaßlichen Antigenen (30;44;55).

Diese Methode wurde in der Literatur jedoch auf Grund ihrer niedrigen Sensitivität kontrovers diskutiert, die wesentlichen Einschränkungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

i) Die Interpretation der Ergebnisse der Vielzahl der Untersuchungen an systemischen Mediatoren wird deutlich eingeschränkt durch die Tatsache, daß die Herkunft der Mediatoren in diesen Untersuchungen weitgehend unberücksichtigt bleibt. Es bleibt damit völlig unklar, ob der Anstieg der Mediatoren als Auslöser oder Epi-Phänomen eines posttraumatischen MOF in Frage kommt oder ob dieser Konzentrationsanstieg lediglich Ausdruck des Untergangs zahlreicher, durch das mechanische Trauma aktivierter Endothelzellen darstellt.

ii) Die Untersuchungen zur Anergie der immunkompetenten Zellen haben hinsichtlich potentieller Mechanismen bislang viele Fragen offen gelassen. So ist nicht geklärt, ob die Zellen Mediatoren nicht synthetisieren oder diese nur einfach nicht freisetzen können.

Anhand der aufgeführten methodologischen Betrachtungen wird klar, daß die bislang üblichen Techniken zur Bestimmung systemischer Mediatoren zu unscharf sind, um differenziert zelluläre Interaktionen auf Trauma weiter zu verstehen.

Eine weitere Aufklärung pathophysiologischer Mechanismen sollte sich durch eine hochselektive intrazelluläre Messung der unterschiedlichen Mediatoren ermöglichen lassen. Bislang stand jedoch die Technologie der *single cell detection* für diese Fragestellung nicht zur Verfügung. Kürzlich wurde durch die Arbeitsgruppe um *Herrn Prof. Dr. E. Faist* und *Dr. S. Zedler* aus der *Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München* erstmals eine Technik mittels Durchflußzytometrie entwickelt, die die hoch selektive Messung von intrazellulären Zytokine erlaubt (160;204). Damit steht nun erstmals eine Methode zur Verfügung, die offenen Fragen näher aufzuklären.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit sollen im Folgenden näher skizziert werden.

2. Fragestellung

Wie in der vorangegangenen Einleitung ausführlich dargestellt, gibt es innerhalb der derzeit gängigen Hypothesen zur Entstehung des posttraumatischen MOF den Konsens, daß einer Funktionsdysbalance immunkompetenter Zellen pathophysiologisch substantielle Bedeutung zukommt. Umfangreiche Untersuchungen der jüngsten Vergangenheit konnten dabei die Rolle der Monozyten als eine der zentralen Schaltstellen identifizieren.

In diesem Kontext sind intrazelluläre initiale Steuerungsmechanismen verstärkt in den Blickpunkt des Interesses gerückt, da Veränderungen dieser Schlüsselreaktionen erheblich vor dem klinisch manifesten MOF auftreten und damit die potentielle Möglichkeit beinhalten, sowohl die initialen pathophysiologischen Mechanismen besser zu verstehen als auch das klinische Management der Patienten (Zeitpunkt der Operationen, Beatmungseinstellungen, Lagerungstherapie etc.) besser anpassen zu können. Dennoch sind gerade diese Initialmechanismen in humanen Immunzellen polytraumatisierter Patienten bislang nur unzureichend charakterisiert (1;204).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es daher folgende Einzelziele näher aufzuklären:

i) Läßt sich die intrazelluläre Zytokinsynthese-Kapazität in Monozyten von polytraumatisierten Patienten *ex vivo* bereits in der direkten posttraumatischen Phase (innerhalb von 72h nach Trauma) mittels Durchflußzytometrie quantifizieren?

ii) Gibt es einen Zusammenhang zwischen der intrazellulären Zytokinsynthese-Kapazität und der Änderung der systemischen Zytokinkonzentration im Blut polytraumatisierter Patienten?

iii) Lassen die dabei gewonnenen Ergebnisse im Vergleich zu klinischen Parametern, wie Verletzungsschwere, etc. Schlußfolgerungen hinsichtlich potentieller prognostischer Entscheidungen ziehen?

3. Material und Methoden

Um diese Fragestellungen beantworten zu können wurde folgendes Studienprotokoll etabliert.

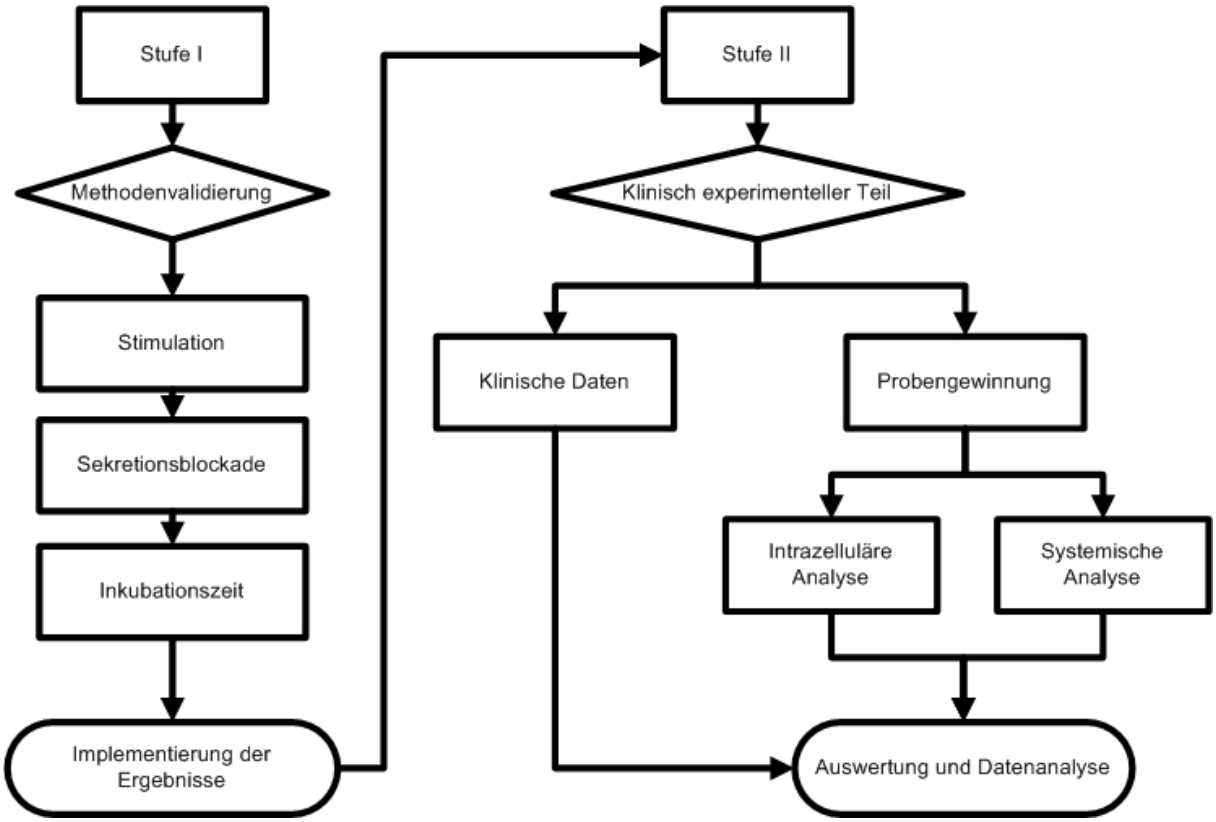

Abbildung 4, Synopsis der Studie: Bestandteil der Stufe I war die Validierung der Methodik zur Analyse intrazellulärer Zytokine in Monozyten. Nach Abschluss der Stufe I wurde das etablierte Protokoll in Stufe II im Rahmen des klinischen Teils angewendet. Dabei soll die Zytokinsynthese-Kapazität mittels Durchflußzytometrie (FACS), sowie die in Zirkulation befindliche extrazelluläre Proteinkonzentration mittels ELISA untersucht werde.

Zunächst war es das Ziel der Vorversuche (**Stufe I)** unserer Studie, verschiedene Kultur-Bedingungen für MØ in quantitativer und qualitativer Relation zur Zytokinsynthese-Kapazität zu testen und aus den Erkenntnissen ein valides Protokoll für die eigentlichen Untersuchungen von MØ polytraumatisierter Patienten zu erstellen **(siehe Abbildung 4)**. Die Eckparameter und Variablen wurden dabei in Anlehnung an die publizierten Protokolle für

die intrazelluläre Detektion von Zytokinen in Lymphozyten von *Dr. S. Zedler* aus der Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartner *Prof. E. Faist* gewählt (204).

Nach Abschluß der **Stufe I** wurden die erarbeiteten Ergebnisse in das experimentelle Versuchsprotokoll implementiert und die Untersuchung polytraumatisierter Patienten in **Stufe II** aufgenommen.

3.1. Stufe I – Validierung des experimentellen Protokolls

3.1.1. Probanden

Zur Untersuchung der Zytokinsynthese-Kapazität peripherer MØ wurden 5ml, mit 2500 IE Na-Heparin (Liquemin®, Roche Pharma, Basel, Schweiz) antikoaguliertes Vollblut eines Kontrollkollektivs gesunder Probanden durch Punktion der Kubitalvene gewonnen und unmittelbar im Anschluß weiterverarbeitet. Keiner der Probanden wies klinische oder anamnestische Zeichen einer akuten oder chronischen Infektion auf.

3.1.2. Stimuli

Um die Stärke der Stimulation der intrazellulären Zytokinsynthese und die zelltoxische Wirkung verschiedener Stimuli zu untersuchen, verglichen wir die, in **Tabelle 2** aufgeführten Substanzen. Die Dosierungen wurden dabei, basierend auf Studien, die bereits valide Ergebnisse für die Quantifizierung der Zytokinsynthese-Antwort erbracht haben, gewählt (82;160;188). Im ersten Schritt wurden die entnommenen 5ml Blut 1:10 verdünnt mit RPMI 1640 Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), versetzt mit 25mmol/mM HEPES Puffer (Vitromex, Vilshofen, Deutschland), L-Glutamine, 10% fetalem Kälber-Serum (FCS, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 0,1mg/mL Gentamycin (Merck, Darmstadt,

Deutschland). Je 1ml der Stammlösung wurde auf insgesamt 3x7 15ml-Falcons verteilt, die mit 2,0µmol/l Monensin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) versetzt waren. Gemäß **Tabelle 2** wurden eine Gruppe gemäß Spalte 1 mit LPS, eine mit LPS + IFN-γ und eine Gruppe mit *Staphylococcus aureus cowan I* (SAC) versetzt. Die Proben wurden im Brutschrank bei 37^0C, 5% CO^2 unter sterilen Bedingungen in antiadhäsiven 15ml-Zellkultur Tubes (Beckton Dickinson, San Jose, USA) über 4h in einem Zellrotor inkubiert.

Anschließend erfolgten Zellaufarbeitung und Immuno-Staining wie unter *3.3.5*, sowie die durchflußzytometrische Analyse wie unter *3.3.6* aufgeführt.

Stimulus	Lipopolysaccharid (LPS) E. coli, Serotyp 055:B5	Lipopolysaccharid (LPS) E. coli, Serotyp 055:B5 + Interferon-γ (IFN-γ)	Staphylococcus aureus cowan I (SAC)
Konzentration	100ng/ml	100ng/ml + 100U/ml	75mg/ml

Tabelle 2: Tabellarische Aufstellung der zu vergleichenden Stimuli: Substanzen und eingesetzte Konzentrationen wurden jeweils in der Literatur in ähnlichen Versuchsaufbauten beschrieben.

3.1.3. Sekretionsblockade

Wie bereits beschrieben ist essentieller Bestandteil der Analyse der Zytokinsynthese-Kapazität zu verhindern, daß die neu synthetisierten Zytokine unmittelbar aus der Zelle sezerniert werden (80;143). Die hierfür gebräuchlichen Reagenzien sind zum einen *Monensin* und zum anderen *Brefeldin A*. Dabei ist Monensin monovalenter Ionen-selektiver Ionophor, der den trans-Golgi Transport von Proteinen verhindert, indem er den Na^{++}/H^+ Transporter auf der Golgimembran blockiert (122). Brefeldin A leitet intrazellulär synthetisiertes Protein von der cis-Seite des Golgi-Komplexes zum endoplasmatischen Reticulum zurück, blockiert

so einen weiteren Transport der Proteine zur trans-Seite und verhindert damit die Sekretion (87;134). Bezüglich der Pharmakokinetik und Effizienz dieser beiden Sekretionsblocker liegen erheblich kontroverse Daten in der Literatur vor, so daß ein erstes Teilziel der quantitative Vergleich von Monensin und Brefeldin hinsichtlich der Effektivität war.

In jedem der Experimente wurden 5ml Blut 1:10 mit RPMI 1640 Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt. Das Medium war versetzt mit 25mmol/mM HEPES Puffer (Vitromex, Vilshofen, Deutschland), L-Glutamine, 10% fetalem Kälber-Serum (FCS, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 0,1mg/mL Gentamycin (Merck, Darmstadt, Deutschland). Zur Stimulation wurde je 1ml dieser Stammlösung mit 100ng/ml Lipopolysaccharid (LPS, aus Escherichia coli, Serotyp 055:B5, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) versetzt und in zwei parallelen Serien zu je 7 Falcons, gemäß der Aufstellung in **Tabelle 3** entweder mit 2,0µmol/l Monensin oder 1,4µmol/l Brefeldin A versetzt. Monensin, bzw. Brefeldin A wurden dabei in nicht-zytotoxischen, von *Collins* und *de Clerk* bereits beschriebenen Konzentrationen eingesetzt (32;166).

Die Proben wurden im Brutschrank bei 37^0C und 5% CO^2 unter sterilen Bedingungen in antiadhäsiven 15ml-Zellkultur Tubes (Beckton Dickinson, San Jose, USA) über 4h in einem Zellrotor inkubiert.

Zellaufarbeitung und Immuno-Staining erfolgten wie unter *3.3.5* aufgeführt, sowie die durchflußzytometrische Analyse wie unter *3.3.6* beschrieben.

Sekretionsblocker	Brefeldin A	Monensin
Konzentration	1,4µmol/l	2,0µmol/l

Tabelle 3: Tabellarische Aufstellung der zu vergleichenden Sekretionsblocker: Die Substanzen und eingesetzten Konzentrationen wurden jeweils in der Literatur beschrieben (8;32).

3.1.4. Inkubationszeit

Bekannt ist, daß MØ auf externe Stimuli mit distinkter Verzögerung beginnen inflammatorische Zytokine zu synthetisieren. So liegen bezüglich des Ansprechens der MØ auf unterschiedliche Dauer der Stimulation teils kontroverse Daten vor (27;64;180). Um für die, von uns geplante Studie die optimale Stimulationszeit zu finden, wurden in einer weiteren Serie 5ml-Vollblutproben der Kontrollprobanden zunächst 1:10 verdünnt mit RPMI 1640 Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), versetzt mit 25mmol/mM HEPES Puffer (Vitromex, Vilshofen, Deutschland), L-Glutamine, 10% FCS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 0,1mg/mL Gentamycin (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Zur Stimulation wurde je 1ml dieser Stammlösung mit 100ng/ml Lipopolysaccharid (LPS aus Escherichia coli, Serotyp 055:B5, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) sowie 2,0µmol/l konzentrierten Monensin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) versetzt.

4 Serien zu je 7 Proben wurden anschließend im Brutschrank bei 37^0C, 5% CO^2 unter sterilen Bedingungen in antiadhäsiven 15ml-Zellkultur Tubes (Beckton Dickinson, San Jose, USA) sequentiell über 2h, 4h, 6h und 12h in einem Zellrotor inkubiert.

Nach Ablauf der jeweiligen Stimulationszeit wurde die entsprechende Serie sofort aufgearbeitet (siehe *3.3.5)*, sowie analysiert wie unter *3.3.6* ausführlich beschrieben.

3.2. Stufe II - Klinisch-experimenteller Abschnitt

3.2.1. Patienten und Kontrollkollektiv

Nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission (AZ: 012/00) wurde diese Studie von 02/2001 bis 06/2004 an der *Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München* durchgeführt. Im Rahmen dieser prospektiven Studie wurden alle Patienten im bezeichneten Studienzeitraum eingeschlossen, die folgende Kriterien erfüllten:

Einschlusskriterien:

- Vorliegen einer Schwerst-Verletzung (*Polytrauma*) mit einem *Injury Severity Score* (ISS) ≥ 16 Punkten
- Intervall: Trauma und Aufnahme in den Schockraum ≤90min.
- Alter: 18 - 70 Jahre

Ausschlusskriterien:

- Strafgefangene, Schwangere und Patienten mit bekannter Betreuung
- entzündliche Grunderkrankung wie: Sepsis, Meningitis, HIV, Hepatitiden etc.
- Patienten, welche innerhalb der ersten 48h an den Traumafolgen versterben

Gemäß der Verletzungsschwere wurden die Patienten in eine Gruppe I *leichter Verletzte* mit einem ISS <34 Punkte und in eine Gruppe II *schwer Verletzte* mit einem ISS ≥34 Punkte eingeteilt.

Von allen Patienten wurde nachträglich eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Da die eingeschlossenen Patienten aufgrund der klinischen Situation (Bewusstlosigkeit,

Intubation, Schmerzmittel etc.) diese Einverständniserklärung initial nicht abgeben konnten, wurde in enger Absprache mit der Ethikkommission das Einverständnis erst nach Wiedererlangung der kognitiven Fähigkeiten des Patienten erteilt. Hatte der Patient diese Fähigkeit nicht in ausreichendem Maße erreicht, so wurde das Einverständnis zur Studienteilnahme von einem gesetzlichen Vertreter eingeholt. Nach der initialen Stabilisierungsphase im Schockraum und den, entsprechend dem Verletzungsmuster notwendigen Operationen wurden die Patienten auf unserer Intensivstation aufgenommen.

Die Dokumentation des klinischen Verlaufs, der Serumparameter, Hämatologie, Enzyme, Gerinnung sowie des therapeutischen Regimes erfolgte täglich fortlaufend über den gesamten Studienzeitraum gemäß den Vorgaben des Trauma-Registers der *Arbeitsgemeinschaft Polytrauma der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie* und den Richtlinien der *Europäischen Konsensuskonferenz zur Aufnahme von Daten polytraumatisierter Patienten* (153). Um das posttraumatische Organversagen quantitativ erfassen zu können, wurden zu jedem Blutabnahmezeitpunkt zusätzlich die Parameter zur Berechnung des MOF-Scores nach *Goris* in der Modifikation nach *Lefering* dokumentiert (59;98).

Die Mortalität der Patienten wurde über einen Zeitraum von 90 Tagen nach Trauma protokolliert.

Als Kontrollgruppe wurden freiwillige Probanden untersucht, die weder klinische noch anamnestische Zeichen einer akuten oder chronischen Infektion aufwiesen.

3.2.2. Probengewinnung

Die Blutentnahmen erfolgten direkt bei Klinikaufnahme (ca. 60-90min nach Trauma), anschließend jeweils nach 6h, 12h, 24h, 48h und 72h bezogen auf den Zeitpunkt des Traumas

(siehe Abbildung 5). Es wurde jeweils 5ml Vollblut in einem heparinisierten Röhrchen (2500IE Na-Heparin, Liquemin®, Roche Pharma, Schweiz) aus einem arteriellen Zugang entnommen **(siehe Abbildung 6,** Schritt 1**)**. Für die ELISA-Analyse (siehe *3.3.7*) wurde zusätzlich eine weitere Probe von 10ml Blut ohne Zusatz (Sarstedt® Serum Monovetten) entnommen und anschließend das Serum durch Zentrifugation gewonnen und bei –20°C bis zur Messung gelagert. Blutproben der Kontrollgruppe wurden in identischem Modus prozessiert und unmittelbar im Anschluß weiterverarbeitet.

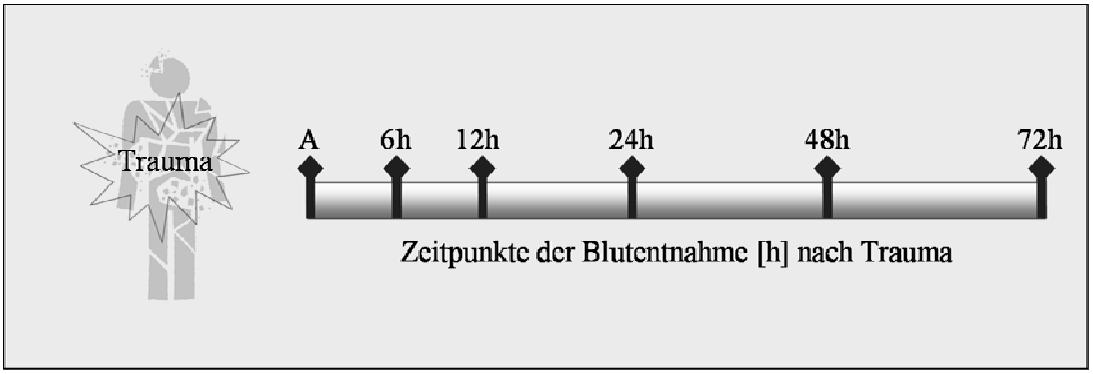

Abbildung 5, Zeitachse der sequentiellen Blutabnahmen: Den Patienten wurden bei Aufnahme in den Schockraum, sowie 6h, 12h, 24h, 48h und 72h standardisiert nach Trauma Blutproben entnommen.

3.2.3. Stimulation und Inkubation

Im direkten Anschluß wurde die entnommene 5ml Vollblutprobe 1:10 mit RPMI 1640 Medium (FCS, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), versetzt mit 25mmol/mM HEPES Puffer (Vitromex, Vilshofen, Deutschland), L-Glutamine, 10% fetalem Kälber-Serum (FCS, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 0,1mg/mL Gentamycin (Merck, Darmstadt, Deutschland) verdünnt. Basierend auf unseren Ergebnissen aus den Validierungsversuchen (siehe *4.1*) wurden für die Phase der Stimulation folgende Modi gewählt **(siehe Tabelle 4)**.

Stimulus	Lipopolysaccharid (LPS) E. coli, Serotyp 055: B5 Sigma-Aldrich, München, D 100ng/ml
Sekretionsblocker	Monensin Sigma-Aldrich, München, D 2,0µmol/l
Inkubationszeit	4h

Tabelle 4: Tabellarische Aufstellung der gewählten Kulturbedingungen für die Stimulation

Zur Stimulation wurde je 1ml dieser Stammlösung auf 7 Falcons verteilt und 4 davon mit 100ng/ml Lipopolysaccharid (LPS aus Escherichia coli, Serotyp 055:B5, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) sowie 2,0µmol/l konzentrierten Monensin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) versetzt. Die 3 übrigen Falcons wurden zur Kontrolle unstimuliert (keine Zugabe von LPS) mitprozessiert **(siehe Abbildung 6,** Schritt 2**)**. Die Proben wurden im Anschluß über 4h im Brutschrank bei 37^0C, 5% CO^2 unter sterilen Bedingungen inkubiert. Um Zellverlust durch Adhäsion an den Oberflächen der Tubes zu vermeiden, wurden zum einen spezielle antiadhäsive Tubes (Beckton Dickinson, San Jose, USA) eingesetzt, zum anderen wurden die Falcons in einem Zellrotor gelagert, der während der gesamten Inkubationszeit eine kontinuierliche Bewegung der Proben garantiert (6U/min).

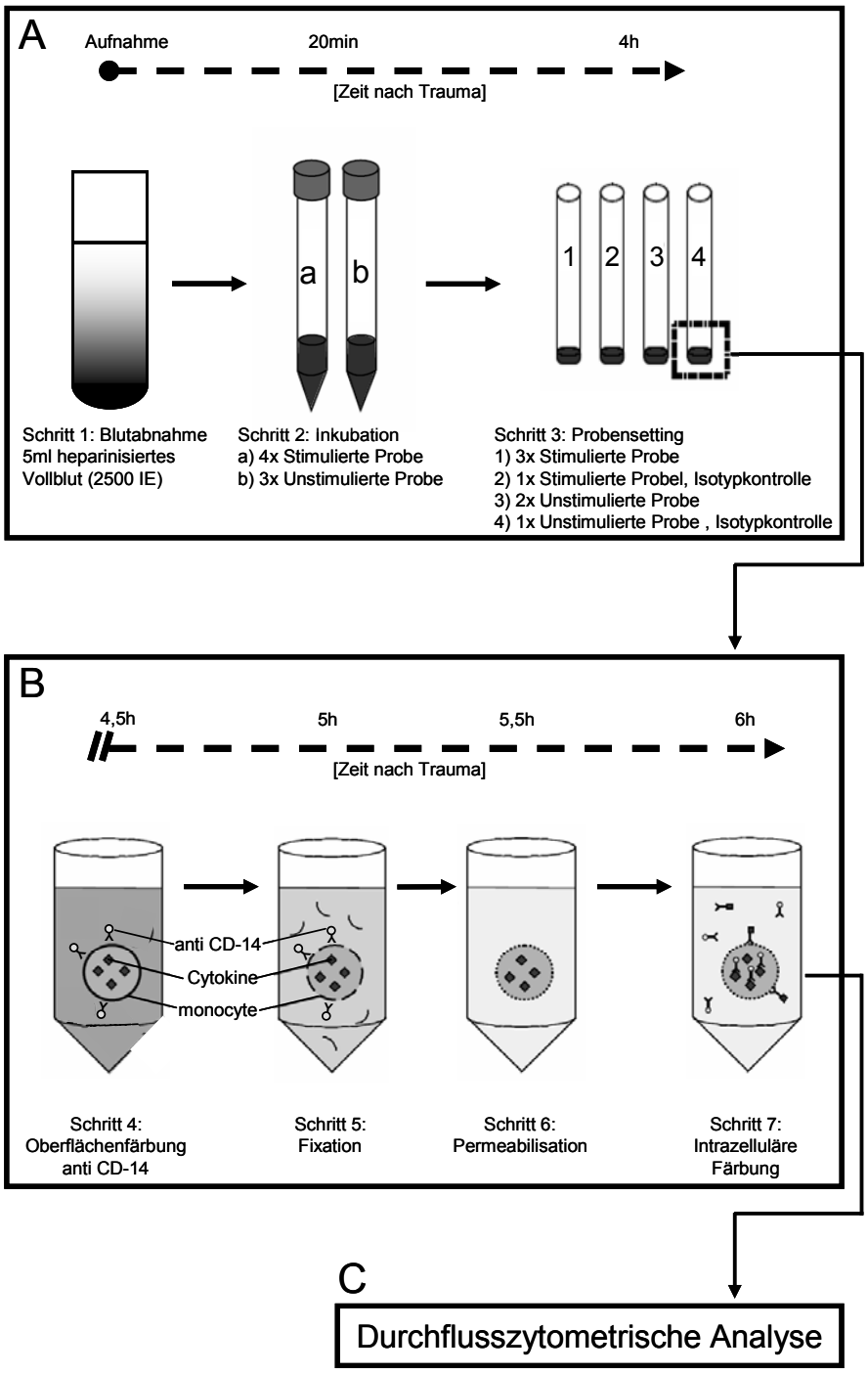

Abbildung 6, Schema zum Versuchsablauf: Teil A - Probengewinnung, Stimulation und Inkubation: 5ml heparinisiertes Vollblut werden verteilt auf stimulierte und unstimulierte Probe. Die Proben werden 4h inkubiert und für den Färbeansatz auf 7 FACS-Tubes verteilt. Teil B – Zellpräparation und *Immuno-Staining*: Oberflächen-Markierung mit Anti-CD14, Fixation (Intra Prep) und Ery-Lyse. Schließlich werden die Zellen permeabilisiert (Intra Prep) und intrazellulär gefärbt. Teil C – Durchflußzytometrische Analyse

3.2.4. Zellpräparation und Antikörper-Markierung

Die Präparation der Zellen wurde in der Literatur ausführlich von *Zedler et al.* beschrieben (204), kurz zusammengefaßt verliefen die einzelnen Schritte wie folgt:

Nach der Inkubationsphase werden die Proben zunächst im Falcon resuspendiert und insbesondere die Gefäßwände mit Resuspendat gespült um adhärierende Zellen wieder zu lösen. Im Anschluß daran wird die Suspension aus den Falcons 1:1 in Eppendorf-Cups (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) überführt und mit 500µl eiskaltem Phospate Buffered Saline (PBS) Puffer (Pettenkofer Apotheke, München, Deutschland), versetzt mit 0,1% NaN_3 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gewaschen. Die Proben werden bei 1500U/min über 5min bei 4^0C zentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgezogen.

Es verbleibt nunmehr nur noch ein kleines Sediment, bestehend aus korpuskulären Blutanteilen. Im Anschluß erfolgt ein zweiter Waschschritt mit 500µl PBS/0,1% NaN_3. Anschließend werden jedem Cup jeweils 5µl monoklonaler anti-CD14 IgG-Antikörper, konjugiert mit Phycoerythrin-Cyanin-5 (CD14-PC-5, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) zugesetzt. Die Proben werden für 10min in Dunkelheit bei 4^0C inkubiert **(siehe Abbildung 6,** Teil B, Schritt 4: Oberflächenfärbung**)**.

Zur Fixation des Antikörpers an die Zelloberfläche und zur Lyse der verbliebenen Erythrozyten werden anschließend 100µl Fixations-Lösung (Intra Prep Permeabilization Reagent, Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland) hinzu gegeben **(siehe Abbildung 6,** Teil B, Schritt 5: Fixation**)**. Nach einem weiteren Waschvorgang mit 500µl PBS/0,1% NaN_3 und Zentrifugation bei 1500U/min über 5min wird das verbliebene Zellsuspensat zur Absättigung der unspezifischen FC-Rezeptoren mit 300µl humanem AB-Serum (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) für 30min bei 4^0C inkubiert.

Um eine intrazelluläre Färbung, i.e. ein Eindringen von Antikörpern zu ermöglichen, werden zunächst die Zellmembranen perforiert. Hierfür werden die Zellen nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS/0,1% NaN_3 über 10min mit 100µl Permeabilisations-Lösung, basierend auf Saponin (Intra Prep Permeabilization Reagent, Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland) inkubiert **(siehe Abbildung 6,** Teil B, Schritt 6: Permeabilisation**)**.

Im nächsten Schritt werden die Proben erneut resuspendiert und 1:1 in FACS-Tubes (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) übertragen.

Anschließend erfolgt die intrazelluläre Färbung **(siehe Abbildung 6,** Teil B, Schritt 7: Intrazelluläre Färbung**)**, hierzu werden die Proben gemäß **Abbildung 7** mit Antikörpern versehen. Jede Spalte der Tabelle in **Abbildung 7** steht dabei für ein Tube, d.h. gemäß Spalte 1 der Tabelle wird das stimulierte Tube Nr. 1 mit Antikörpern gegen TNF-α und Il-8 versehen. Zur Anwendung kommt dabei jeweils 1µl der Antikörper Anti-Il-1β-Phycoerthrein (PE), Anti-TNF-α-Fluorisothiocyanat (FITC), Anti-TNF-α-PE, Anti-Il-6-FITC (Hölzel Diagnostika, Köln, Deutschland) und Anti-Il-8-PE (Biosource, Solingen, Deutschland).

Die Wahl dieser überwiegend proinflammatorischen Zytokine erfolgte basierend auf der in der Einleitung unter *1.4* beschriebenen essentiellen pathophysiologischen Rolle des jeweiligen Mediators.

Sowohl im stimulierten Set als auch im nicht-stimulierten Set wird jeweils eine sog. Isotypkontrolle, d.h. ohne Zugabe von Anti-Zytokin-Antikörper mitprozessiert **(siehe Abbildung 6,** Teil A, Schritt 3: Probensetting**)**. Anstatt dessen werden die Isotypkontrolle mit je 5µl unspezifischem FITC-fluoreszenzmarkiertem IgG (Biosource, Solingen, Deutschland) inkubiert. Diese zusätzliche Kontrolle hilft, unspezifische intrazelluläre Signale auszuschließen (34;204).

Die Proben werden mit den Antikörpern über 25min in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluß abschließend mit PBS/0,1% NaN_3 gewaschen **(siehe Abbildung 6,** Teil B, Intrazelluläre Zytokinfärbung**)**.

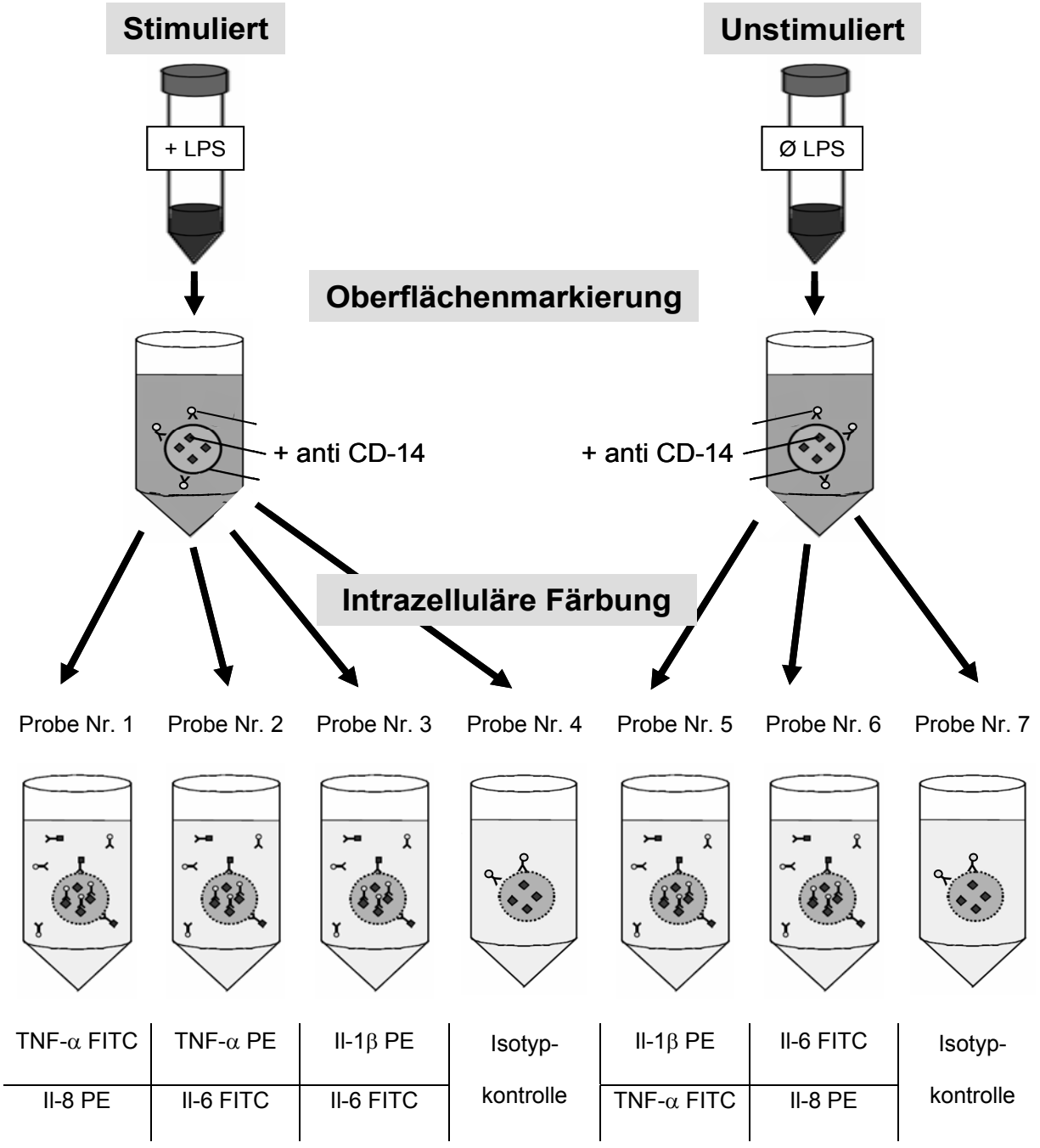

Abbildung 7, Färbeansatz: Jede Spalte entspricht dabei einem separat gefärbten Ansatz, d.h. z.B. für die linke Spalte: Probe Nr. 1 wird mit Antikörpern gegen TNF-α (in FITC-Konjugation), sowie Il-8 (als PE-Konjugat) intrazellulär gefärbt

3.2.5. Durchflußzytometrische Analyse

Für die durchflußzytometrische Analyse wurde ein *EPICS-XL MCL* Durchflußzytometer (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) verwendet. Das Gerät ist ausgestattet mit einem 20mW 488nm Argon-Ionen-Laser und 4 Kanälen. Zur Bestimmung von Fluoreszenzsignalen ausgehend von FITC war ein Filter von 530nm Wellenlänge, für PE 585nm und für PC5 >650nm vorgeschaltet **(siehe Abbildung 8)**.

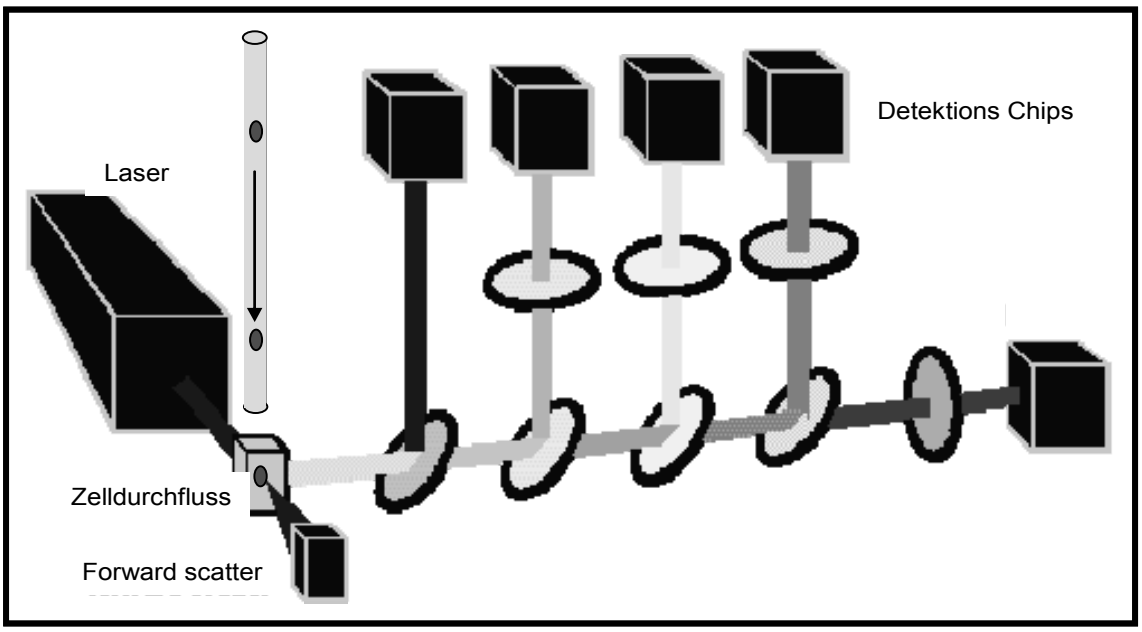

Abbildung 8, Prinzip der Funktion der durchflußzytometrischen Analyse: Zuerst wird ein Multispektrallicht auf die Zielsuspension emittiert. Die Fluoreszenzträger in der Zielsuspension emittieren auf Anregung verschiedene charakteristische Spektralwellen, die durch halbdurchlässige Spiegel hindurch treten. Ein hochauflösender Detektor zählt das für jeden Fluoreszenzfarbstoff spezifische Signal. Als Lichtquelle wird im Durchflußzytometer (FACS) ein luftgekühlter Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm eingesetzt.

Die Datenaquisition erfolgte an der *EPICS System Station* in Kombination mit der *System II* Software (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland).

Vor jeder Messung wurden die System- und Filtereinstellungen überprüft und die Stabilität der Lichtspektren mittels standardisierter Kontrollproben (FlowCheck, Beckman Coulter,

Krefeld, Deutschland) validiert. Zunächst erfolgte die Oberflächencharakterisierung mittels *Scatter*-Analyse gemäß den dreidimensionalen Eigenschaften der Zellen. So wurden zunächst entsprechend Größe und Zelldichte die PBMC´s als *region of interest* markiert. Aus diesen wurden dann die CD-14+ Monozyten über den PC-5-Detektionskanal sortiert **(siehe Abbildung 9)**.

Dies bedeutet, daß eine sichere Unterscheidung zwischen CD14+ Granulozyten und CD14+-Monozyten möglich ist.

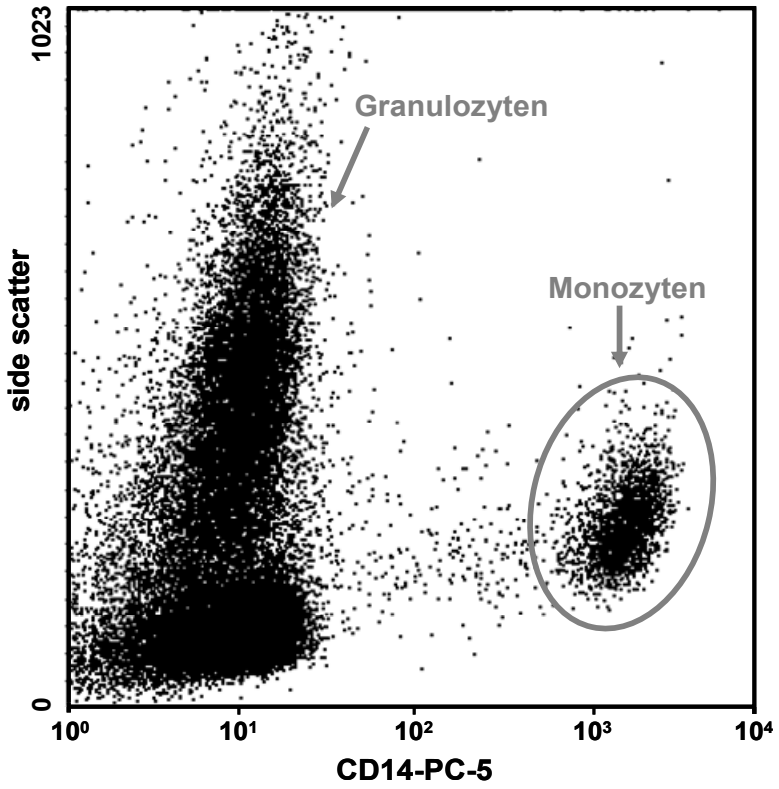

Abbildung 9, Unterscheidung Granulozyten-Monozyten Auf der y-Achse der side scatter, auf der x-Achse das Oberflächenepitop CD14 im PC-5-Konjugat. Die sichere Unterscheindung zwischen CD14+ Monozyten und CD14+ Granulozyten ist möglich

In jeder Analyse zählte die Software standardisiert 5000 CD14+ Monozyten. In **Abbildung 10** ist das Prinzip der Eichung der Analyse dargestellt. Der linke Graph demonstriert exemplarisch eine unstimulierte Probe. Die Zellwolke im Quadranten IV (grau hinterlegt) repräsentiert eine Monozytenpopulation, die kein intrazelluläres Zytokin enthält (keine Emission der PE-Wellenlänge entlang der Y-Achse). Als Nullinie wird der Oberrand der Zytokin-negativen Monozytenfraktion gesetzt (siehe Pfeil). In der rechten Abbildung die Probe des gleichen Probanden in stimuliertem Zustand. Deutlich wird der Effekt der Stimulation. Ein Teil der Monozytenfraktion (Quadrant II, grau hinterlegt) emittiert nach Stimulation Licht der PE-Wellenlänge, enthält also intrazellulär Zytokin, das immunofloureszent markiert ist.

Die Zytokin-positiven Zellen im Quadranten II werden als *ratio* der Gesamt-Monozytenpopulation ($Monozyten_{Quadrant\ I}$ + $Monozyten_{Quadrant\ II}$) in [%] durch die Analysesoftware *WinMDI 2.8 Software* (http://facs.scripps.edu/software.html) kalkuliert.

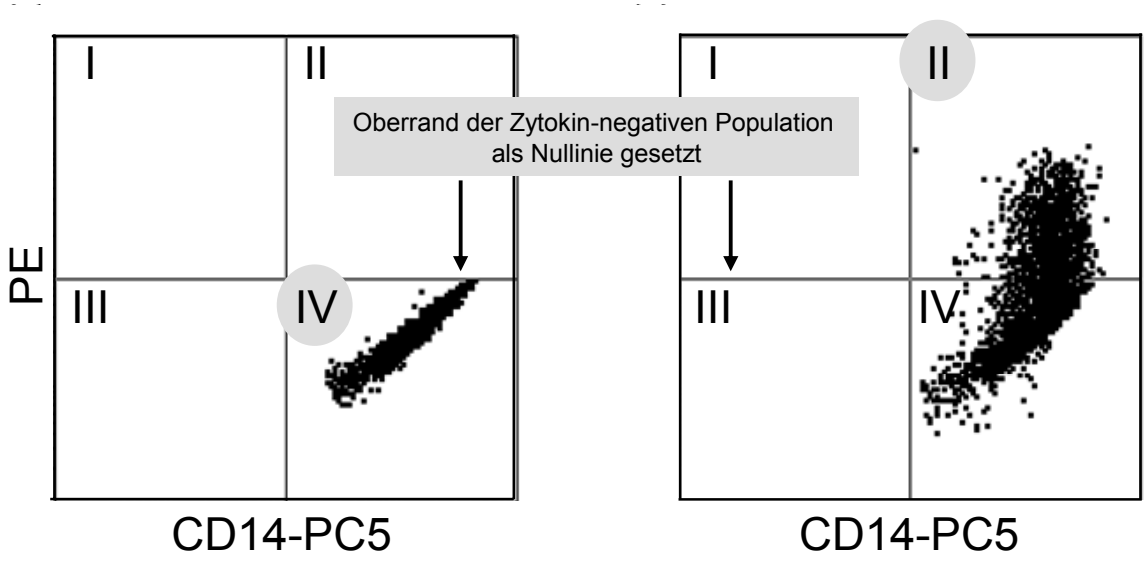

Abbildung 10, Eichung der durchflußzytometrischen Analyse: In Quadrant IV sind jeweils die Zytokin-negativen Monozyten zu finden. Die intrazelluläres Zytokin enthaltenden Monozyten emittieren Licht der PE-Wellenlänge (im Beispiel) und sind in Quadrant II zu finden. Der Oberrand der Zytokin-negativen Population wird als Nullinie gesetzt.

Für die Bestimmung der LPS-Bindungsstellen wurde zusätzlich die *mean fluorescence intensity (*MFI) gemessen, um damit die CD14 Oberflächenrezeptor-Expression zu bestimmen (64).

3.2.6. Analyse der systemischen Konzentration mittels ELISA

Wie in *3.3.3* beschrieben, wurde bei Patienten und Probanden zusätzlich eine weitere Probe von 10ml Blut ohne Zusatz (Sarstedt® Serum Monovetten) entnommen, anschließend das Serum durch Zentrifugation gewonnen und bei –20°C bis zur Messung gelagert. Nach Abschluß der Patienten- und Probandenrekrutierung wurden in diesen Proben mittels etablierter ELISA-Technologie die Konzentrationen von TNF-α, Il-6, Il-8 entsprechend den Angaben des Herstellers (Milenia Biotech, Bad Nauheim, Deutschland) bestimmt.

Für Il-1β ist bekannt, daß in der systemischen Zirkulation keine aussagekräftigen Messungen erzielt werden, daher wurde in der vorliegenden Untersuchung darauf verzichtet (48;179). Die Bestimmungen der Konzentrationen von Zytokinen in der systemischen Zirkulation wurden zusätzlich zur Bestätigung der durchflußzytometrischen Daten durchgeführt, um die Validität der eigenen Messung anhand der Daten der Literatur zu überprüfen (194).

3.2.7. Statistische Auswertung

Die ermittelten Einzelwerte der prozentualen Häufigkeit Zytokin-positiver Monozyten als *ratio* der Gesamt-Monozytenpopulation wurde in [%] erfasst und pro Beobachtungszeitpunkt für die Patienten gemittelt, die Angabe erfolgt als Mittelwert±Standardfehler des Mittelwertes [MW±SEM].

Um zu überprüfen, ob zwischen den einzelnen Gruppen Unterschiede bestehen, wurden die Daten mittels *Analysis of Variance (ANOVA) on ranks* für nicht-verbundene Stichproben nach *Kruskall-Wallis*, gefolgt von *Dunn´s test* als post-hoc Verfahren zur Identifikation spezifisch unterschiedlicher Gruppen analysiert. Für die Analyse, ob im zeitlichen Verlauf signifikante Unterschiede vorliegen, wurde *ANOVA* für verbundene Stichproben, gefolgt von *Student-Neumann-Keuls test* berechnet. Die Signifikanzniveaus wurden mit $p < 0{,}05$ festgesetzt. Als statistische Software wurde Sigma Stat 2.0 eingesetzt (SPSS Inc., USA).

4. Ergebnisse

4.1. Stufe I – Validierung des experimentellen Protokolls

4.1.1. Probanden

Für die Validierungsversuche wurden 8 gesunde Probanden (4 Frauen, 4 Männer) mit einem durchschnittlichen Alter von 29±7 Jahre rekrutiert.

4.1.2. Stimuli

Unter sonst identischen Kulturbedingungen ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimuli bezüglich der intrazellulären Zytokinexpression für die gemessenen Zytokine feststellen **(siehe Abbildung 11)**.

Da jedoch die Gesamt-Zellausbeute unter Anwendung von 100ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) als alleinigem Stimulus signifikant höher war mit 5300±150 Zellen gegenüber 4200±870 Zellen bei Anwendung von 100ng/ml Lipopolysaccharid + 100U/ml IFN-γ und 3100±340 Zellen pro gemessenen Ansatz für den Einsatz von 75mg/ml SAC I, wurde davon ausgegangen, daß der toxische Effekt des Stimulus LPS am geringsten ist. In den Folgeversuchen wurden 100ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) als Monostimulus eingesetzt.

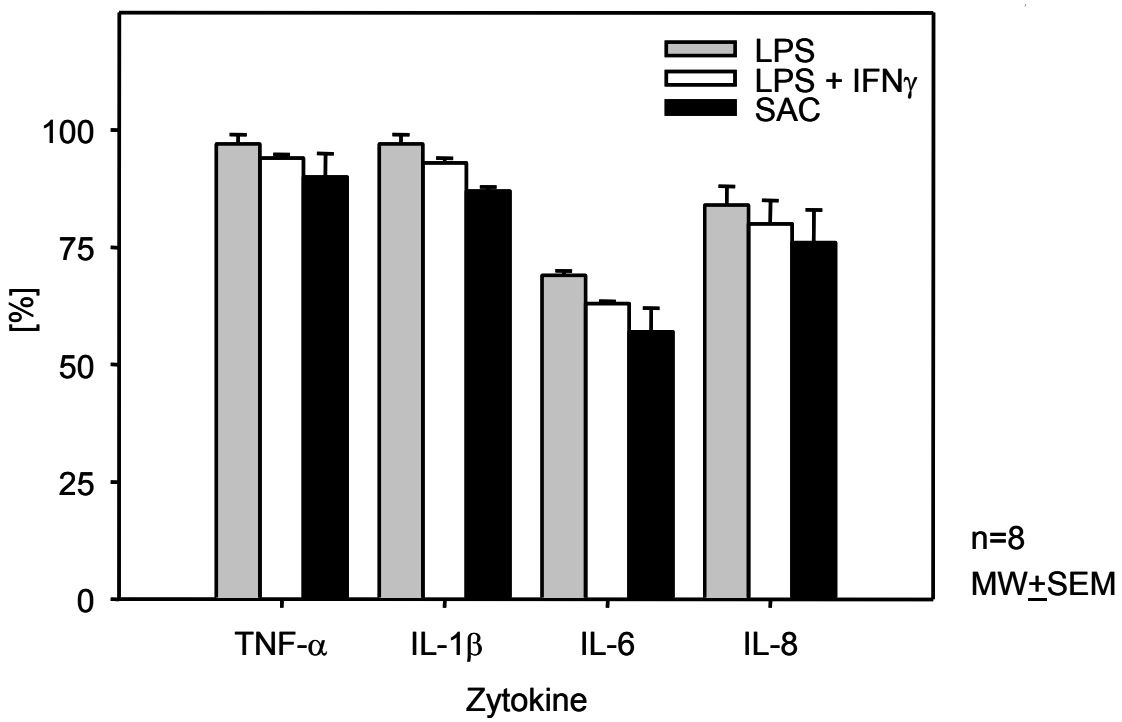

Abbildung 11: Validierungsanalyse Stimuli: Auf der Y-Achse aufgetragen der prozentuale Anteil der Zytokin-positiven MØ in Relation zur Gesamt-Monozytenpopulation, jeweils stimuliert mit LPS, LPS+IFN-γ oder SAC (n=8 gesunde Probanden, Werte als MW±SEM).

4.1.3. Sekretionsblockade

Um den Einfluß des Einsatzes der beiden Sekretionshemmer Brefeldin A und Monensin auf die Messung der Zytokinsynthese-Kapazität zu untersuchen, wurden Blutproben der 8 Probanden mit 100ng/ml Lipopolysaccharid stimuliert und entweder mit Brefeldin A oder Monensin versetzt.

Die Analyse der Effektivität der Sekretionsblocker zeigte, daß zwischen Brefeldin A und Monensin bezüglich der Synthese von TNF-α mit 93±5% vs. 97±1% und von Il-1β mit 95±3% vs. 97±2% kein signifikanter Unterschied besteht, auch wenn die Anzahl der Zytokin-positiven Zellen unter Monensin geringfügig höher zu sein scheint (Werte als MW±SEM, Zytokin-positive MØ als % der Gesamt-Monozytenpopulation). Die Zytokinsynthese-

Kapazität für Il-6 mit 46±8% und Il-8 mit 61±8% war unter Blockade mit Brefeldin A jedoch signifikant niedriger als unter Monensin mit 69±3% für Il-6 und 84±4% für Il-8 **(**p <0,05, **siehe Abbildung 12)**. Für die Folgeversuche wurde daher Monensin in einer Konzentration von 2,0µmol/l als Sekretionsblocker eingesetzt.

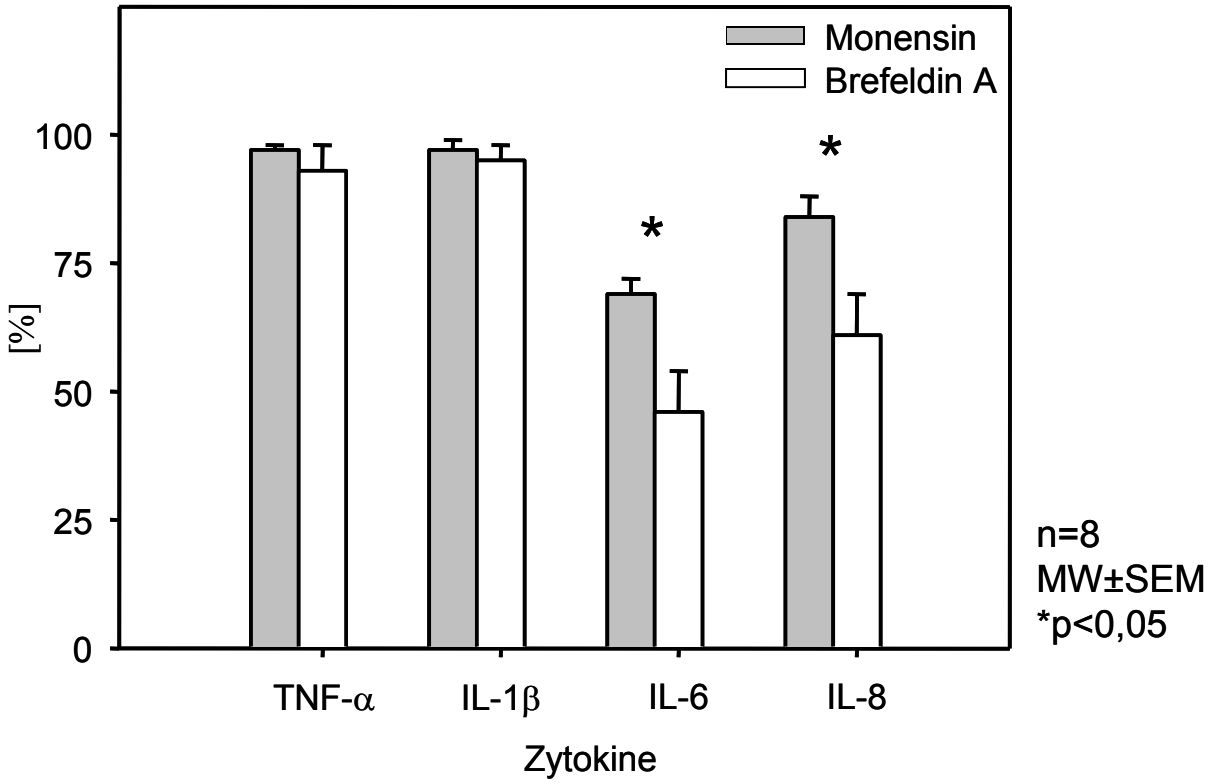

Abbildung 12, Validierungsanalyse Sekretionsblockade: Auf der Y-Achse aufgetragen der prozentuale Anteil der Zytokin-positiven MØ als % der Gesamt-Monozytenpopulation, jeweils mit Monensin bzw. Brefeldin A inkubiert. Der Prozentsatz der Zytokin-positiven MØ ist unter Monensin für Il-6 und Il-8 signifikant höher gegenüber der Brefeldin A-Inkubation (n=8 gesunde Probanden, Werte als MW±SEM, *=p<0,05).

4.1.4. Inkubationszeit

In einer weiteren Serie wurden Blutproben von 8 Kontrollprobanden sequentiell über 2h, 4h, 6h und 12h in Anwesenheit von 100ng/ml Lipopolysaccharid und 2,0µmol/l Monensin unter oben genannten Bedingungen inkubiert. Die Ergebnisse für die Inkubation über 2h betrugen dabei für TNF-α 40±15%, für Il-1β 34±21%, für Il-6 51±18% und für Il-8 36±19%. Eine

Stimulation über 4h erbrachte für TNF-α 97±1%, für Il-1β 97±2% und für Il-8 84±4% und somit jeweils signifikant höhere Prozentsätze als die 2-stündige, sowie die 6- und 12-stündige Stimulation. Nach Inkubationszeiten über 6h und 12h zeigten sich ebenfalls wieder niedriger Gesamtzahlen an Zytokin-positiven MØ **(siehe Abbildung 13)** und insbesondere signifikant niedrigere Gesamt-Zellzahlen (Daten nicht abgebildet).

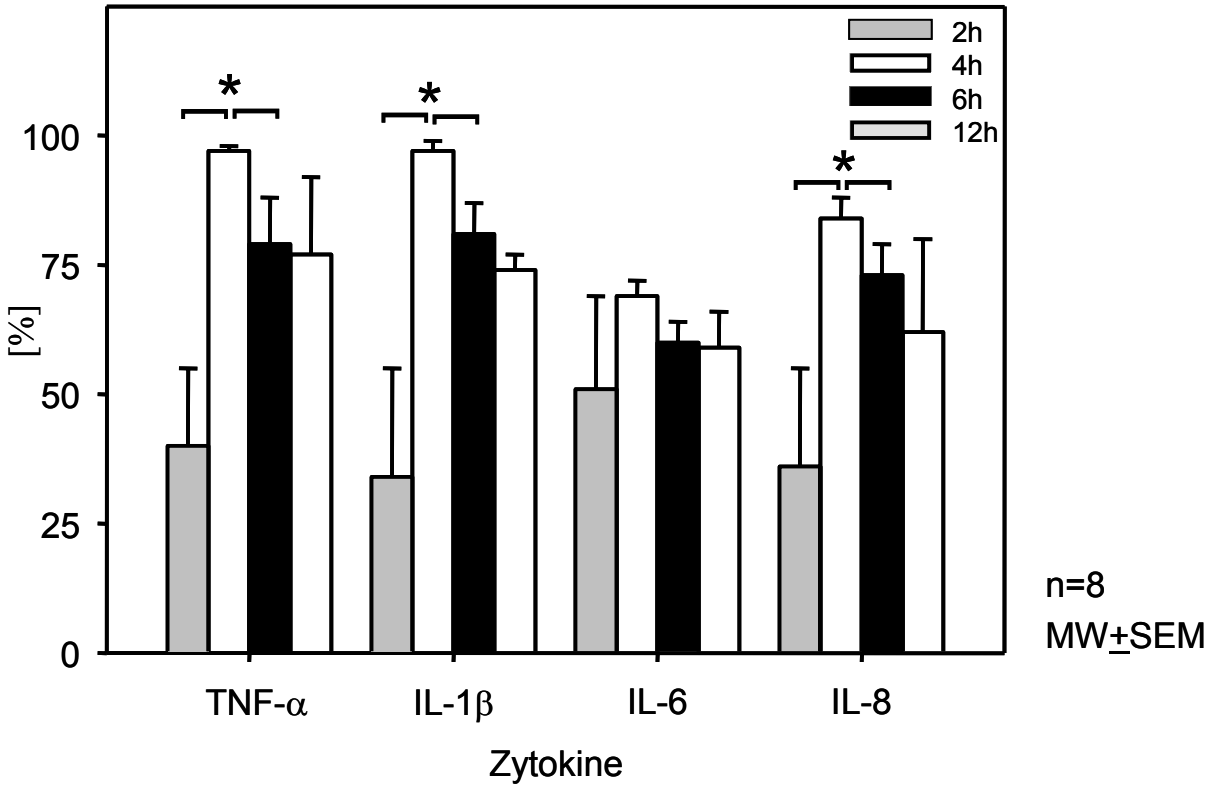

Abbildung 13, Validierung Stimulationszeiten: Auf der Y-Achse aufgetragen der prozentuale Anteil der Zytokin-positiven MØ als % der Gesamt-Monozytenpopulation, jeweils 2h 4h, 6h und 12h inkubiert. Die Stimulation über 4h erbringt dabei für die Zytokine TNF-α, Il-1β sowie Il-8 jeweils signifikant höhere Werte als die Stimulation über 2h, 6h und 12h. (n=8 gesunde Probanden, Werte als MW±SEM, *=p<0,05).

Somit wählten wir für die klinische Studie:

1. als Stimulus **100ng/ml Lipopolysaccharid**
2. als Sekretionsblocker **2,0µmol/l Monensin**
3. und eine Stimulationszeit von **4h**

4.2. Stufe II - Klinisch-experimenteller Abschnitt

4.2.1. Patienten und Kontrollkollektiv

Eingeschlossen wurden 13 polytraumatisierte Patienten. Das mittlere Alter der Patienten (4 Frauen, 9 Männer) betrug 41±5 Jahre. Der mittlere ISS in der Patientengruppe betrug 33±3 Punkte, 3 der Patienten entwickelten im Verlauf von 30 Tagen nach Trauma ein schweres MOF (≥ 4 Punkte) und 1 Patient verstarb am protrahierten Hirnödem in Folge seines schweren Schädel-Hirn-Traumas am Tag 40 nach Trauma.

Entsprechend der Verletzungsschwere wurden die Patienten eingeteilt in eine Gruppe I *leichter Verletzte* mit einem ISS <34 Punkte und in eine Gruppe II *schwer Verletzte* mit einem ISS ≥34 Punkte. Der mittlere ISS in Gruppe I betrug dabei 25±2, in Gruppe II 41±3 Punkte, bezüglich der Verletzungsschwere bestand somit ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p < 0{,}005$).

Der *Cutoff* von ISS =34 Punkten wurde basierend auf den Vorarbeiten von *Laird et al.*, *Rutledge et al.* und *Schinkel et al.* gewählt, die in ihren Arbeiten zeigen konnten, daß die Überlebenswahrscheinlichkeit ab einem ISS >34 Punkten überproportional sinkt (96;154;155;162). Bezüglich der übrigen epidemiologischen Daten (Geschlecht, Alter) bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Die detaillierten Daten bezüglich des Verletzungsmusters, des ISS, sowie des Status der Patienten zum aktuellen Zeitpunkt sind in **Tabelle 5** zusammengefasst.

Als Kontrollgruppe wurden 8 gesunde Probanden (4 Frauen, 4 Männer) mit einem durchschnittlichen Alter von 29±7 Jahre rekrutiert.

Gruppe	Pat.	Alter	Geschlecht	ISS	Outcome nach 90 Tagen	Initiales Verletzungsmuster
ISS < 34	I	33	m	33	Behinderung auf Grund neurologischer Defizite in der oberen Extremität	Galeawunde, Subtot. Amputation der oberen Extremität, Lungenkontusionen bds.
	II	38	m	33	Verstorben am protrahierten Hirnödem	SHT III, Lungenkontusionen bds., subtotale Amputation untere Extremität
	III	23	m	20	Komplette Erholung	Lungenkontusionen bds., Nierenkontusion, Milzhämatom
	IV	33	m	17	Komplette Erholung	Lungenkontusion, multiple Frakturen obere und untere Extremität
	V	57	w	22	Komplette Erholung	Lungenkontusion einseitig, LWK Fraktur, Fraktur untere Extremität
	VI	75	m	24	Rehabilitationsklinik, weitgehend voll mobilisiert	SHT I, Lungenkontusionen bds. Mit Hämatopneumothorax, Rippenserienfraktur, Beckenfraktur
	VII	40	w	29	Komplette Erholung	Lungenkontusion bds., Rippenserienfraktur, HWK 1-8 Frakturen, multiple Frakturen untere Extremität
ISS ≥ 34	VIII	18	m	57	Behindert auf Grund der erheblichen neurologischen Defizite nach SHT	SHT III, Lungenkontusionen bds., Rippenserienfraktur, Herzkontusion, HWK-Fraktur, Leberruptur
	IX	33	m	38	Körperbehinderung bei fehlendem Arm, kein neurologisches Defizit, mobilisiert im Rollstuhl	Extensive Galearißwunde, multiple HWK-Frakturen, Lungenkontusionen bds., BWK-Fraktur, open book Fraktur Becken, traumatische Amputation Schultergelenk komplett, multiple Frakturen untere Extremität
	X	44	w	36	Behindert auf Grund der erheblichen neurologischen Defizite nach SHT	SHT III, Lungenkontusion bds., Rippenserienfraktur mit Hämatopneumothorax, Milzhämatom
	XI	34	m	34	Komplette Erholung	HWK Frakturen mit inkompl. Querschnittssyndrom, Lungenkontusion, Myokardkontusion, Leberruptur, Nieren-, Pankreaskontusion, LWK-Fraktur, Beckenfraktur, multiple Frakturen obere und untere Extremität
	XII	29	m	41	Schwer behindert bei erheblichem neurologischem Defizit auf Grund des SHT	SHT III, Mittelgesichtsfrakturen Le Fort II und III, Lungenkontusion mit Hämatopneumothorax, Rippenserienfraktur, Beckenfraktur, Multiple Frakturen untere Extremität
	XIII	78	w	38	Rehabilitationsklinik, mobilisiert im Gehwagen	SHT III, Mittelgesichtsfrakturen Le Fort II-III, Frakturen untere Extremität

Tabelle 5, Patientenkollektiv: n=13, männlich: 9, weiblich: 4

4.2.2. Durchflußzytometrische Analyse

4.2.2.1. Charakteristika der CD14+ Monozyten

In der ersten Zeile der **Tabelle 6** (siehe unten) sind die Monozytenzahlen zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten aufgetragen. Hieraus ersichtlich ist, daß die Patienten im Zeitraum der ersten 72 posttraumatischen Stunden keine signifikante Monozytose oder –penie entwickelten. Um auszuschließen, daß die von uns gemessenen Zytokinsynthese-Kapazitäten nicht durch eine veränderte Anzahl von CD14- bzw. LPS-Oberflächen-Rezeptoren beeinflußt werden, quantifizierten wir deren Zahl, ausgedrückt in *mean fluorescence intensity* (MFI). Wie aus **Tabelle 6** ersichtlich, ließ sich über den Studienzeitraum der initialen 72h nach Trauma keine signifikante *up*- bzw. *down*-Regulation der CD14-Rezeptoren beobachten.

Zeit nach Trauma [h]	0h	6h	12h	24h	48h	72h
% MØ	5,6±3,4	6,5±1,1	5,7±2,6	5,8±0,9	5,7±2,0	6,2±0,8
CD14 MFI	78,4±10,7	81,3±11,3	79,3±9,8	74,7±13,5	79,8±9,8	76,5±13,1

Tabelle 6, Prozentuale Monozytenzahlen und durchschnittliche CD14-Oberflächen-Rezeptorexpression: (n=13 Patienten, Werte als MW±SEM)

4.2.2.2. Effekt der Stimulation

Für den gleichzeitigen Nachweis der intrazellulären Zytokinsynthese-Kapazität wurden von PE-Cy5 hinsichtlich seiner detektierbaren Wellenlänge deutlich verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe (Fluorisothiocyanat=FITC, Emission 530nm; Phycoerythrin=PE, Emission 585nm) zur Markierung spezifischer monoklonaler Antikörper gegen die untersuchten Zytokine eingesetzt. In **Abbildung 14** sind exemplarisch die entsprechenden Daten der FACS-Analyse zum Nachweis der intrazellulären Zytokinsynthese der Probanden-Monozyten abgebildet.

Zellen, die CD14+ markiert sind und im Quadranten IV emittieren, tragen lediglich den Oberflächenantikörper, sind intrazellulär also nicht gefärbt **(siehe Abbildung 14)**. Für die Analyse der Synthese-Kapazität sind die Zellen im Quadranten II von Interesse, die CD14+ sowie PE+ bzw. FITC+ emittieren **(siehe Abbildung 15)**.

Die Zellen in **Abbildung 14** wurden in Abwesenheit von LPS über 4 Stunden inkubiert. Wie ersichtlich, ist ohne Stimulation kein präformiertes Zytokin intrazellulär nachzuweisen (kaum Zellen in Quadrant II). So waren in der Kontrollgruppe (n=8) die Ergebnisse für unstimulierte Monozyten jeweils an der Nachweisgrenze mit 0,9±0,5% für TNF-α, 0,1±1,5% für Il-1β, 0,3±0,9% für Il-6 und 0,1±0,6% für Il-8.

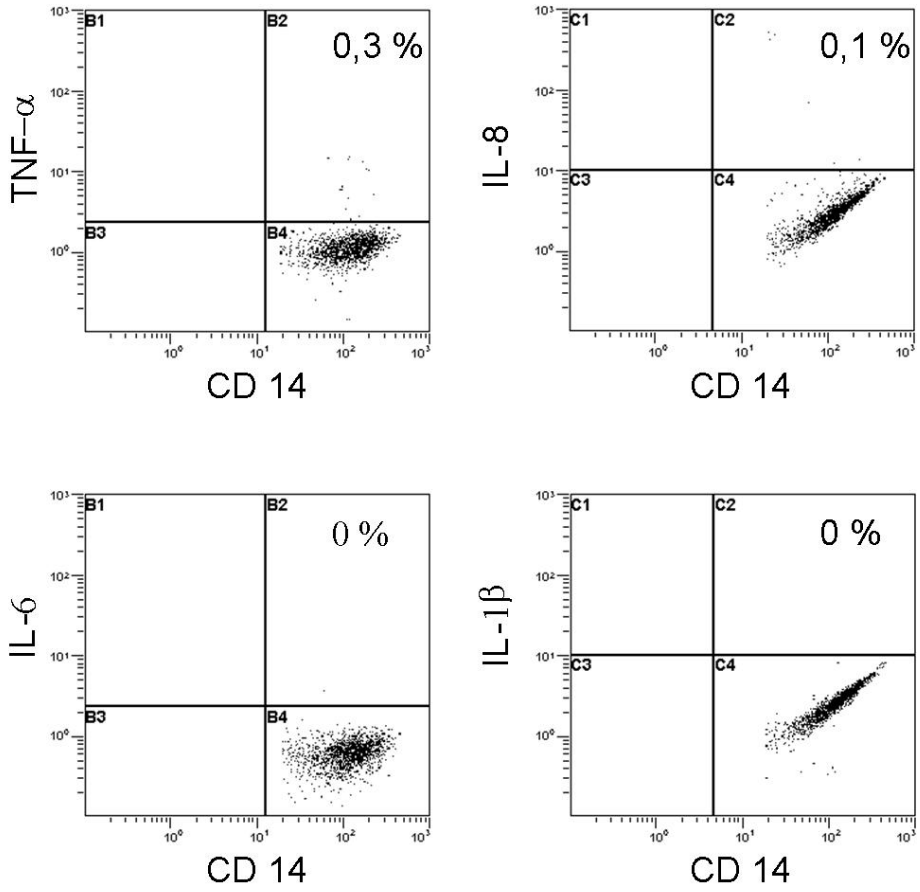

Abbildung 14, Zytokinsynthese-Kapazität in **unstimulierten** MØ eines gesunden Normalprobanden: Zellen im Quadranten IV sind lediglich Anti-CD14-PC5 Oberflächen-markiert, enthalten jedoch kein präfomiertes Zytokin

Im Gegensatz dazu ist in **Abbildung 15** die stimulierte Äquivalentprobe desselben Patienten abgebildet. Die Zellen wurde gemäß dem Versuchsprotokoll in identischer Weise inkubiert, jedoch zusätzlich mit 100ng/ml LPS stimuliert.

Die Analyse erfolgt nach einer Latenzperiode, in der die Zelle Zeit hatte, ihre maximale Syntheseleistung zu mobilisieren. Deutlich ist der hohe Anteil der PE+ bzw. FITC+ Zellen im Quadranten 2.

So beträgt die Synthese-Kapazität für TNF-α in der Kontrollgruppe 91±3%, für Il-1β 91±0,7%, für Il-6 68±6% und für Il-8 98±0,6%.

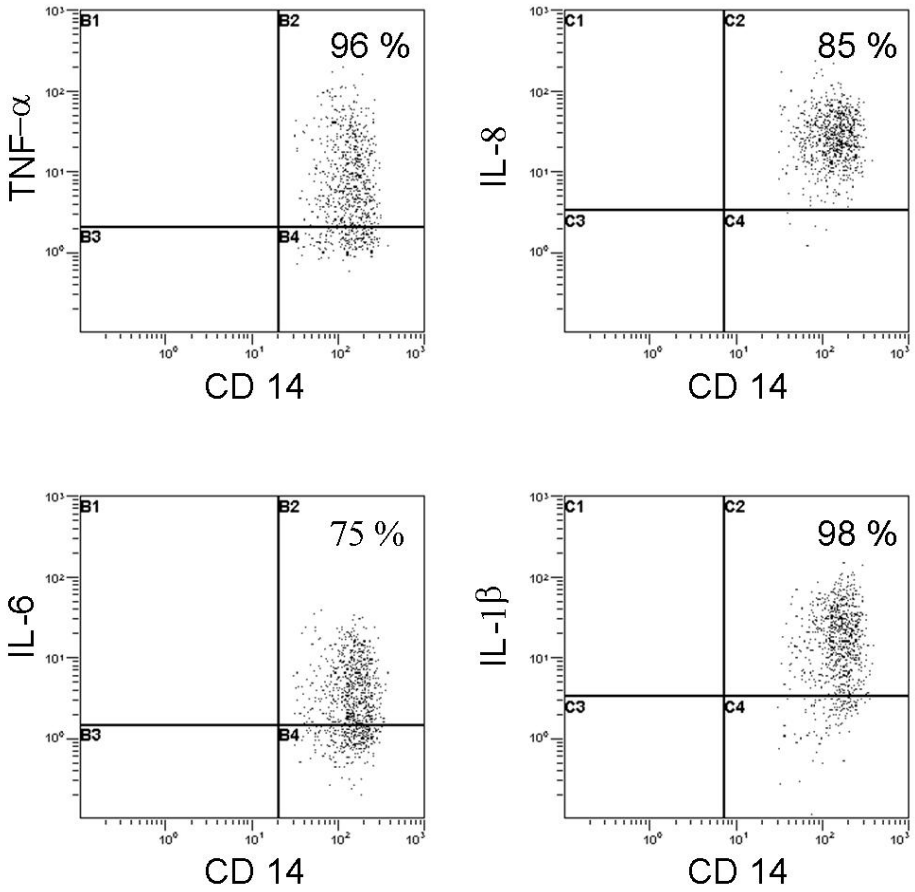

Abbildung 15, Zytokinsynthese-Kapazität **stimulierter** MØ eines gesunden Normalprobanden: Zellen im Quadranten IV sind lediglich Anti-CD14-PC5 Oberflächen-markiert, enthalten kein präfomiertes Zytokin, Zellen die im Quadranten II emittieren, enthalten zusätzlich intrazelluläres Zytokin. Ihr Anteil an der Gesamt-Population ist dabei für jedes Zytokin in [%] angegeben.

In **Abbildung 16** sind die Daten der FACS-Analyse für stimulierte Monozyten eines polytraumatisierten Patienten dargestellt.

Es handelt sich dabei um die Analyse 24h nach Trauma. Repräsentativ sind die deutlichen Einschränkungen der Zytokinsynthese-Kapazität bezüglich aller untersuchten Zytokine. Auf die Ergebnisse in der Patientengruppe soll im Folgenden ausführlich eingegangen werden.

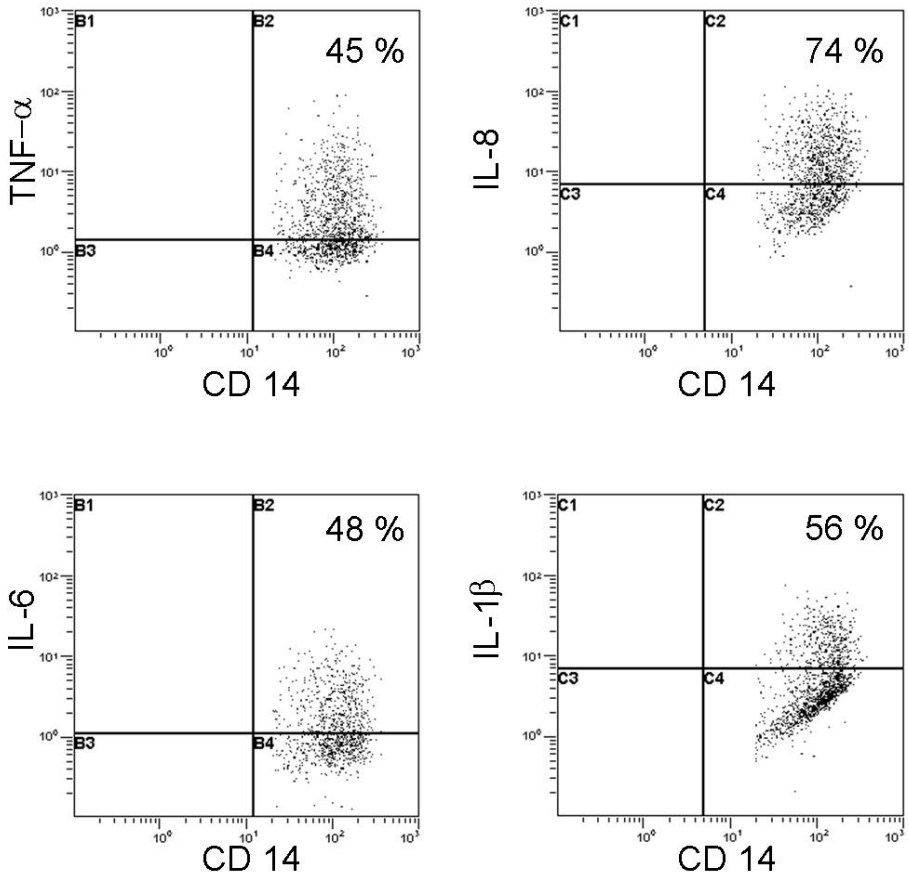

Abbildung 16: Zytokinsynthese-Kapazität **stimulierter** MØ eines Polytraumatisierten 24h nach Trauma: In gleicher Darstellungsweise sind hier exemplarisch die graphischen Ergebnisse der Durchflußzytometrie eines Polytraumatisierten dargestellt. Augenfällig ist der, im Vergleich zu **Abbildung 15** deutlich niedrigere Anteil der Zellen im Quadranten II.

4.2.2.3. Zytokinsynthese-Kapazität nach Polytrauma

Unter den folgenden Punkten ist die Zytokinsynthese-Kapazität für die untersuchten Zytokine abgehandelt. Die Graphen demonstrieren den Prozentsatz der intrazellulär gefärbten Zellen und damit die Anwesenheit von TNF-α, Il-6, Il-1β und Il-8 in humanen MØ unter Kontroll-Bedingungen und standardisiert auf das Unfallereignis nach 6h, 12h, 24h, 48h und 72h.

4.2.2.3.1. Tumornekrosefaktor-α (TNF-α)

Die Zytokinsynthese-Kapazität für TNF-α ist in der Patientengruppe während des gesamten Untersuchungszeitraums signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe und beträgt bei Aufnahme 78±5%. 12h nach Trauma ist die Synthese-Kapazität nur noch 49±5% und bleibt bis 48h nach Trauma im Vergleich zum Aufnahmewert signifikant niedriger. 72h nach Trauma erreicht die Synthese-Kapazität mit 71±6% fast das Ausgangsniveau **(Abbildung 17)**.

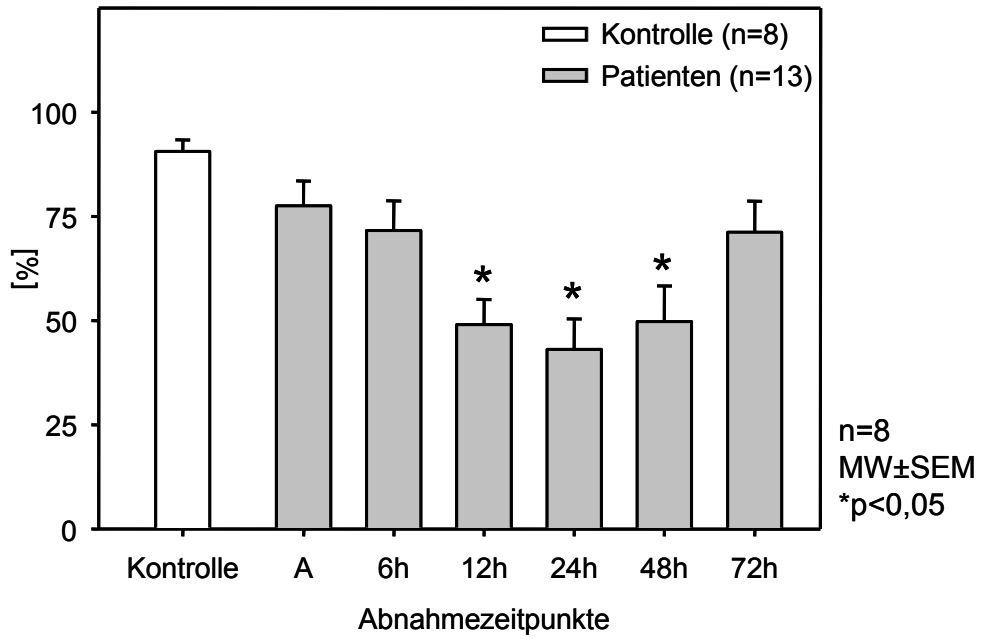

Abbildung 17: Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) stratifiziert über alle 13 Patienten: Auf der Y-Achse aufgetragen die TNF-α-positiven MØ in [%] der Gesamt-Monozytenpopulation. Auf der X-Achse die Probanden (weiß, n=8), gefolgt von der Patientengruppe zu den Abnahmezeitpunkten (n=13). Werte als MW±SEM, *=p<0,05

Um den Einfluss der Verletzungsschwere auf die Zytokinsynthese-Kapazität zu quantifizieren, sind im Folgenden die Ergebnisse der Gruppe I *Leichter Verletzte* mit einem ISS <34 Punkte und der Gruppe II *Schwer Verletzte* mit einem ISS ≥34 Punkte extrapoliert dargestellt **(siehe Abbildung 18)**. Wesentliche Information ist dabei, daß 12h nach Trauma die Gruppe II (31±9%) signifikant niedrigere Zytokinsynthese-Kapazität für TNF-α aufweist als Gruppe I (59±6%). Diese Unterschied bleibt über 48h hinweg (Gruppe II 33±9% vs. Gruppe I 54±8%) bis 72h nach Trauma (Gruppe II 62±11% vs. Gruppe I 80±6%) bestehen. Interessanterweise ist damit die Kapazität in Gruppe I nach 72h signifikant höher als der Wert bei Aufnahme (68±7), wohingegen in Gruppe II die Kapazität weiterhin signifikant gegenüber dem Aufnahmewert (70±4%) reduziert bleibt

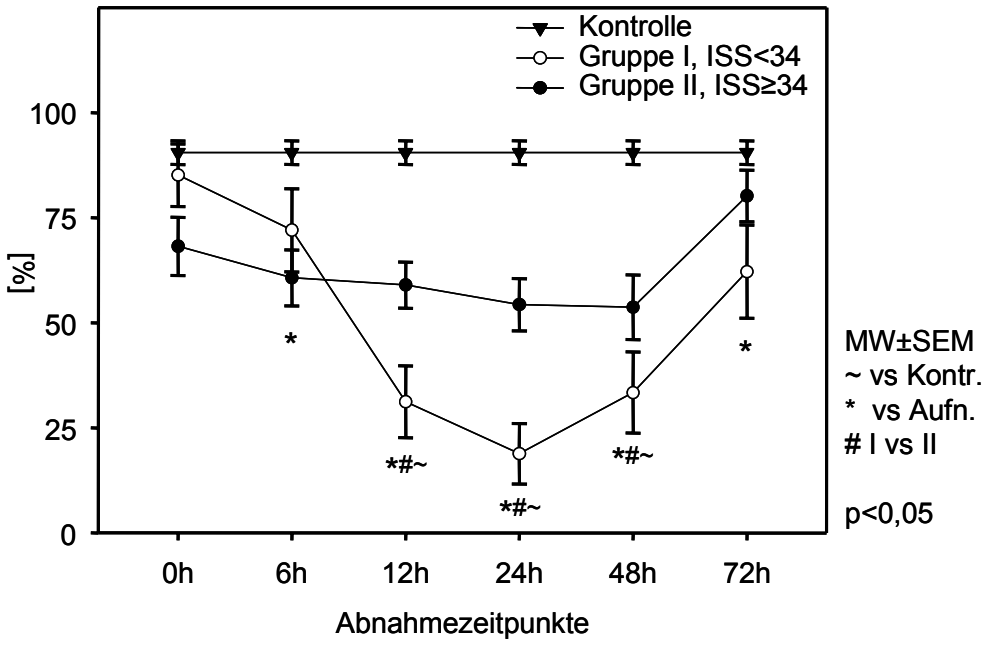

Abbildung 18: Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) aufgeteilt gemäß ISS in 2 Gruppen: Auf der Y-Achse aufgetragen die TNF-α-positiven MØ in [%] der Gesamt-Monozytenpopulation. Auf der X-Achse die Probanden (schwarzes Quadrat, n=8), gefolgt von den Patientengruppen (schwarzer Kreis für Gruppe I mit ISS <34, weißes Dreieck für Gruppe II mit ISS ≥34) zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten. Gruppe II zeigt 12h bis 72h nach Trauma eine signifikant niedrigere Synthese-Kapazität für TNF-α als Gruppe I. Werte als MW±SEM, *=p<0,05

4.2.2.3.2. Interleukin 1β (Il-1β)

Bezüglich der Synthese-Kapazität für Il-1β zeigt sich in der Patientengruppe bereits bei Aufnahme mit 73±6% eine signifikante Abschwächung gegenüber der Kontrollgruppe, diese bleibt über den gesamten Untersuchungszeitraum bestehen. 12h nach Trauma ist die Kapazität mit 53±7% signifikant gegenüber dem Aufnahmewert erniedrigt und nimmt bis 48h nach Trauma kontinuierlich ab.

Erst 72h nach Trauma zeichnet sich mit 62±5% eine leichte Erholung ab **(siehe Abbildung 19)**.

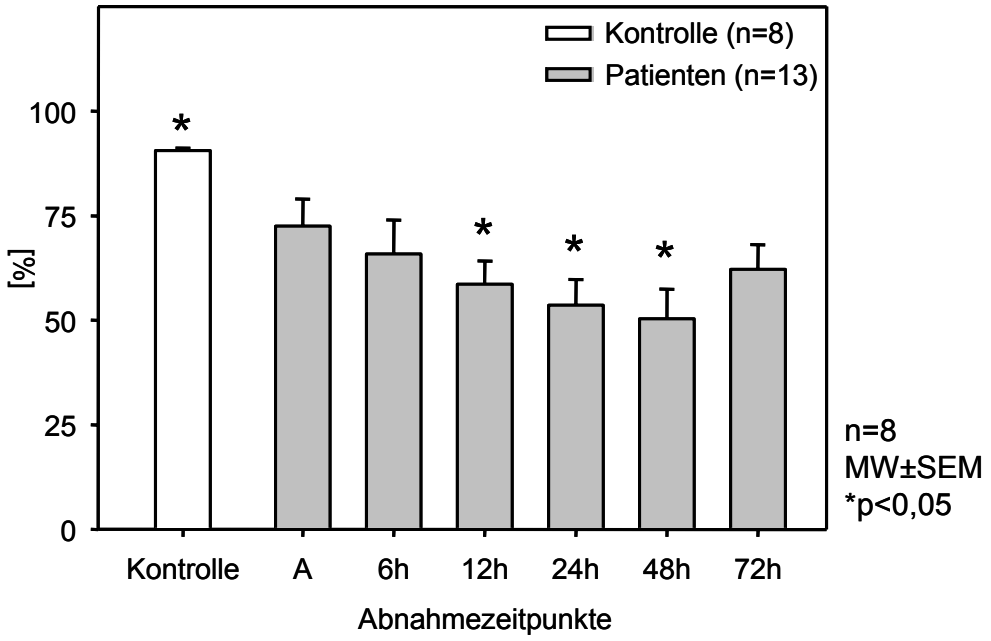

Abbildung 19: Interleukin 1β (Il-1β) stratifiziert über alle 13 Patienten: Auf der Y-Achse aufgetragen die Il-1β-positiven MØ in [%] der Gesamt-Monozytenpopulation. Auf der X-Achse die Probanden (weiß, n=8), gefolgt von der Patientengruppe zu den Abnahmezeitpunkten (n=13). Zwischen 12h und 48h nach Trauma ist die Kapazität signifikant gegenüber dem Aufnahmewert erniedrigt. Werte als MW±SEM, *=p<0,05

Die Aufteilung gemäß der Verletzungsschwere weist darauf hin, daß die Kapazität für Il-1β bereits unmittelbar nach Trauma in Gruppe II mit 68±6% signifikant reduziert ist im Vergleich zur Gruppe I mit 85±6%.

Im restlichen Studienverlauf bleibt die Kapazität für Gruppe II mit 48±6% bis einschließlich 48h nach Trauma signifikant reduziert gegenüber Gruppe I mit 68±3% **(siehe Abbildung 20)**.

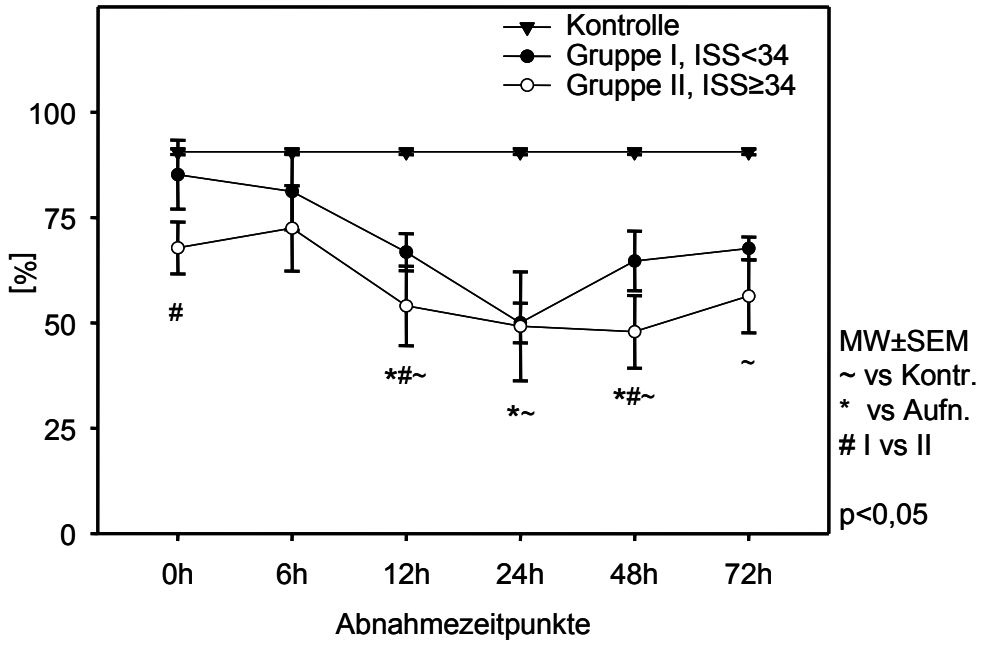

Abbildung 20: Interleukin 1β (Il-1β) aufgeteilt gemäß ISS in 2 Gruppen: Auf der Y-Achse aufgetragen die Il-1β-positiven MØ in [%] der Gesamt-Monozytenpopulation. Auf der X-Achse die Probanden (schwarzes Quadrat, n=8), gefolgt von den Patientengruppen (schwarzer Kreis für Gruppe I mit ISS <34, weißes Dreieck für Gruppe II mit ISS ≥34) zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten. Gruppe II zeigt 12 bis 72h nach Trauma eine signifikant niedrigere Synthese-Kapazität für TNF-α als Gruppe I. Werte als MW±SEM, *=p<0,05

4.2.2.3.3. Interleukin 6 (Il-6)

Die Zytokinsynthese-Kapazität für Il-6 beträgt in der Kontrollgruppe 68±6%, in der Patientengruppe ist die Kapazität erneut über den gesamten Studienzeitraum signifikant niedriger. So beträgt sie bei Aufnahme 58±4% und sinkt bis 24h nach Trauma auf 36±7% ab, womit sie signifikant gegenüber dem Ausgangswert reduziert ist.

Ähnlich dem Verlauf bei TNF-α steigt auch die Kapazität für Il-6 48h nach Trauma mit 39±6% wieder an bis auf 49±6% 72h nach Trauma **(siehe Abbildung 21)**.

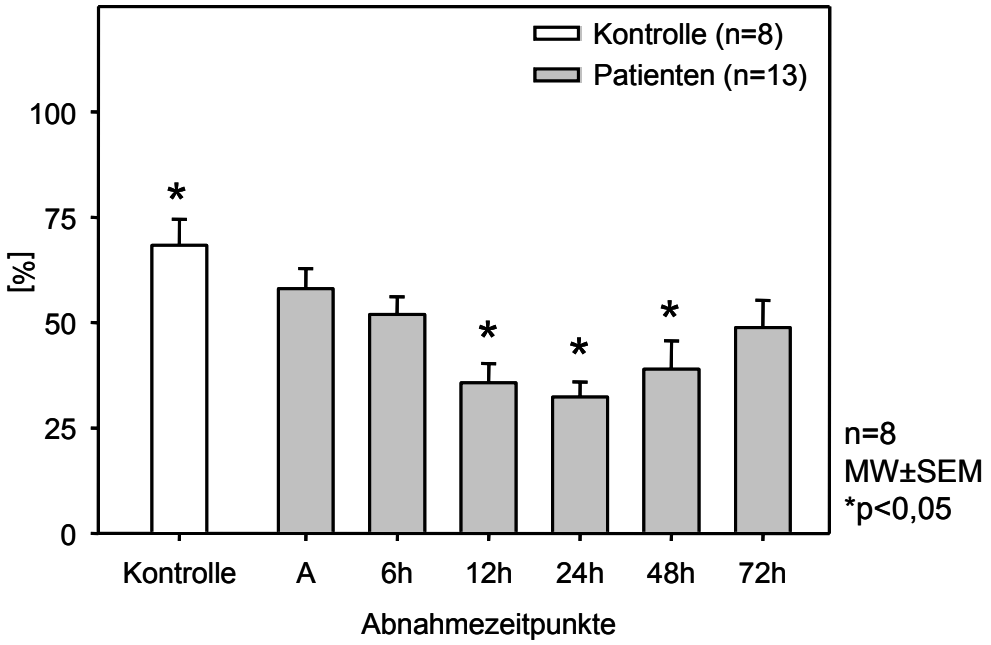

Abbildung 21: Interleukin 6 (Il-6) stratifiziert über alle 13 Patienten: Auf der Y-Achse aufgetragen die Il-6-positiven MØ in [%] der Gesamt-Monozytenpopulation. Auf der X-Achse die Probanden (weiß, n=8), gefolgt von der Patientengruppe zu den Abnahmezeitpunkten (n=13). Zwischen 12h und 48h nach Trauma ist die Kapazität signifikant gegenüber dem Aufnahmewert erniedrigt. Die Patientengruppe weist zu jedem Zeitpunkt signifikant niedrigere Synthese-Kapazitäten als die Kontrollgruppe auf. Werte als MW±SEM, *=p<0,05

Bei Il-6 zeigen sich ähnliche Verhältnisse wie bei der Zytokinsynthese-Kapazität für TNF-α. So zeigt sich erneut eine signifikant niedrigere Synthese-Kapazität in Gruppe II ab 12h nach Trauma mit 32±5% in Vergleich mit der Gruppe I und 43±3%. Das Minimum der Kapazitäten ist in beiden Gruppen 24h nach Trauma erreicht mit 29±6% für Gruppe II und 37±1%. Beide Gruppen zeigen ab 48h einen Anstieg (Gruppe II 37±8% vs. Gruppe I 49±7%) bis 72h hin mit 47±6% bzw. 55±5% **(siehe Abbildung 22)**.

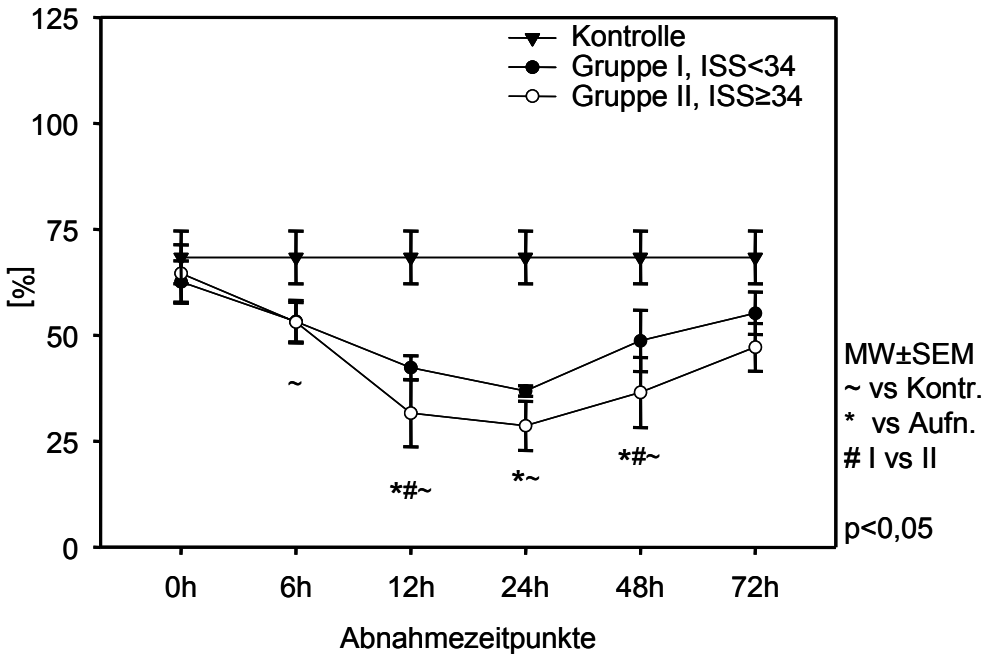

Abbildung 22: Interleukin 6 (Il-6) aufgeteilt gemäß ISS in 2 Gruppen: Auf der Y-Achse aufgetragen die Il-6-positiven MØ in [%] der Gesamt-Monozytenpopulation. Auf der X-Achse die Probanden (schwarzes Quadrat, n=8), gefolgt von den Patientengruppen (schwarzer Kreis für Gruppe I mit ISS <34, weißes Dreieck für Gruppe II mit ISS ≥34) zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten. Es zeigt sich eine signifikant niedrigere Synthese-Kapazität in Gruppe II ab 12h nach Trauma im Vergleich mit der Gruppe I. Werte als MW±SEM, *=p<0,05

4.2.2.3.4. Interleukin 8 (Il-8)

Die Zytokinsynthese-Kapazität für Il-8 zeigt einen ähnlichen Verlauf nach Trauma wie für die bereits beschriebenen Zytokine, so sind die Werte im gesamten Verlauf bis 48h nach Trauma (82±5%) erneut signifikant reduziert im Vergleich mit der Kontrollgruppe mit einem Wert von 98±0,6%. 24h nach Trauma erreicht die Kapazität für Il-8 mit 77±3% ihr Minimum, um bis 72h nach Trauma auf 95±1% wieder anzusteigen **(siehe Abbildung 23)**.

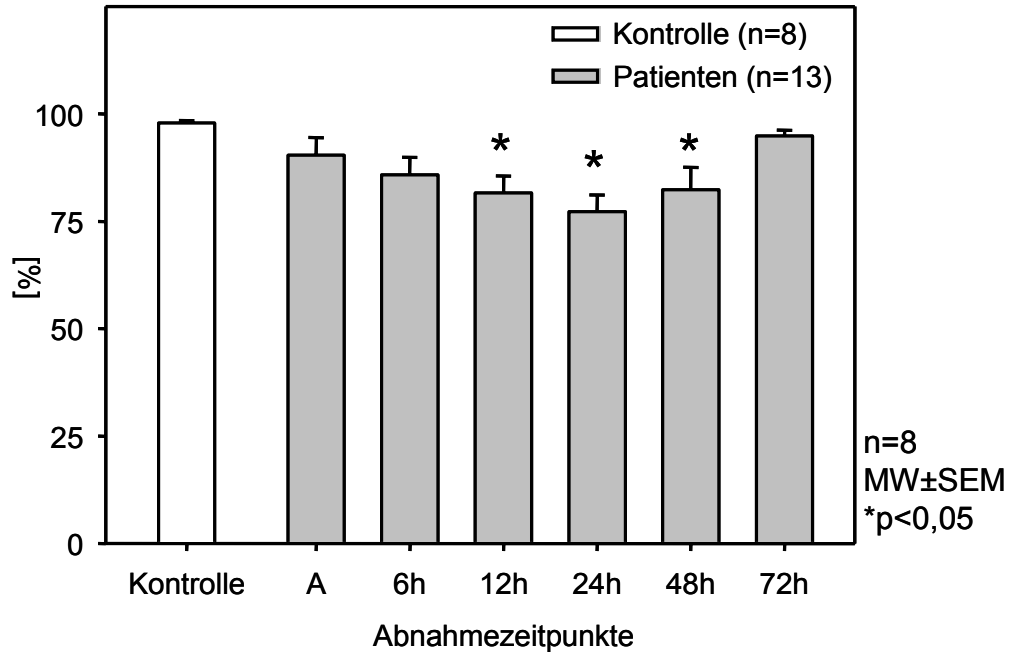

Abbildung 23: Interleukin 8 (Il-8) stratifiziert über alle 13 Patienten: Auf der Y-Achse die Il-8-positiven MØ in [%] der Gesamt-Monozytenpopulation. Auf der X-Achse die Probanden (weiß, n=8), gefolgt von der Patientengruppe zu den Abnahmezeitpunkten (n=13). Die Zytokinsynthese-Kapazität ist im gesamten Verlauf bis 48h nach Trauma signifikant reduziert im Vergleich mit der Kontrolle. Werte als MW±SEM, *=$p<0,05$

Bei Il-8 ist der Unterschied zwischen beiden Gruppen lediglich 24h nach Trauma signifikant ausgeprägt mit 66±8% in Gruppe II vs. 80±6% in Gruppe I **(siehe Abbildung 24)**.

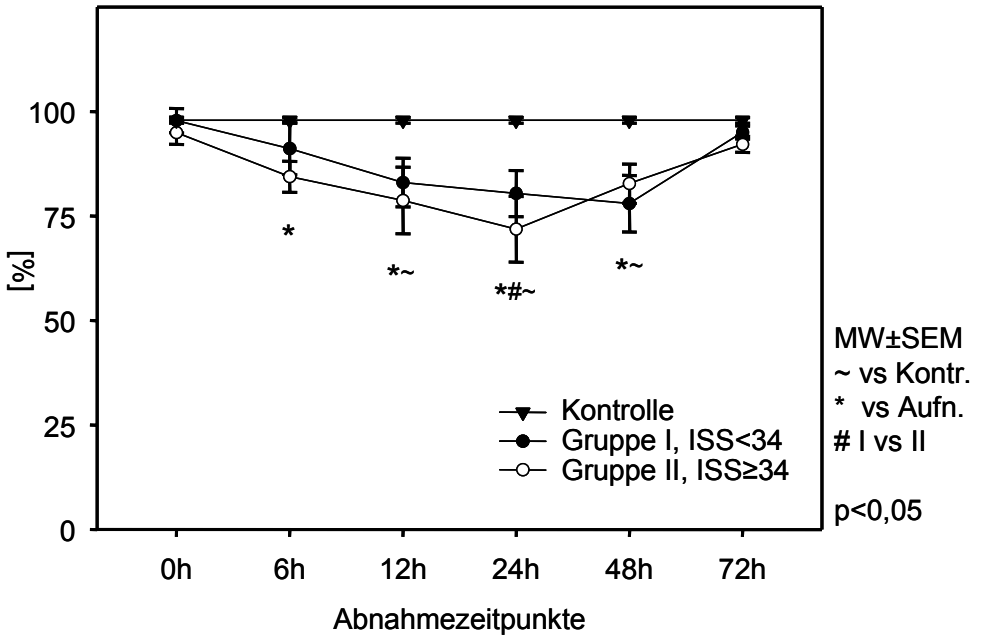

Abbildung 24: Interleukin 8 (Il-8) aufgeteilt gemäß ISS in 2 Gruppen: Auf der Y-Achse die Il-8-positiven MØ in [%]. Auf der X-Achse die Probanden (schwarzes Quadrat, n=8), die Patientengruppen (schwarzer Kreis für Gruppe I mit ISS <34, weißes Dreieck für Gruppe II mit ISS ≥34). Werte als MW±SEM, *=p<0,05

4.2.3. Analyse der systemischen Konzentration mittels ELISA

Um die von uns demonstrierten Daten mit bekannten Ergebnissen der Literatur über posttraumatische Veränderungen systemischer Konzentrationen von Mediatoren vergleichen zu können, wurden einige exemplarische Faktoren aus dem Serum der Patienten, welches entsprechend dem bereits demonstrierten seriellen Zeitschema **(siehe Abbildung 4)** entnommen worden war, bestimmt.

Die systemische Konzentration des proinflammatorisch wirksamen Mediators TNF-α zeigt einen tendenziellen, jedoch erst nach 72h signifikanten Anstieg im Beobachtungszeitraum **(siehe Abbildung 25)**.

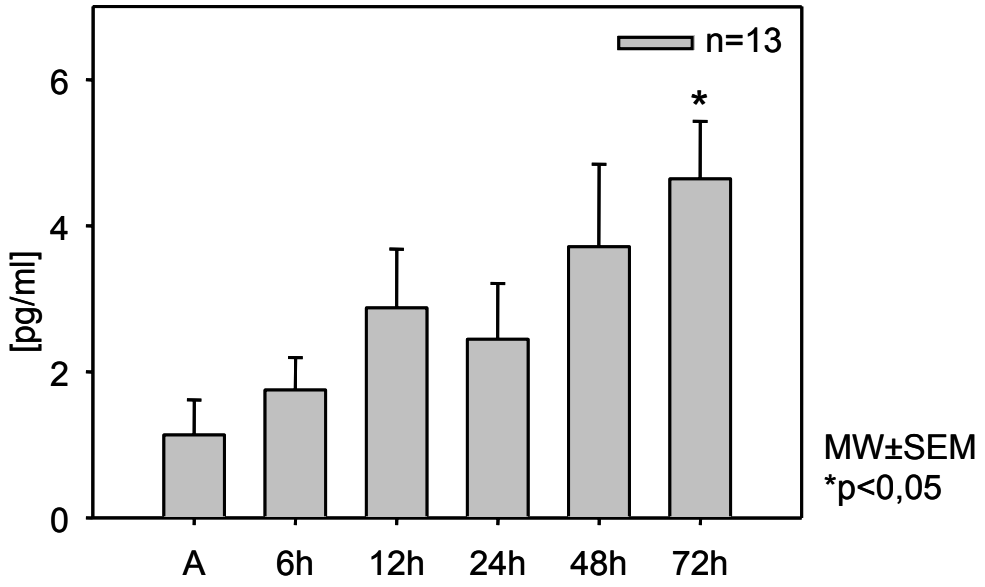

Abbildung 25, TNF-α im Serum polytraumatisierter Patienten: TNF-α in der systemischen Zirkulation. Hier findet sich ein tendenzieller Anstieg über den Beobachtungszeitraum, der 72h nach Trauma signifikant höher im Vergleich zum Aufnahmewert ist (n=13); *=p<0,05

Im Gegensatz dazu weist das Verhalten der Il-6-Konzentration einen biphasischen Verlauf mit Maximalwerten bei 6h und 24h nach dem Unfallgeschehen auf. **(siehe Abbildung 26)**.

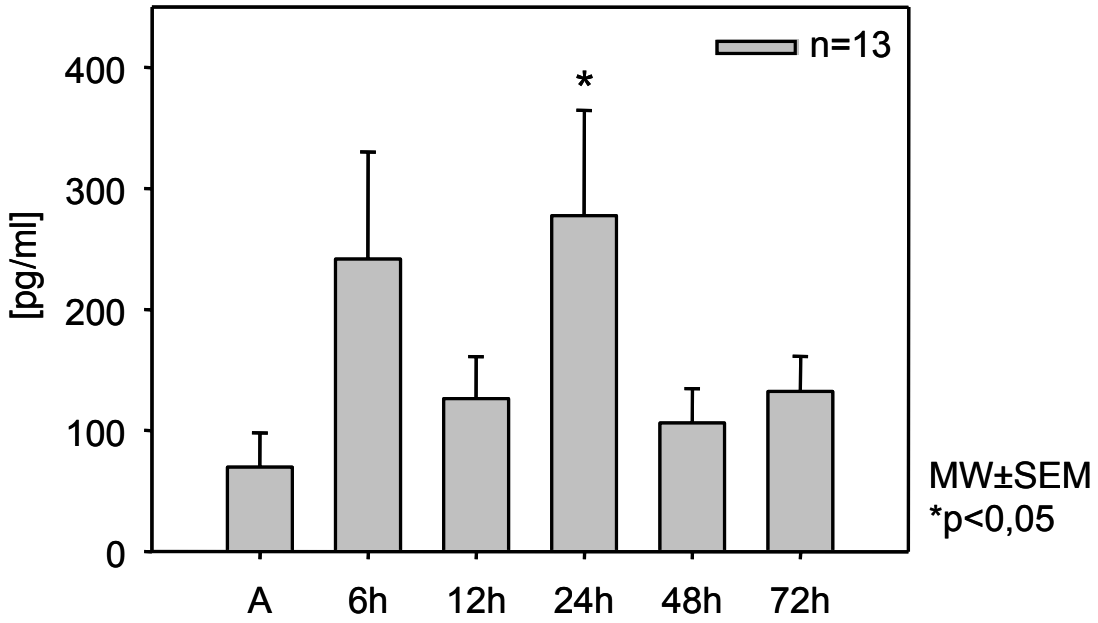

Abbildung 26, Il-6 im Serum polytraumatisierter Patienten: Vergleichbare Ergebnisse finden sich bei der Bestimmung des ebenfalls proinflammatorisch wirksamen Il-6. Es zeigt eine biphasische Dynamik über die Zeit, läßt jedoch lediglich 24h nach Trauma einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Aufnahme erkennen (n=13); *=p<0,05

Letzteres gilt auch für Il-8, dessen systemische Konzentration einen Maximalwert etwa 12h nach Trauma aufweist und im weiteren Beobachtungsverlauf deutlich abfiel **(siehe Abbildung 27)**.

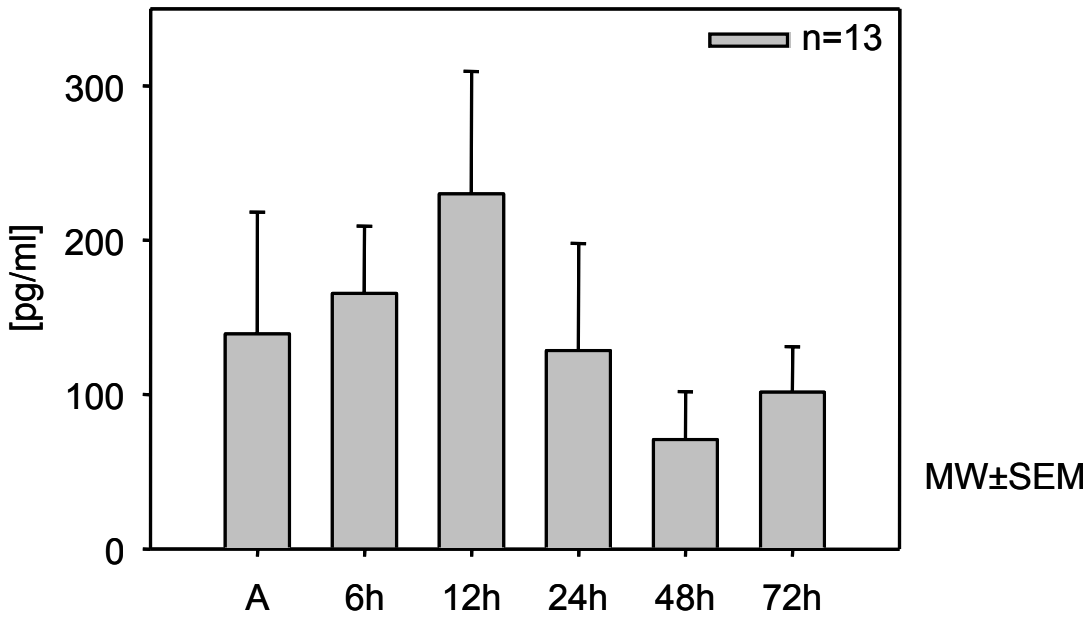

Abbildung 27, Il-8 im Serum polytraumatisierter Patienten: Auch die Bestimmung des antiinflammatorisch wirksamen Il-8 in der systemischen Zirkulation zeigt keine signifikante Veränderung über die Zeit (n=13).

5. Diskussion

Die vorliegende Untersuchung präsentiert erstmalig die Ergebnisse einer sequentiellen Analyse initialer intrazellulärer Aktivierungsmechanismen humaner Immunzellen polytraumatisierter Patienten in der direkten posttraumatischen Phase. Der Fokus der Studie lag dabei auf der *single-cell*-Analyse der monozytären Kapazität zur Synthese essentieller proinflammatorischer Zytokine.

Wie wir zeigen konnten, ist die intrazelluläre Zytokinsynthese-Kapazität der MØ polytraumatisierter Patienten im Zeitraum zwischen 12 und 48 Stunden nach Trauma und somit bis zu 6 Stunden früher als bisher angenommen, signifikant reduziert (20;43;44;109). Patienten mit weniger lebensbedrohlichen Verletzungen (ISS <34 Punkte) erreichen 72 Stunden nach Trauma signifikant höhere Synthese-Kapazitäten für die untersuchten proinflammatorischen Zytokine als Patienten mit schweren Verletzungen (ISS ≥34 Punkte).

Klar ist in diesem Zusammenhang, daß experimentelle Studien dieser Art mit einer Reihe von Limitationen behaftet sind, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

5.1. Stufe I – Validierung des experimentellen Protokolls

Zahlreiche Untersuchungen an humanen Immunzellen, welche von polytraumatisierten Patienten isoliert wurden und anschließend in Kultur mittels LPS stimuliert wurden, haben Hinweise dafür geliefert, daß die Bildung von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren nach Trauma gegenüber Zellen gesunder Probanden reduziert ist (4;20;30;49;110). Nachteilig an diesen Messungen jedoch ist, daß sie anhand von Überständen aus Zellkulturen bestimmt wurden. Diese Technik beinhaltet eine Reihe von potentiellen Fehlerquellen (140;160;204).

So erfolgte in diesen Arbeiten die Bestimmung von Zytokinen aus Kulturüberständen mononukleärer Leukozyten (PBMCs) (4;20;30;49;110). Dies stellt keine adäquate und präzise

Methode zur Quantifizierung der Syntheseleistung einzelner Zell-Subpopulationen dar, da die Gruppe der PBMCs eine sehr heterogene Zusammensetzung aufweist (204). So zählen zur Zellgruppe der Mononukleären die Monozyten ebenso wie T-Lymphozyten, B-Zellen und *Natural-Killer*- (NK-) Zellen. Eine Zuordnung bestimmter immunologischer Mechanismen zu einzelnen Zellgruppen war mit den bisherigen Techniken daher nicht möglich. Des weiteren ist bei Messungen aus Überständen nicht klar, ob die Zelle den Mediator nicht mehr produzieren oder ihn nur einfach nicht mehr freisetzen kann oder ob diese Mediatoren durch simultan freigesetzte lösliche Rezeptoren abgefangen werden (204).

Für das pathophysiologische Verständnis und der daraus erwachsenden Entwicklung potentieller innovativer therapeutischer Strategien ist es aber von substantieller Bedeutung welche Ursache reduzierten Mediatoren-Konzentrationen in Überstandsmessungen zugrunde liegt (14;78;123).

Aus dieser Überlegung heraus wurde von uns in Zusammenarbeit mit der Gruppe um *Herrn Prof. Faist, Klinikum Großhadern*, erstmals die von *S. Zedler* geprägte *single cell detection* von Mediatoren mittels Durchflußzytometrie an Monozyten polytraumatisierter Patienten in der direkten posttraumatischen Phase zur Anwendung gebracht (204). Diese Technik weist eine Reihe von methodischen Besonderheiten auf, die im Weiteren diskutiert werden sollen.

5.1.1. Stimuli

Um die Zytokinsynthese-Kapazität von Zellen zu untersuchen ist eine Zellstimulation über eine bestimmte Zeitperiode erforderlich, da unter physiologischen Bedingungen intrazellulär kaum präformiertes Zytokin vorliegt (27). Bisherige Arbeiten konnten demonstrieren, daß es möglich ist die Zytokinsynthese von mononukleären Leukozyten sowohl auf nicht-spezifische als auch Antigen-gesteuerte, somit spezifische Weise in Zellkulturen zu messen (188).

Allerdings beschreiben die meisten dieser Studien die Zytokinsynthese von Lymphozyten und viel seltener die von Monozyten (77;105). Entsprechend gibt es wenig Information über die optimalen Stimulationsbedingungen für die Analyse der Zytokinsynthese-Kapazität durch Monozyten, abgesehen von einer aktuellen Arbeit von *Willmann et al.* (199).

In der vorliegenden Arbeit wurde systematisch die Auswirkung drei verschiedener Stimuli auf die Synthese-Kapazität von Monozyten analysiert. Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Verwendung von LPS den potentesten Stimulus für die Zytokinsynthese, darstellt. Diese Ergebnisse werden durch aktuelle Studien unterstützt, so konnten *Bueno et al.* kürzlich ebenfalls zeigen, daß LPS den potentesten Stimulus für die Messung der Zytokinsynthese-Kapazität repräsentiert (27). Im Gegensatz zu unserer Studie wiesen *Bueno et al.* jedoch einen signifikanten Vorteil durch Zusatz für IFN-γ für den Nachweis der Il-6-Synthese nach. Wir konnten in der aktuellen Studie keine signifikante Überlegenheit eines einzelnen Stimulus hinsichtlich der Zytokinsynthese-Kapazität nachweisen und entschieden uns auf Grund der niedrigeren Toxizität letztlich für LPS als Monostimulus. Dies wird durch eine Studie von *Lore et al.* unterstützt, die sowohl die Zytokinsynthese-Kapazität von dendritischen Zellen als auch von Monozyten untersuchte und ebenfalls lediglich eine geringere Toxizität von LPS als Monostimulus zeigen konnte (105).

Einschränkend muß allerdings angemerkt werden, daß obgleich die erwähnten Studien zeigten (105;188), daß die verwendeten Konzentrationen optimal gewählt sind, um eine Sekretion inflammatorischer Zytokine in mononukleären Zellen zu induzieren, eine feststehende Dosis für die einzelnen Stimuli in unserer Studie (LPS 100 ng/ml, LPS 100 ng/ml + IFN-γ 100 U/ml, SAC 75 mg/ml) verwendet wurde.

5.1.2. Sekretionsblockade

Um die Zytokinsynthese-Kapazität von Monozyten nachweisen zu können, ist neben der Stimulation die Inhibition der Sekretion erforderlich (41). Die hierfür beschriebenen Reagenzien sind Monensin und Brefeldin A. Dabei ist Monensin ein monovalenter Ionen-selektiver Ionophor, der den trans-Golgi Transport von Proteinen verhindert, indem er den Na^{++}/H^{+} Transporter auf der Golgimembran blockiert (122). Brefeldin A leitet intrazellulär synthetisiertes Protein von der cis-Seite des Golgi-Komplexes zum endoplasmatischen Retikulum zurück, blockiert so einen weiteren Transport der Proteine zur trans-Seite und verhindert damit die Sekretion des überwiegenden Anteils an Zytokinen (87;134). Bezüglich der Pharmakokinetik und Effizienz dieser beiden Sekretionsblocker liegen erheblich kontroverse Daten in der Literatur vor, so daß ein zweites Teilziel der quantitative Vergleich von Monensin und Brefeldin hinsichtlich des Effektes auf die Zytokinsynthese-Kapazität war. Im **Teil I** der vorliegenden Studie wurde daher die Effizienz beider Reagenzien bezüglich der Inhibition der Zytokinsekretion an Monozyten gesunder Kontrollprobanden verglichen. Monensin, bzw. Brefeldin A wurden dabei in den, von *Collins* und *de Clerk* beschriebenen nicht zytotoxischen Konzentrationen eingesetzt (32;166). Wir konnten für TNF-α und Il-1β keinen signifikanten Unterschied zwischen Monensin und Brefeldin A feststellen. *Schuerwegh et al.*, die ebenfalls systematisch die Effizienz beider Reagenzien hinsichtlich der Sekretionsblockade untersuchten, zeigten interessanterweise, daß Brefeldin A der effektivere Blocker für die Synthese von Il-1β und TNF-α ist(165;166). Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Studien ist jedoch die Stimulationszeit, während *Schuerwegh et al.* die Monozyten über 8h stimulierten und deutlich niedrigere Zellzahlen auf Grund der Toxizität des LPS erhielten, wurden die Monozyten in unserer Studie über 4h stimuliert. In der somit kürzeren Inkubationszeit mag der Grund liegen, daß wir für Brefeldin A keinen signifikanten Vorteil für die Sekretionsblockade von Il-1β und TNF-α nachweisen konnten. Vielmehr

konnten wir zeigen, daß unter Monensin sowohl die Kapazität für Il-6 als auch für Il-8 signifikant höher ist.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, daß unter Inkubation mit Brefeldin A der Austausch zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat intakt bleibt, somit die Sekretion von Zytokinen aus der Zelle heraus noch zu einem geringen Prozentsatz möglich bleibt. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation mit Monensin zu einer kompletten Blockade des Golgi-Apparates (87;131).

Zusammenfassend war somit für unsere Frage nach der Synthese der Zytokine TNF-α, Il-1β, Il-6 und Il-8 Monensin der adäquate Sekretionsblocker.

5.1.3. Inkubationszeit

Bekannt ist, daß MØ auf externe Stimuli mit distinkter Verzögerung beginnen inflammatorische Zytokine zu synthetisieren, bzw. lang andauernde Exposition mit potentiellen Zellgiften wie z.B. LPS toxisch auf Zellen in Kultur wirken kann. So liegen bezüglich des Ansprechens der MØ auf unterschiedliche Dauer der Stimulation teils kontroverse Daten vor (27;64;180). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, daß die sich durch 4stündige Inkubation der höchste Prozentsatz an Zytokin-positiven Zellen nachweisen läßt. Zudem konnten wir zeigen daß mit zunehmender Inkubationsdauer die Gesamtanzahl der Monozyten signifikant abnimmt. *Bueno et al.* zeigten in einer systematischen Studie zur Inkubationszeit ähnliche Beobachtungen. So beschreiben aus sie eine Inkubation über 4h als optimale Periode und konnten ebenfalls eine deutliche Abnahme der Gesamt-Zellzahlen bei Stimulation länger als 4h nachweisen (27). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen sehen *Lore et al.* einen signifikanten Vorteil in der Stimulation über 6h, wobei

die Autoren ihren Hauptfokus jedoch auf die Untersuchung der dendritischen Zellen legten (105).

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, daß unter experimentellen *ex vivo* Bedingungen eine maximale Produktion inflammatorischer Zytokine humaner Monozyten erzielt werden kann, sobald diese Zellen 4 Stunden mit LPS in Anwesenheit von Monensin stimuliert wurden.

5.2. Stufe II - Klinisch-experimenteller Abschnitt

5.2.1. Patienten und Kontrollkollektiv

Es wurden nur Patienten eingeschlossen, die von einem stumpfen Polytrauma betroffen waren und in unseren Schockraum spätestens 90min nach Trauma eingeliefert wurden. Die Verteilung von epidemiologischen Daten und insbesondere auch die Geschlechterverteilung von 2:1 für Männlich:Weiblich entspricht dabei dem bekannten Kollektiv von Trauma-Patienten in Mitteleuropa (198). So waren in einer Studie von *Rutledge et al.* bei 7.276 polytraumatisierten Patienten Männer mit 63% vertreten (155), in unserer Studie betrug der Anteil der männlichen Patienten 69%.

Bezüglich des Verletzungsmechanismus und -musters finden sich ebenfalls ähnliche Daten in der europäischen Literatur, so daß das von uns eingeschlossene Kollektiv als repräsentativ angesehen werden kann (146). Im Vergleich hierzu weisen Kollektive aus dem nordamerikanischen Raum wesentlich mehr penetrierende Verletzungen auf (45;157)

Die Dokumentation der präklinischen und klinischen Daten erfolgte entsprechend den Richtlinien der *Europäischen Konsensuskonferenz zur Aufnahme von Daten polytraumatisierter Patienten* (153).

Die Schweregrad-Einteilung des Polytraumas erfolgte gemäß dem *Injury Severity Score* (ISS) nach *Greenspan* (61) in seiner Modifikation nach *Lefering et al.* (98): Zur Klassifikation der Trauma-Schwere wird hierbei der Körper in sechs Regionen eingeteilt (Oberfläche, Kopf und Gesicht, Hals, Thorax, Abdomen und Becken, Wirbelsäule und Extremitäten), die jeweils in ihrem Verletzungsschweregrad auf einer Skala zwischen 1 (unwesentliche Verletzungen) und 5 (maximal kritische Verletzung mit unsicherer Überlebenswahrscheinlichkeit) bewertet werden. Der ISS wird definiert als die Summe der Quadrate der drei schwersten Verletzungen. Er stellt eine etablierte und seit vielen Jahren anerkannte Möglichkeit zur Klassifikation der Trauma-Schwere dar und erlaubt eine Aussage über voraussichtliche Morbidität und Mortalität (12;132;176).

Der Großteil von klinischen Parametern, welche alternativ herangezogen werden könnten, hat kontinuierliche Datenqualität (quantitative Ergebnisse von Messungen physiologischer Parameter, wie z.B. Blutdruck, arterielle Sauerstoffspannung etc.). Um eine Unterteilung in klinisch relevante Gruppen vorzunehmen, werden diese quantitativen kontinuierlichen Daten anhand von *Score*-Systemen gruppiert, wie beispielsweise dem MOF-Score (63). Überschreitet die Summe der Punkte dabei einen bestimmten Wert, erfolgt die entsprechende Einteilung in eine klinische Gruppe (z.B. MOF<4 Punkte: es liegt kein relevantes Multiorganversagen vor, MOF≥4 Punkte: relevantes Multi-Organversagen liegt vor). Diese Transformation von zunächst kontinuierlichen in dichotome Daten birgt ebenfalls ein erhebliches Potential an zufälligen Fehlerquellen (193). So unterliegen physiologische Parameter häufig einer erheblichen Schwankung, wie der arterielle Blutdruck unter Katecholamin-Therapie. Der Zeitpunkt der Dokumentation wird damit zu einem wesentlichen Faktor und erhöht den möglichen systematischen Fehler weiter (153). Daher wählten wir in der vorliegenden Untersuchung den initial erhebbaren Parameter *Injury Severity Score* (ISS) als eindeutige Variable zur Klassifikation von Patienten.

Durch das Einschlußkriterium des hohen ISS (≥16) wurde ein Patientenkollektiv analysiert, welches aufgrund seiner hohen Inzidenz für ein MOF (>25%) ein relevantes Problem in der Polytraumaversorgung darstellt (194;195). So konnten *Ertel et al.* an einem retrospektiv analysierten Kollektiv von 1278 polytraumatisierten Patienten zeigen, daß bei Patienten mit einem hohen ISS die Inzidenz eines *SIRS* bis zu 80% beträgt und daß bei diesen Patienten die Inzidenz eines *MODS* mit bis zu 85% direkt mit dem ISS korreliert, wohingegen Patienten mit einem niedrigen ISS nur eine Inzidenz eines *MODS* von 5% zeigten (45).

Zur Unterteilung unseres Patientenkollektivs in zwei relevante Gruppen wurde ein zweiter C*utoff* von ISS =34 Punkten basierend auf den Vorarbeiten von *Laird et al.*, *Rutledge et al.* und *Schinkel et al.* gewählt, die in ihren Arbeiten zeigen konnten, daß die Wahrscheinlichkeit zu Überleben ab einem ISS ≥34 Punkten überproportional sinkt (96;154;155).

5.2.2. Probengewinnung

Das Studiendesign der möglichst frühen Gewinnung von Proben ergibt sich aus den Erkenntnissen vorangegangener Studien zur posttraumatischen Dysfunktion humaner Immunzellen des unspezifischen Immunsystems (23;26;47). Diese Arbeiten haben klar aufgezeigt, daß der initialen posttraumatischen Phase größte Bedeutung für die Ausbildung und Ausprägung von Organfunktionsstörungen zukommt. So konnten *Botha et al.* an polytraumatisierten Patienten zeigen, daß es bereits innerhalb der ersten 6h nach Trauma zu einer signifikanter Aktivierung von neutrophilen Granulozyten kommt (26). In Anlehnung an diese Arbeiten wählten wir die Zeitpunkte für die Blutentnahmen. Hierzu wurden in unserer Studie Proben bei Aufnahme der Patienten in den Schockraum, sowie 6h, 12h, 24h, 48h und 72h standardisiert nach dem Unfallereignis gewonnen **(siehe Abbildung 4)**.

Auch wenn mit diesem eng bemessenen Zeitraster die komplexen Phasen der immunologischen Antwort nach Trauma nicht komplett abzubilden sind, erfordert die Durchführung einer klinischen Studie an Patienten die Berücksichtigung der primären Verpflichtung, dem Patienten keinen zusätzlichen Schaden zuzufügen (97). Da der Verlust von Blut gerade in diesem Patientenkollektiv eine der zentralen Bedrohungen für den weiteren Verlauf der Patienten darstellt, muß jedes Studiendesign dieser Tatsache Rechnung tragen und so wenige Blutproben als möglich vorsehen. Das Intervall von 6h in der Initialphase stellt somit einen Kompromiss dar, der von einer Reihe anderer Autoren, die sich mit der frühen posttraumatischen Immunfolgereaktion auf Trauma beschäftigen, geteilt wird (9;25;49;161).

Trotz dieser Limitationen stellt die vorliegende Arbeit die erstmalige Untersuchung der ultra-frühen, posttraumatischen Phase dar und die Probengewinnung innerhalb von 90min nach Trauma ist logistische Herausforderung.

Ein kritischer Punkt der vorliegenden Untersuchung stellt die Applikation von Blutprodukten dar. Im Anschluß an diese therapeutisch notwendige Maßnahme wäre es theoretisch denkbar, daß die in der systemischen Zirkulation des Patienten befindlichen und von uns analysierten MØ teilweise aus dem Immunzellenpool der Blutspender stammen könnten. Die verwendeten Standard Erythrozyten Konzentrate sind Leukozyten filtriert, aber aus logistischen Gründen nicht bestrahlt und enthalten damit eine Rest-Population von Leukozyten zwischen 0,5 und $0{,}7x10^6$/Konzentrat (144). Dies entspricht bei einem mittleren Volumen von 300ml pro Konserve einer Konzentration von ca. 1,6 Zellen/µl. Davon stellen MØ ca. 10% (0,16/µl). Bei einer normalen Leukozytenverteilung im menschlichen Blut des Opfers von 5.000/µl finden sich bei ebenfalls 10% MØ im Differentialblutbild dann ca. 500/µl. Die theoretische zugeführte Menge an fremden Zellen liegt damit bei ca. 0,2% der zirkulierenden MØ. Daher kann diese Fehlerquelle weitgehend vernachlässigt werden (17).

5.2.3. Durchflußzytometrische Analyse

5.2.3.1. Charakteristika der CD14+ Monozyten

Bei CD14 handelt es sich um ein myeloides Markerantigen. Das vollentwickelte/reife Protein wird auf der Zelloberfläche myleoider Zellen exprimiert, wodurch das Protein in der Membran verankert wird. CD14 kann auch in freier Form im Plasma nachgewiesen werden, dieses lösliche CD14 vermittelt die LPS-Aktivierung CD14-negativer Zellen, wie z.B. von Endothel- und Epithelzellen (186). Sowohl auf biochemischer als auch auf genetischer Ebene konnte die Rolle von CD14 bezüglich der LPS-Aktivierung von Monozyten und Makrophagen bewiesen werden (64;201). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, daß eine Überexprimierung humanen CD14 bei transgenen Mäusen zu einer Hypersensitvität gegenüber LPS führt. Im Gegensatz dazu erweisen sich Mäuse mit defizitärem CD14 hyporeaktiv gegen LPS und sind 10-fach weniger empfindlich gegen LPS im Vergleich zu normalen Mäusen (197). LPS ist der Hauptbestandteil der Außenmembran gramnegativer Bakterien. Monozyten modulieren die unspezifische Immunantwort auf LPS, indem sie eine Vielzahl an inflammatorischen Zytokinen exprimieren (64;158). Sowohl LPS als auch LPS-enthaltende Partikel, intakte Bakterien eingeschlossen, bilden Komplexe mit einem Plasmaprotein, dem *LPS-binding-Protein* (LPB). Beim Menschen ist LPB im Plasma in Dosen von 3±10mg/ml vorhanden, allerdings steigt der Plasmaspiegel nach einer Akutphase-Antwort signifikant an (180).

Um auszuschließen, daß die Zytokinsynthese-Kapazitäten in der vorliegenden Studie nicht durch eine veränderte Anzahl von CD14- bzw. LPS-Oberflächen-Rezeptoren beeinflußt werden, quantifizierten wir deren Zahl, ausgedrückt in *mean fluorescence intensity* (MFI). Wie aus **Tabelle 6** ersichtlich, ließ sich über den Studienzeitraum der initialen 72h nach Trauma keine signifikante *up*- bzw. *down*-Regulation der CD14-Rezeptoren beobachten.

Andere Autoren untersuchten im Rahmen von MØ-Studien zusätzlich die Expression des *major histocompatibility class II* (MHC II) Antigens oder MØ Subpopulationsmarker, wie das CD16 oder CD64 Fc Rezeptor (22;171). Da die technischen Limitationen der durchflußzytometrischen Analyse nur eine begrenzte Anzahl gleichzeitig analysierter Faktoren zuläßt, waren wir gezwungen, uns auf die beschriebenen Mediatoren zu beschränken. Weiter war unserer Untersuchung auf den funktionellen Status der MØ und nicht auf deren immunologische Reagibilität i.S. einer Verbindung zum spezifischen Immunsystem (HLA-DR) angelegt.

5.2.3.2. Tumornekrosefaktor-α (TNF-α)

In vielen Untersuchungen wird die Freisetzung von TNF-α aus Vollblutproben nach *in-vitro*-LPS-Stimulation als Marker der Immundysfunktion beschrieben (111;147;173). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte auf *single-cell*-Ebene eine signifikante Reduktion der monozytären Kapazität zur Synthese von TNF-α im Zeitraum zwischen 12h und 48h nach Trauma gezeigt.

In einer Studie von *Flach et al.* wurde auch für die posttraumatische Sepsis eine ähnliche Beobachtung gemacht (110). So zeigten Patienten, die früh nach Trauma eine geringere Suppression der TNF-α-, Il-6- und v.a. Il-8-Synthesefähigkeit hatten, später eine höhere Sepsisinzidenz als Patienten mit einer stärkeren Suppression der Zytokinsynthese-Kapazität, wobei die Unterschiede in der eigentlichen septischen Phase nicht mehr vorhanden waren. Es gibt jedoch auch Studien mit nicht genauer definierten Intensivpatienten, welche komplett gegensätzlich Beobachtungen gemacht haben (69). Hier wurden bei den Patienten mit der niedrigsten *ex-vivo*-TNF-α-Synthese aus LPS-stimuliertem Vollblut die höchste Rate an Infektion und die längste Intensivaufenthaltsdauer festgestellt. Ebenso wurde bei Patienten

mit Sepsis eine Reduktion der LPS-stimulierten TNF-α-Expression von mononukleären Zellen septischer Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden (70).

5.2.3.3. Interleukin-1β (Il-1β)

Zahlreiche Studien der jüngsten Literatur konnten eindeutig die zentrale Rolle von Interleukin-1β belegen, so konnten *Miethke et al.* im Tierexperiment zeigen, daß die Injektion von Il-1 zur Induktion eines SIRS führt (119).

In der vorliegenden Studie konnten wir demonstrieren, daß die monozytäre Kapazität zur Il-1β-Synthese ähnlich der für TNF-α im Zeitraum zwischen 12h und 48h nach Trauma signifikant reduziert ist. Des Weiteren konnten wir zeigen, daß Monozyten von Patienten mit schweren Verletzungen eine signifikant reduzierte Synthese-Kapazität für Il-1β haben im Vergleich zu Monozyten weniger stark Verletzter.

Diese Daten sind mit einer Studie von *Holzmann et al.* zu vergleichen, die bei Sepsispatienten einen signifikanten Unterschied bezüglich der monozytären Il-1β-Synthese zwischen Überlebern und Versterbern feststellen konnten. So zeigten überlebende Patienten eine Erholung der Synthese-Kapazität im Gegensatz zu Versterbern (76). Auch *Kremer et al.* konnten in Serumüberständen von Sepsis-Patienten eine Suppression der IL-1β-Spiegel bei Patienten mit MOF demonstrieren (90).

Bei Patienten mit isoliertem schwerem Schädel-Hirn-Trauma scheint der Anstieg von Il-1β in der systemischen Zirkulation direkt mit dem Ausmaß der neuronalen Degeneration zu korrelieren (83). Dennoch konnten in der überwiegenden Mehrzahl der Studien an Trauma-Patienten bisher weder für systemische noch für lokale Il-1β-Konzentrationen signifikante Assoziationen mit Operationstrauma oder klinischem Verlauf hergestellt werden (56;72;94). Diese Ergebnisse stehen zwar im Gegensatz zu den, von uns beschriebenen Daten, sind aber

im Wesentlichen durch die kurzen Halbwertszeiten des Il-1β (6min) zu erklären. Durch die kurzen Halbwertszeiten wird der Nachweis dieses primären Zytokins deutlich unwahrscheinlicher als beim Il-6 (11;21;38). Diese Überlegungen werden durch die Ergebnisse einer Studie unterstützt, die mit sehr engmaschigen perioperativen Probeentnahmen einen sehr frühen und kurzen Il-1β-Anstieg nach einem chirurgischen Eingriff nachweisen konnte (11).

In Synopsis unterstreichen unsere Daten zur Il-β-Synthese am deutlichsten die Überlegenheit der angewendeten Methode zur Analyse der Zytokinsynthese-Kapazität auf *single-cell*-Niveau.

5.2.3.4. Interleukin-6 (Il-6)

In der hier dargestellten Untersuchung konnten mittels ELISA zwar erhöhte Il-6-Werte im Serum früh nach Trauma beobachtet werden, es zeigten sich jedoch bei insgesamt großer Streuung der Einzelwerte keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne MOF.

Die Ergebnisse der Zytokinsynthese-Kapazität erscheinen in diesem Kontext zunächst widersprüchlich, konnten wir doch nachweisen, daß bei Patienten nach Polytrauma Monozyten zwischen 12 und 48 Stunden eine signifikant reduzierte Kapazität Il-6 zu synthetisieren aufweisen. Vielmehr noch konnten wir zeigen, daß Monozyten von Patienten mit einem höheren Verletzungsgrad im Vergleich zu weniger stark Verletzten eine noch weiter reduzierte Synthese-Kapazität besitzen.

Jedoch konnten ähnliche Beobachtungen von *McCall et al.* bei der Untersuchung von Sepsis-Patienten gemacht werden (125). So besitzen LPS-stimulierte neutrophile Granulozyten von Sepsis-Patienten ebenfalls eine signifikant reduzierte Kapazität zur Synthese von Il-6. Diese

Anergie von Neutrophilen in der Sepsis wurde von verschiedenen Autoren mit dem Phänomen der Endotoxin-Toleranz beschrieben (167;202). So konnte auch bei gesunden Probanden nach intravenöser Injektion von LPS im weiteren Verlauf eine signifikant reduzierte Synthese-Kapazität von Neutrophilen gezeigt werden (167). Auch wenn aus technischen Gründen ein regelmäßiges Endotoxin-Screening bei unseren Patienten nicht möglich war, so ist aus der Literatur bekannt, daß bei Polytrauma-Patienten Endotoxinämien in der Regel mit einer Latenz von 4 bis 7 Tagen auftreten (30;78). Eine Ausnahme bilden Patienten mit ausgedehnten abdominellen Verletzungen wie z.B. Darmperforationen (26). Hinsichtlich des Verletzungsmusters konnten wir jedoch keine Unterschiede zwischen unseren beiden Gruppen sehen, auch gab es keinen Patienten mit Darmkontusion oder –perforation. Zahlreiche Studien belegen, daß es im Rahmen eines Polytraumas eine signifikante Assoziation zwischen früh nach einem Trauma erhöhten Il-6-Plasmakonzentrationen und einer hohen Verletzungsschwere gibt (55;113;136). Dabei blieben die Plasmakonzentrationen dieses Zytokins bei Patienten mit einer hohen Verletzungsschwere für mehr als 5 Tage signifikant erhöht (136). *Seekamp et al.* wiesen für Il-6 nach, daß polytraumatisierte Patienten, die im klinischen Verlauf ein MODS entwickelten, schon sehr früh nach dem Trauma signifikant höhere Plasmaspiegel aufwiesen als Patienten mit einem komplikationslosen Verlauf (168).

Auch ein sekundärer Anstieg der systemischen Il-6-Spiegel konnte bei polytraumatisierten Patienten mit einem bereits bestehenden MODS mit einem schlechten Outcome dieser Patienten korreliert werden (179). Bei einer signifikanten Lungenschädigung und einem hiermit assoziierten ARDS waren erhöhte Il-6-Plasmakonzentrationen mit einer erhöhten Morbidität (vermehrte Anzahl der Beatmungstage) und Mortalität assoziiert (137). *Martin et al.* berichteten, daß initial erhöhte Il-6-Plasmakonzentrationen bei polytraumatisierten Patienten ebenso mit einem signifikant erhöhten Risiko einhergehen, im klinischen Verlauf

eine Infektion zu entwickeln (113). Übereinstimmend gilt Il-6 nach den Ergebnissen verschiedener Studien auch als einer der potentesten prädiktiven Mediatoren, um das Outcome des septischen Patienten zu beurteilen (66;113;117;130).

5.2.3.5. Interleukin-8 (Il-8)

Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, daß nicht nur erhöhte Il-6-Konzentrationen sondern auch hohe systemische Il-8-Spiegel im frühen posttraumatischen Verlauf neben der Einschätzung der Verletzungsschwere auch einen Prädiktor für posttraumatische Komplikationen (MODS, ARDS, Tod) darstellen könnten (57;75;89). Bereits innerhalb der ersten Stunde nach Trauma können anhand der systemischen Il-8-Spiegel überlebende Patienten von denjenigen unterschieden werden, die im weiteren klinischen Verlauf verstarben (100). Diesen Resultaten sind die Ergebnisse der aktuellen Studie gegenüberzustellen, in der gezeigt wurde daß analog zu den übrigen analysierten proinflammatorischen Zytokinen auch die Synthese-Kapazität für Il-8 zwischen 12h und 48h eine signifikante Reduktion aufweist. In tierexperimentellen Studien konnte jedoch auch gezeigt werden, daß die Synthese-Kapazität für Il-8 im Rahmen eines ARDS signifikant reduziert ist (95).

5.2.4. Serumanalyse mittels ELISA

Um die von uns erhobenen Daten mit den Ergebnissen der Literatur vergleichen zu können, wurden in den gleichzeitig entnommenen Serumproben die Konzentrationen verschiedener proinflammatorischer Mediatoren bestimmt. Dabei fand sich zwar eine tendenzielle Bewegung der einzelnen Faktoren, welche jedoch nicht signifikant war. Diese Daten decken sich mit Arbeiten, die anhand größerer Kollektive eine Abschätzung der Prognose einzelner Patienten anhand der systemischen Konzentration von Mediatoren versucht haben (84;110).

So beschreiben *Nast-Kolb et al.* 72h nach Trauma signifikant niedrigere Konzentrationen von Il-6 und Il-8 in der systemischen Zirkulation von polytraumatisierten Patienten, welche im MOF verstarben gegenüber solchen, die kein MOF entwickelten (130). Wie bereits von anderen Autoren gezeigt, ist die Bestimmung von Il-1β aus der systemischen Zirkulation nicht sinnvoll möglich (112), daher wurden nur die Faktoren TNF-α, Il-6 und Il-8 bestimmt.

5.3. Relevanz für die Klinik

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, daß die inflammatorische Immunantwort nach Polytrauma und die durch sekundäre Operationen verursachte Entzündungsreaktion additiv wirken können und mit der Entwicklung von Komplikationen assoziiert sind (135;195). Dabei scheint das Ausmaß des Operationstraumas einen entscheidenden Faktor darzustellen. Sekundäre Operationen im Bereich verschiedener Körperregionen können dabei zu signifikant unterschiedlichen Immunreaktionen führen (Becken> Oberschenkel> Wirbelsäule> Schädel) (189). Größere Operationen (z.B. Eingriffe am Oberschenkel oder Becken) können auch bei einer moderaten posttraumatischen Inflammation zu Komplikationen führen, wohingegen Sekundäroperationen mit einem geringeren Trauma (z.B. Operationen am Mittelgesicht oder am Handgelenk) auch bei einer stärkeren posttraumatischen Inflammation komplikationslos verlaufen können (51;135;195).

So führte eine frühe posttraumatische definitive Versorgung (Versorgung von Frakturen des Oberschenkels, der Wirbelsäule oder des Beckens) bei polytraumatisierten Patienten mit hohen initialen TNF-α-Plasmakonzentrationen zu einer erhöhten Inzidenz eines MODS (136). Übereinstimmend konnten *Waydhas et al.* nachweisen, daß die Inzidenz eines MODS dann signifikant erhöht ist, wenn chirurgische Eingriffe trotz einer persistierenden posttraumatischen Entzündungsreaktion durchgeführt wurden (195). Bei einer primären,

definitiven Versorgungsstrategie von Oberschenkelfrakturen konnte nachgewiesen werden, daß bei den Patienten mit dem höchsten perioperativen Anstieg der TNF-α-Plasmakonzentrationen die längsten Beatmungszeiten vorliegen. Ein signifikanter Anstieg der ARDS- und MODS-Inzidenz zeigte sich hier allerdings nicht (135).

Zusammenfassend läßt sich zu den Bestimmungen inflammatorischer Mediatoren aus der systemischen Zirkulation sagen, daß das Ereignis Polytrauma zunächst mit einer raschen, vorübergehenden Freisetzung von präformierten Zytokinen aus diversen Entzündungszellen und dem aktivierten Endothel verbunden ist, und die nachfolgende Abnahme der systemischen Zytokin-Konzentrationen trotz einer bestehenden Entzündungsreaktion bislang nicht geklärt war.

Die vorliegende Studie mag zur Klärung dieser Frage einen wichtigen Beitrag liefern und den Hinweis dafür liefern, daß die monozytäre Synthese-Kapazität für eine Reihe essentieller proinflammatorischer Zytokine schon im frühen Zeitraum nach Trauma signifikant reduziert ist. Hieraus Schlüsse zu ziehen für z.B. die Wahl des Zeitpunktes sekundärer Stabilisierungsoperationen, ist selbstverständlich auf Grund des experimentellen Charakters der präsentierten Daten nicht möglich.

6. Zusammenfassung

Die Destabilisierung des humanen Immunsystems stellt für polytraumatisierte Patienten ein relevantes Problem dar und manifestiert sich auf der Ebene von Organfunktionsstörungen mit nach wie vor erheblicher Letalität. Zahlreiche Untersuchungen der jüngsten Vergangenheit haben klare Hinweise dafür gegeben, daß den zellulären Komponenten des Immunsystems eine zentrale Rolle für die Ausbildung und Ausprägung des posttraumatischen Multi-Organ-Dysfunktions-Syndroms (MODS) und des Multi-Organ-Versagens (*Multiple Organ Failure*, MOF) zukommt. Dabei hat sich die Fähigkeit monozytärer Zellen auf einen pathologischen Stimulus reagieren zu können, als einer der kritischen Funktionsparameter des menschlichen Immunsystems gezeigt. Die umfangreichen Untersuchungen der jüngsten Vergangenheit konnten jedoch die Frage nach der Dynamik dieser Funktionsstörung bislang nur unzureichend beantworten. Darüber blieb die tatsächliche Synthese-Kapazität relevanter Botenstoffe, wie z.B. von Zytokinen auf intrazellulärem Niveau weitgehend uncharakterisiert.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es daher:

i) Die intrazelluläre Zytokinsynthese-Kapazität von Monozyten polytraumatisierter Patienten in der direkten posttraumatischen Phase mittels Durchflußzytometrie zu quantifizieren

ii) Zu analysieren, ob es einen Zusammenhang zwischen der intrazellulären Aktivierung der Zytokinsynthese-Kapazität und der Änderung der systemischen Zytokin-Konzentration gibt

iii) Die dabei gewonnenen Ergebnisse in Vergleich zu klinischen Parametern zu setzen

Da es bislang keine validen Versuchsprotokolle für die durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären Zytokinsynthese-Kapazität von Monozyten gab, wurden in der ersten Stufe der vorliegenden Studie die Kulturbedingungen für die Stimulation, Sekretionsblockade und Stimulationszeit von Monozyten erarbeitet. Es zeigte sich, daß im Hinblick auf die weitere Fragestellung die Stimulation mit Lipopolysaccharid über 4 Stunden unter einer Sekretionsblockade mit Monensin valide Ergebnisse erbringt.

In der zweiten Stufe der Studie wurde erstmalig mittels intrazellulärer *single cell* Analyse die Synthese-Kapazität von Entzündungs-relevanten Mediatoren (TNF-α, Il-1β, Il-6 und Il-8) bei polytraumatisierten Patienten untersucht. Gemäß einem seriellen Protokoll wurde zu den Zeitpunkten „Aufnahme in den Schockraum", 6 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden nach Trauma bei 13 polytraumatisierten Patienten (ISS >16 Punkte, zwölf überlebt, einer verstorben) jeweils die Zytokinsynthese-Kapazität analysiert. Für TNF-α beträgt sie bei Aufnahme 78±5%, für Il-1β ergab sich mit 73±6% ebenso wie für Il-6 mit 58±4%bereits bei Aufnahme eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Es konnte gezeigt werden, daß die Synthese-Kapazität für diese essentiellen proinflammatorischen Zytokine zwischen 12 und 48 Stunden nach Trauma mit 49±5% für TNF-α, 53±7% für Il-1β, 36,7% für Il-6 und 77,3% für Il-8 signifikant im Vergleich zu den Werten bei Aufnahme reduziert ist. Die vorliegende Untersuchung demonstriert somit eine engmaschige Analyse und Quantifizierung der monozytären Zytokinsynthese-Kapazität für TNF-α, Il-6, Il-1β und Il-8 nach Polytrauma.

Bezüglich der Analyse, ob ein Zusammenhang zwischen intrazellulärer Aktivierung der Zytokinsynthese-Kapazität und der Änderung der systemischen Zytokin-Konzentration besteht, konnten wir mittels ELISA in der systemischen Zirkulation zwar tendenzielle Veränderungen der einzelnen Faktoren beobachten, jedoch fand sich auf Grund der niedrigen

Sensitivität der ELISA-Methode keine signifikante Korrelation zu den hoch-sensitiven intrazellulären Ergebnissen.

Bezüglich des Einflusses klinischer Faktoren auf die intrazelluläre Zytokinsynthese-Kapazität ließ sich nachweisen, daß Patienten mit schwerer Verletzung (ISS ≥34) im Zeitraum zwischen 24 Stunden und 72 Stunden nach Trauma eine signifikant niedrigere Zytokinsynthese-Kapazität aufweisen als weniger schwer verletzte Patienten (ISS <34). So beträgt die Kapazität für TNF-α in der Schwerer-Verletzten-Gruppe 72 Stunden nach Trauma 62±11% vs. 80±6% in der Leichter-Verletzten-Gruppe. Ähnliche Beobachtungen ließen sich auch für Il-1β und Il-6 machen. Lediglich für die Synthese-Kapazität von Il-8 ließ sich nach 72 Stunden kein Unterschied mehr zwischen den Gruppen feststellen.

Die vorliegende Arbeit zeigt somit, daß das, in der Literatur beschriebene Phänomen der posttraumatischen Immundysfunktion bei Monozyten bereits 12 Stunden nach Trauma auftritt, deutlich früher also als bisher in der Literatur anhand von Messungen in Überständen isolierter MØ gezeigt. Des weiteren konnte in Analogie zur Sepsis demonstriert werden, daß die Synthese-Kapazität von Immunzellen offensichtlich mit der Schwere der Erkrankung, i.e. der Schwere der Sepsis bzw. der Schwere der Verletzung korreliert ist.
Ziel von Folgestudien muß es nun sein, die den vorgestellten Ergebnissen zugrunde liegenden intrazellulären Steuerungsmechanismen aufzuklären.

7. LITERATUR

(1) Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, Asehnoune K, Fitting C, Pinsky MR et al. NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. Am J Respir Crit Care Med 2000 November;162:1877-83.

(2) Adib-Conquy M, Asehnoune K, Moine P, Cavaillon JM. Long-term-impaired expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha in peripheral blood mononuclear cells of trauma patients. J Leukoc Biol 2001 July;70:30-8.

(3) Aggarwal BB, Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. Eur Cytokine Netw 1996 April;7:93-124.

(4) Alexander JW. Mechanism of immunologic suppression in burn injury. J Trauma 1990 December;30:S70-S75.

(5) Alexander JW, Stinnett JD, Ogle CK, Ogle JD, Morris MJ. A comparison of immunologic profiles and their influence on bacteremia in surgical patients with a high risk of infection. Surgery 1979 July;86:94-104.

(6) Angele MK, Faist E. Gender-specific immune response following shock: clinical and experimental data. European Journal of Trauma 26, 267-277. 2001.

(7) Angele MK, Faist E. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. Crit Care 2002 August;6:298-305.

(8) Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM et al. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1984 December;81:7907-11.

(9) 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 February;5:79-90.

(10) Baggiolini M, Loetscher P, Moser B. Interleukin-8 and the chemokine family. Int J Immunopharmacol 1995 February;17:103-8.

(11) Baigrie RJ, Lamont PM, Kwiatkowski D, Dallman MJ, Morris PJ. Systemic cytokine response after major surgery. Br J Surg 1992 August;79:757-60.

(12) Baker SP, O'Neill B, Haddon W, Jr., Long WB. The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. J Trauma 1974 March;14:187-96.

(13) Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D. [Epidemiology of the severely injured patient. A prospective assessment of preclinical and clinical management. AG Polytrauma of DGU]. Unfallchirurg 2000 May;103:355-63.

(14) Baue AE. Multiple organ failure--the discrepancy between our scientific knowledge and understanding and the management of our patients. Langenbecks Arch Surg 2000 November;385:441-53.

(15) Bayne EK, Rupp EA, Limjuco G, Chin J, Schmidt JA. Immunocytochemical detection of interleukin 1 within stimulated human monocytes. J Exp Med 1986 May 1;163:1267-80.

(16) Berry N, Nishizuka Y. Protein kinase C and T cell activation. Eur J Biochem 1990 April 30;189:205-14.

(17) Biberthaler P, Bogner V, Baker HV, Lopez MC, Neth P, Kanz KG et al. Genome-wide monocytic mRNA expression in polytrauma patients for identification of clinical outcome. Shock 2005 July;24:11-9.

(18) Biberthaler P, Stegmaier J, Mayer V, Kirchhoff C, Neth P, Mussack T et al. Initial posttraumatic translocation of NF-kappaB and TNF-alpha mRNA expression in peripheral blood monocytes of trauma patients with multiple injuries: a pilot study. Shock 2004 December;22:527-32.

(19) Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Carl VS, Franciose RJ, Banerjee A. Interleukin-8 increases endothelial permeability independent of neutrophils. J Trauma 1995 July;39:98-102.

(20) Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? Ann Surg 1996 November;224:647-64.

(21) Bocci V. Interleukins. Clinical pharmacokinetics and practical implications. Clin Pharmacokinet 1991 October;21:274-84.

(22) Boelens PG, Houdijk AP, Fonk JC, Nijveldt RJ, Ferwerda CC, Von Blomberg-Van Der Flier BM et al. Glutamine-enriched enteral nutrition increases HLA-DR expression on monocytes of trauma patients. J Nutr 2002 September;132:2580-6.

(23) Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). Ann Intern Med 1996 October 15;125:680-7.

(24) Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine [see comments]. Chest 1992 June;101:1644-55.

(25) Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Kim FJ, Banerjee A, Peterson VM. Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window. Surgery 1995 August;118:358-64.

(26) Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Sauaia A, Banerjee A, Peterson VM. Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure. J Trauma 1995 September;39:411-7.

(27) Bueno C, Almeida J, Alguero MC, Sanchez ML, Vaquero JM, Laso FJ et al. Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and incubation periods. Cytometry 2001 February 15;46:33-40.

(28) Cadroy Y, Dupouy D, Boneu B, Plaisancie H. Polymorphonuclear leukocytes modulate tissue factor production by mononuclear cells: role of reactive oxygen species. J Immunol 2000 April 1;164:3822-8.

(29) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 1975 September;72:3666-70.

(30) Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Cloez-Tayarani I, Fitting C. Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review. J Endotoxin Res 2001;7:85-93.

(31) Cioffi WG, Burleson DG, Pruitt BAJ. Leukocyte responses to injury. Arch Surg 1993 November;128:1260-7.

(32) Collins DP. Cytokine and cytokine receptor expression as a biological indicator of immune activation: important considerations in the development of in vitro model systems. J Immunol Methods 2000 September 21;243:125-45.

(33) Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, Van DJ, Shenkin A. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. Clin Sci (Lond) 1990 August;79:161-5.

(34) de Bont ES, Kimpen JL, Tamminga RY, Niemarkt AE, de Leij LH, Kamps WA. Intrinsic capacity of monocytes to produce cytokines ex vivo in patients with acute lymphoblastic leukaemia. Cytokine 2000 November;12:1723-6.

(35) Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. Ann Surg 1992 August;216:117-34.

(36) Deitch EA, Mancini MC. Complement receptors in shock and transplantation. Arch Surg 1993 November;128:1222-6.

(37) Deitch EA, Rutan R, Waymack JP. Trauma, shock, and gut translocation. New Horiz 1996 May;4:289-99.

(38) Desborough JP. The stress response to trauma and surgery. Br J Anaesth 2000 July;85:109-17.

(39) Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. FASEB J 1994 December;8:1314-25.

(40) Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. Chest 2000 August;118:503-8.

(41) Dinter A, Berger EG. Golgi-disturbing agents. Histochem Cell Biol 1998 May;109:571-90.

(42) Durham RM, Moran JJ, Mazuski JE, Shapiro MJ, Baue AE, Flint LM. Multiple organ failure in trauma patients. J Trauma 2003 October;55:608-16.

(43) Egger G, Aigner R, Glasner A, Hofer HP, Mitterhammer H, Zelzer S. Blood polymorphonuclear leukocyte migration as a predictive marker for infections in severe trauma: comparison with various inflammation parameters. Intensive Care Med 2004 February;30:331-4.

(44) Ertel W, Keel M, Bonaccio M, Steckholzer U, Gallati H, Kenney JS et al. Release of anti-inflammatory mediators after mechanical trauma correlates with severity of injury and clinical outcome. J Trauma 1995 November;39:879-85.

(45) Ertel W, Keel M, Marty D, Hoop R, Safret A, Stocker R et al. [Significance of systemic inflammation in 1,278 trauma patients]. Unfallchirurg 1998 July;101:520-6.

(46) 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 September;121:1000-5.

(47) Faist E, Schinkel C, Zimmer S. Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. World J Surg 1996 May;20:454-9.

(48) Faist E, Schinkel C, Zimmer S, Kremer JP, Alkan S, Rordorf C et al. The influence of major trauma on the regulatory levels of interleukin-1 (IL-1) and IL-2 in human mononuclear leukocytes. Zentralbl Chir 1993;118:420-31.

(49) Faist E, Schinkel C, Zimmer S, Kremer JP, von Donnersmarck GH, Schildberg FW. Inadequate interleukin-2 synthesis and interleukin-2 messenger expression following thermal and mechanical trauma in humans is caused by defective transmembrane signalling. J Trauma 1993 June;34:846-53.

(50) Fibbe WE, van der Meer JW, Falkenburg JH, Hamilton MS, Kluin PM, Dinarello CA. A single low dose of human recombinant interleukin 1 accelerates the recovery of neutrophils in mice with cyclophosphamide-induced neutropenia. Exp Hematol 1989 August;17:805-8.

(51) Flohe S, Lendemans S, Schade FU, Kreuzfelder E, Waydhas C. Influence of surgical intervention in the immune response of severely injured patients. Intensive Care Med 2004 January;30:96-102.

(52) Foex BA, Lamb WR, Roberts TE, Brear SG, Macartney I, Hammer M et al. Early cytokine response to multiple injury. Injury 1993 July;24:373-6.

(53) Fosse E, Mollnes TE, Aasen AO, Trumpy JH, Stokke T. Complement activation following multiple injuries. Acta Chir Scand 1987;153:325-30.

(54) Furuta R, Yamagishi J, Kotani H, Sakamoto F, Fukui T, Matsui Y et al. Production and characterization of recombinant human neutrophil chemotactic factor. J Biochem (Tokyo) 1989 September;106:436-41.

(55) Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, Strecker W, Kinzl L, Bruckner UB. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? Arch Surg 2000 March;135:291-5.

(56) Glaser F, Sannwald GA, Buhr HJ, Kuntz C, Mayer H, Klee F et al. General stress response to conventional and laparoscopic cholecystectomy. Ann Surg 1995 April;221:372-80.

(57) Goodman ER, Kleinstein E, Fusco AM, Quinlan DP, Lavery R, Livingston DH et al. Role of interleukin 8 in the genesis of acute respiratory distress syndrome through an effect on neutrophil apoptosis. Arch Surg 1998 November;133:1234-9.

(58) Goodman RB, Pugin J, Lee JS, Matthay MA. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. Cytokine Growth Factor Rev 2003 December;14:523-35.

(59) Goris RJ. Pathophysiology of shock in trauma. Eur J Surg 2000 February;166:100-11.

(60) Goris RJ, te Boekhorst TP, Nuytinck JK, Gimbrere JS. Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation? Arch Surg 1985 October;120:1109-15.

(61) Greenspan L, McLellan BA, Greig H. Abbreviated Injury Scale and Injury Severity Score: a scoring chart. J Trauma 1985 January;25:60-4.

(62) Gregoric PD, Bajec DD, Sijacki AD, Karadzic BA. [Relation between cytokine IL-6 levels and the occurrence of systemic complications in patients with multiple injuries and blunt abdominal trauma]. Srp Arh Celok Lek 2003 March;131:118-21.

(63) Grotz M, von Griensven M, Stalp M, Kaufmann U, Hildebrand F, Pape HC. [Scoring multiple organ failure after severe trauma. Comparison of the Goris, Marshall and Moore scores]. Chirurg 2001 June;72:723-30.

(64) Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell Signal 2001 February;13:85-94.

(65) Guirao X, Lowry SF. Biologic control of injury and inflammation: much more than too little or too late. World J Surg 1996 May;20:437-46.

(66) Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ et al. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. Blood 1989 October;74:1704-10.

(67) Hack CE, Nuijens JH, Strack van Schijndel RJ, Abbink JJ, Eerenberg AJ, Thijs LG. A model for the interplay of inflammatory mediators in sepsis--a study in 48 patients. Intensive Care Med 1990;16 Suppl 3:S187-S191.

(68) Halbertsma FJ, Vaneker M, Scheffer GJ, van der Hoeven JG. Cytokines and biotrauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. Neth J Med 2005 November;63:382-92.

(69) Hammerle AF, Krafft P, Wagner OA, Poschl G, Winternitz J, Plattner H et al. [Is TNF-alpha "ripe" for routine diagnosis in sepsis?]. Anaesthesist 1990 October;39:547-51.

(70) Hauser CJ, Lagoo S, Lagoo A, Hale E, Hardy KJ, Barber WH et al. Tumor necrosis factor alpha gene expression in human peritoneal macrophages is suppressed by extra-abdominal trauma. Arch Surg 1995 November;130:1186-91.

(71) Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem J 2003 August 15;374:1-20.

(72) Helmy SA, Wahby MA, El-Nawaway M. The effect of anaesthesia and surgery on plasma cytokine production. Anaesthesia 1999 August;54:733-8.

(73) Hensler T, Sauerland S, Bouillon B, Raum M, Rixen D, Helling HJ et al. Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase. J Trauma 2002 May;52:962-70.

(74) Hill J, Lindsay TF, Ortiz F, Yeh CG, Hechtman HB, Moore FD, Jr. Soluble complement receptor type 1 ameliorates the local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion in the rat. J Immunol 1992 September 1;149:1723-8.

(75) Hoch RC, Rodriguez R, Manning T, Bishop M, Mead P, Shoemaker WC et al. Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. Crit Care Med 1993 June;21:839-45.

(76) Holzmann B, Weighardt H, Heidecke CD. [Receptors and signal proteins of the innate immune system as new targets in sepsis therapy. Reprogramming of the immune response]. Chirurg 2003 January;74:61-4.

(77) Januszkiewicz A, Lore K, Essen P, Andersson B, McNurlan MA, Garlick PJ et al. Response of in vivo protein synthesis in T lymphocytes and leucocytes to an endotoxin challenge in healthy volunteers. Clin Exp Immunol 2002 November;130:263-70.

(78) Jarrar D, Chaudry IH, Wang P. Organ dysfunction following hemorrhage and sepsis: mechanisms and therapeutic approaches (Review). Int J Mol Med 1999 December;4:575-83.

(79) Jordan MS, Singer AL, Koretzky GA. Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. Nat Immunol 2003 February;4:110-6.

(80) Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. J Immunol Methods 1993 February 26;159:197-207.

(81) Kahlke V, Fandrich F, Brotzmann K, Zabel P, Schroder J. Selective decontamination of the digestive tract: impact on cytokine release and mucosal damage after hemorrhagic shock. Crit Care Med 2002 June;30:1327-33.

(82) Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. J Immunol 1999 March 15;162:3231-6.

(83) Kamm K, Vanderkolk W, Lawrence C, Jonker M, Davis AT. The effect of traumatic brain injury upon the concentration and expression of interleukin-1beta and interleukin-10 in the rat. J Trauma 2006 January;60:152-7.

(84) Keel M, Ecknauer E, Stocker R, Ungethum U, Steckholzer U, Kenney J et al. Different pattern of local and systemic release of proinflammatory and anti-inflammatory mediators in severely injured patients with chest trauma. J Trauma 1996 June;40:907-12.

(85) Kell MR, Kavanaugh EG, Goebel A, Soberg CC, Lederer JA. Injury primes the immune system for an enhanced and lethal T-cell response against bacterial superantigen. Shock 1999 August;12:139-44.

(86) Kelly JL, O'Sullivan C, O'Riordain M, O'Riordain D, Lyons A, Doherty J et al. Is circulating endotoxin the trigger for the systemic inflammatory response syndrome seen after injury? Ann Surg 1997 May;225:530-41.

(87) Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. J Cell Biol 1992 March;116:1071-80.

(88) Kleen M, Habler O, Meisner F, Kemming G, Pape A, Messmer K. Effects of primary resuscitation from shock on distribution of myocardial blood flow. J Appl Physiol 2000 Feb ;88 (2):373 -8588:373-85.

(89) Koperna T, Vogl SE, Poschl GP, Hamilton G, Roder G, Germann P. Cytokine patterns in patients who undergo hemofiltration for treatment of multiple organ failure. World J Surg 1998 May;22:443-7.

(90) Kremer JP, Jarrar D, Steckholzer U, Ertel W. Interleukin-1, -6 and tumor necrosis factor-alpha release is down-regulated in whole blood from septic patients. Acta Haematol 1996;95:268-73.

(91) Krettek C, Simon RG, Tscherne H. Management priorities in patients with polytrauma. Langenbecks Arch Surg 1998 August;383:220-7.

(92) Krieglstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. Am J Hypertens 2001 June;14:44S-54S.

(93) Kroggel R, Martin M, Pingoud V, Dayer JM, Resch K. Two-chain structure of the interleukin 1 receptor. FEBS Lett 1988 February 29;229:59-62.

(94) Krohn CD, Reikeras O, Mollnes TE, Aasen AO. Complement activation and release of interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in drained and systemic blood after major orthopaedic surgery. Eur J Surg 1998 February;164:103-8.

(95) Kushi H, Saito T, Makino K, Hayashi N. IL-8 is a key mediator of neuroinflammation in severe traumatic brain injuries. Acta Neurochir Suppl 2003;86:347-50.

(96) Laird AM, Miller PR, Kilgo PD, Meredith JW, Chang MC. Relationship of early hyperglycemia to mortality in trauma patients. J Trauma 2004 May;56:1058-62.

(97) Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. Shock 1999 March;11:153-9.

(98) Lefering R, Goris RJ, van Nieuwenhoven EJ, Neugebauer E. Revision of the multiple organ failure score. Langenbecks Arch Surg 2002 April;387:14-20.

(99) Leon LR. Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. J Appl Physiol 2002 June;92:2648-55.

(100) Liener UC, Bruckner UB, Knoferl MW, Steinbach G, Kinzl L, Gebhard F. Chemokine activation within 24 hours after blunt accident trauma. Shock 2002 March;17:169-72.

(101) Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. Surgery 2000 February;127:117-26.

(102) Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. Physiol Rev 1999 October;79:1431-568.

(103) Lo SK, Golenbock DT, Sass PM, Maskati A, Xu H, Silverstein RL. Engagement of the Lewis X antigen (CD15) results in monocyte activation. Blood 1997 January 1;89:307-14.

(104) Lomedico PT, Gubler U, Hellmann CP, Dukovich M, Giri JG, Pan YC et al. Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in Escherichia coli. Nature 1984 November 29;312:458-62.

(105) Lore K, Spetz AL, Fehniger TE, Sonnerborg A, Landay AL, Andersson J. Quantitative single cell methods that identify cytokine and chemokine expression in dendritic cells. J Immunol Methods 2001 March 1;249:207-22.

(106) Luyer MD, Buurman WA, Hadfoune M, Jacobs JA, Konstantinov SR, Dejong CH et al. Pretreatment with high-fat enteral nutrition reduces endotoxin and tumor necrosis factor-alpha and preserves gut barrier function early after hemorrhagic shock. Shock 2004 January;21:65-71.

(107) Luyer MD, Buurman WA, Hadfoune M, Speelmans G, Knol J, Jacobs JA et al. Strain-specific effects of probiotics on gut barrier integrity following hemorrhagic shock. Infect Immun 2005 June;73:3686-92.

(108) Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M et al. Regulation of macrophage activation. Cell Mol Life Sci 2003 November;60:2334-46.

(109) Majetschak M, Borgermann J, Waydhas C, Obertacke U, Nast-Kolb D, Schade FU. Whole blood tumor necrosis factor-alpha production and its relation to systemic

concentrations of interleukin 4, interleukin 10, and transforming growth factor-beta1 in multiply injured blunt trauma victims. Crit Care Med 2000 June;28:1847-53.

(110) Majetschak M, Flach R, Kreuzfelder E, Jennissen V, Heukamp T, Neudeck F et al. The extent of traumatic damage determines a graded depression of the endotoxin responsiveness of peripheral blood mononuclear cells from patients with blunt injuries. Crit Care Med 1999 February;27:313-8.

(111) Majetschak M, Flohe S, Obertacke U, Schroder J, Staubach K, Nast-Kolb D et al. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. Ann Surg 1999 August;230:207-14.

(112) Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. J Am Coll Surg 2001 September;193:237-44.

(113) Martin C, Boisson C, Haccoun M, Thomachot L, Mege JL. Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma. Crit Care Med 1997 November;25:1813-9.

(114) Marty C, Misset B, Tamion F, Fitting C, Carlet J, Cavaillon JM. Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin. Crit Care Med 1994 April;22:673-9.

(115) Massberg S, Messmer K. The nature of ischemia/reperfusion injury. Transplant Proc 1998 December;30:4217-23.

(116) Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. Cytokine 1989 November;1:2-13.

(117) Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R et al. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. Chest 1995 April;107:1062-73.

(118) Menger MD, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? Langenbecks Arch Surg 2004 November;389:475-84.

(119) Miethke T, Wahl C, Heeg K, Echtenacher B, Krammer PH, Wagner H. T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. J Exp Med 1992 January 1;175:91-8.

(120) Miyaoka K, Iwase M, Suzuki R, Kondo G, Watanabe H, Ito D et al. Clinical evaluation of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels after surgery-induced inflammation. J Surg Res 2005 May 15;125:144-50.

(121) Mokart D, Guery BP, Bouabdallah R, Martin C, Blache JL, Arnoulet C et al. Deactivation of alveolar macrophages in septic neutropenic ARDS. Chest 2003 August;124:644-52.

(122) Mollenhauer HH, Morre DJ, Rowe LD. Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. Biochim Biophys Acta 1990 May 7;1031:225-46.

(123) Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. Surg Clin North Am 1995 April;75:257-77.

(124) Moore FA, Sauaia A, Moore EE, Haenel JB, Burch JM, Lezotte DC. Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. J Trauma 1996 April;40:501-10.

(125) Morrison B, III, Saatman KE, Meaney DF, McIntosh TK. In vitro central nervous system models of mechanically induced trauma: a review. J Neurotrauma 1998 November;15:911-28.

(126) Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003 April;284:L566-L577.

(127) Mulligan MS, Schmid E, Beck-Schimmer B, Till GO, Friedl HP, Brauer RB et al. Requirement and role of C5a in acute lung inflammatory injury in rats. J Clin Invest 1996 July 15;98:503-12.

(128) Mutschler W, Marzi I, Ziegenfuss T. [Perspectives of polytrauma management]. Zentralbl Chir 1996;121:979-84.

(129) Nast-Kolb D, Aufmkolk M, Rucholtz S, Obertacke U, Waydhas C. Multiple organ failure still a major cause of morbidity but not mortality in blunt multiple trauma. J Trauma 2001 November;51:835-41.

(130) Nast-Kolb D, Waydhas C, Gippner-Steppert C, Schneider I, Trupka A, Ruchholtz S et al. Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ failure in patients with multiple injuries. J Trauma 1997 March;42:446-54.

(131) Nylander S, Kalies I. Brefeldin A, but not monensin, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes: efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry. J Immunol Methods 1999 April 22;224:69-76.

(132) Oestern HJ, Kabus K. [Comparison of various trauma score systems. An overview]. Unfallchirurg 1994 April;97:177-84.

(133) Okusawa S, Dinarello CA, Yancey KB, Endres S, Lawley TJ, Frank MM et al. C5a induction of human interleukin 1. Synergistic effect with endotoxin or interferon-gamma. J Immunol 1987 October 15;139:2635-40.

(134) Orci L, Tagaya M, Amherdt M, Perrelet A, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J et al. Brefeldin A, a drug that blocks secretion, prevents the assembly of non-clathrin-coated buds on Golgi cisternae. Cell 1991 March 22;64:1183-95.

(135) Pape HC, Schmidt RE, Rice J, van GM, das GR, Krettek C et al. Biochemical changes after trauma and skeletal surgery of the lower extremity: quantification of the operative burden. Crit Care Med 2000 October;28:3441-8.

(136) Pape HC, van Griensven M, Rice J, Gansslen A, Hildebrand F, Zech S et al. Major secondary surgery in blunt trauma patients and perioperative cytokine liberation: determination of the clinical relevance of biochemical markers. J Trauma 2001 June;50:989-1000.

(137) Parsons PE, Eisner MD, Thompson BT, Matthay MA, Ancukiewicz M, Bernard GR et al. Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury. Crit Care Med 2005 January;33:1-6.

(138) Pellegrini JD, De AK, Kodys K, Puyana JC, Furse RK, Miller-Graziano C. Relationships between T lymphocyte apoptosis and anergy following trauma. J Surg Res 2000 February;88:200-6.

(139) Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. Nature 1984 December 20;312:724-9.

(140) Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, Treer JR, Waldrop SL, Bergstresser PR et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. Blood 1995 August 15;86:1408-19.

(141) Pittet D, Rangel-Frausto S, Li N, Tarara D, Costigan M, Rempe L et al. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. Intensive Care Med 1995 April;21:302-9.

(142) Poeze M, Ramsay G, Buurman WA, Greve JW, Dentener M, Takala J. Increased hepatosplanchnic inflammation precedes the development of organ dysfunction after elective high-risk surgery. Shock 2002 June;17:451-8.

(143) Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. J Immunol Methods 1995 December 15;188:117-28.

(144) Rebulla P, Porretti L, Bertolini F, Marangoni F, Prati D, Smacchia C et al. White cell-reduced red cells prepared by filtration: a critical evaluation of current filters and methods for counting residual white cells. Transfusion 1993 February;33:128-33.

(145) Redl H, Gasser H, Schlag G, Marzi I. Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. Br Med Bull 1993 July;49:556-65.

(146) Regel G, Lobenhoffer P, Lehmann U, Pape HC, Pohlemann T, Tscherne H. [Results of treatment of polytraumatized patients. A comparative analysis of 3,406 cases between 1972 and 1991]. Unfallchirurg 1993 July;96:350-62.

(147) Reines HD. TNF in trauma--whither our focus? Crit Care Med 1999 February;27:239.

(148) Rensing H, Bauer M. [Multiple organ failure. Mechanisms, clinical manifestations and treatment strategies]. Anaesthesist 2001 November;50:819-41.

(149) Rose S, Marzi I. Mediators in polytrauma--pathophysiological significance and clinical relevance. Langenbecks Arch Surg 1998 August;383:199-208.

(150) Rose S, Marzi I. [Pathophysiology of polytrauma]. Zentralbl Chir 1996;121:896-913.

(151) Rotstein OD. Pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome: gut origin, protection, and decontamination. Surg Infect (Larchmt) 2000;1:217-23.

(152) Roumen RM, Hendriks T, van d, V, Nieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW, van der Meer JW et al. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. Ann Surg 1993 December;218:769-76.

(153) Ruchholtz S, Nast-Kolb D, Waydhas C, Lefering R. [The trauma register of the 'Polytrauma' Committee of the German Society of Trauma Surgery as the basis for quality management in the management of severely injured patients]. Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd 1997;114:1265-7.

(154) Rutledge R. Injury severity and probability of survival assessment in trauma patients using a predictive hierarchical network model derived from ICD-9 codes. J Trauma 1995 April;38:590-7.

(155) Rutledge R, Hoyt DB, Eastman AB, Sise MJ, Velky T, Canty T et al. Comparison of the Injury Severity Score and ICD-9 diagnosis codes as predictors of outcome in injury: analysis of 44,032 patients. J Trauma 1997 March;42:477-87.

(156) Samy TS, Ayala A, Catania RA, Chaudry IH. Trauma-hemorrhage activates signal transduction pathways in mouse splenic T cells. Shock 1998 June;9:443-50.

(157) Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Moser KS, Brennan R, Read RA et al. Epidemiology of trauma deaths: a reassessment. J Trauma 1995 February;38:185-93.

(158) Schilling D, Beissert T, Fenton MJ, Nixdorff K. Negative regulation of IL-1beta production at the level of transcription in macrophages stimulated with LPS. Cytokine 2001 October 21;16:51-61.

(159) Schinkel C, Faist E, Zimmer S, Piltz S, Walz A, Rose R et al. Kinetics of circulating adhesion molecules and chemokines after mechanical trauma and burns. Eur J Surg 1996 October;162:763-8.

(160) Schinkel C, Licht K, Zedler S, Schinkel S, Fraunberger P, Fuchs D et al. Interferon-gamma modifies cytokine release in vitro by monocytes from surgical patients. J Trauma 2001 February;50:321-7.

(161) Schinkel C, Sendtner R, Zimmer S, Faist E. Functional analysis of monocyte subsets in surgical sepsis. J Trauma 1998 May;44:743-8.

(162) Schinkel C, Wick M, Muhr G, Koller M. Analysis of systemic interleukin-11 after major trauma. Shock 2005 January;23:30-4.

(163) Schinkel C, Zimmer S, Kremer JP, Walz A, Rordorf-Adam C, Henckel vD et al. Comparative analysis of transcription and protein release of the inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 beta) and interleukin-8 (IL-8) following major burn and mechanical trauma. Shock 1995 October;4:241-6.

(164) Schroder JM. The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP/interleukin 8) stimulates human neutrophil arachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate. J Exp Med 1989 September 1;170:847-63.

(165) Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Bridts CH, Stevens WJ. Comparison of intracellular cytokine production with extracellular cytokine levels using two flow cytometric techniques. Cytometry 2003 September;55B:52-8.

(166) Schuerwegh AJ, Stevens WJ, Bridts CH, De Clerck LS. Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. Cytometry 2001 June 15;46:172-6.

(167) Schultz MJ, Olszyna DP, de Jonge E, Verbon A, van Deventer SJ, van der PT. Reduced ex vivo chemokine production by polymorphonuclear cells after in vivo exposure of normal humans to endotoxin. J Infect Dis 2000 October;182:1264-7.

(168) Seekamp A, Jochum M, Ziegler M, van Griensven M, Martin M, Regel G. Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion. J Trauma 1998 May;44:874-82.

(169) Shalaby MR, Waage A, Espevik T. Cytokine regulation of interleukin 6 production by human endothelial cells. Cell Immunol 1989 July;121:372-82.

(170) Shenkin A, Fraser WD, Series J, Winstanley FP, McCartney AC, Burns HJ et al. The serum interleukin 6 response to elective surgery. Lymphokine Res 1989;8:123-7.

(171) Skrzeczynska J, Kobylarz K, Hartwich Z, Zembala M, Pryjma J. CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. Scand J Immunol 2002 June;55:629-38.

(172) Smail N, Messiah A, Edouard A, Descorps-Declere A, Duranteau J, Vigue B et al. Role of systemic inflammatory response syndrome and infection in the occurrence of early multiple organ dysfunction syndrome following severe trauma. Intensive Care Med 1995 October;21:813-6.

(173) Spielmann S, Kerner T, Ahlers O, Keh D, Gerlach M, Gerlach H. Early detection of increased tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) and soluble TNF receptor protein plasma levels after trauma reveals associations with the clinical course. Acta Anaesthesiol Scand 2001 March;45:364-70.

(174) Stancovski I, Baltimore D. NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? Cell 1997 October 31;91:299-302.

(175) Statistisches Bundesamt. Unfallgeschehen im Straßenverkehr 2004. 5-24. 22-8-0005. Wiesbaden.

(176) Stewart TC, Lane PL, Stefanits T. An evaluation of patient outcomes before and after trauma center designation using Trauma and Injury Severity Score analysis. J Trauma 1995 December;39:1036-40.

(177) Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, Remick DG, Phan SH, Ward PA et al. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta. Science 1989 March 17;243:1467-9.

(178) Suni MA, Picker LJ, Maino VC. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. J Immunol Methods 1998 March 1;212:89-98.

(179) Svoboda P, Kantorova I, Ochmann J. Dynamics of interleukin 1, 2, and 6 and tumor necrosis factor alpha in multiple trauma patients. J Trauma 1994 March;36:336-40.

(180) Takahashi GW, Andrews DF, III, Lilly MB, Singer JW, Alderson MR. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes. Blood 1993 January 15;81:357-64.

(181) Thelen M, Peveri P, Kernen P, von T, V, Walz A, Baggiolini M. Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. FASEB J 1988 August;2:2702-6.

(182) Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science 1986 October 24;234:470-4.

(183) Trunkey DD. Trauma. Accidental and intentional injuries account for more years of life lost in the U.S. than cancer and heart disease. Among the prescribed remedies are improved preventive efforts, speedier surgery and further research. Sci Am 1983 August;249:28-35.

(184) Tscherne H, Regel G, Sturm JA, Friedl HP. [Degree of severity and priorities in multiple injuries]. Chirurg 1987 October;58:631-40.

(185) Tuschil A, Lam C, Haslberger A, Lindley I. Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation. J Invest Dermatol 1992 September;99:294-8.

(186) Ulmer AJ, Flad H, Rietschel T, Mattern T. Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). Toxicology 2000 November 2;152:37-45.

(187) van der PT, Marchant A, Buurman WA, Berman L, Keogh CV, Lazarus DD et al. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. J Immunol 1995 December 1;155:5397-401.

(188) Verhasselt V, Buelens C, Willems F, De Groote D, Haeffner-Cavaillon N, Goldman M. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells:

evidence for a soluble CD14-dependent pathway. J Immunol 1997 March 15;158:2919-25.

(189) Vindenes HA, Ulvestad E, Bjerknes R. Concentrations of cytokines in plasma of patients with large burns: their relation to time after injury, burn size, inflammatory variables, infection, and outcome. Eur J Surg 1998 September;164:647-56.

(190) Walsh DS, Siritongtaworn P, Pattanapanyasat K, Thavichaigarn P, Kongcharoen P, Jiarakul N et al. Lymphocyte activation after non-thermal trauma. Br J Surg 2000 February;87:223-30.

(191) Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. Biochem Biophys Res Commun 1987 December 16;149:755-61.

(192) Watanabe E, Hirasawa H, Oda S, Matsuda K, Hatano M, Tokuhisa T. Extremely high interleukin-6 blood levels and outcome in the critically ill are associated with tumor necrosis factor- and interleukin-1-related gene polymorphisms. Crit Care Med 2005 January;33:89-97.

(193) Waydhas C, Nast-Kolb D. Scores in polytrauma--do they help? Langenbecks Arch Surg 1998 August;383:209-13.

(194) Waydhas C, Nast-Kolb D, Jochum M, Trupka A, Lenk S, Fritz H et al. Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma. Arch Surg 1992 April;127:460-7.

(195) Waydhas C, Nast-Kolb D, Trupka A, Zettl R, Kick M, Wiesholler J et al. Posttraumatic inflammatory response, secondary operations, and late multiple organ failure. J Trauma 1996 April;40:624-30.

(196) Weiser MR, Williams JP, Moore FD, Jr., Kobzik L, Ma M, Hechtman HB et al. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. J Exp Med 1996 May 1;183:2343-8.

(197) West MA, Baker J, Bellingham J. Kinetics of decreased LPS-stimulated cytokine release by macrophages exposed to CO2. J Surg Res 1996 June;63:269-74.

(198) Wick M, Ekkernkamp A, Muhr G. [The epidemiology of multiple trauma]. Chirurg 1997 November;68:1053-8.

(199) Willmann K. Flow-cytometric immune function methodology for human peripheral blood dendritic cells. Methods Mol Biol 2003;215:41-57.

(200) Wood JJ, Rodrick ML, O'Mahony JB, Palder SB, Saporoschetz I, D'Eon P et al. Inadequate interleukin 2 production. A fundamental immunological deficiency in patients with major burns. Ann Surg 1984 September;200:311-20.

(201) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science 1990 September 21;249:1431-3.

(202) Yao YM, Redl H, Bahrami S, Schlag G. The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. Inflamm Res 1998 May;47:201-10.

(203) Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. Proc Natl Acad Sci U S A 1987 December;84:9233-7.

(204) 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 January;27:66-72.

8. Glossar

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANOVA	Analysis of Variance
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ARDS	Adult respiratory distress syndrome
BSA	Bovines Serumalbumin
BSF-2	B-Cell Differentiation factor
^0C	Grad Celsius
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
CD	Cluster Determinant
CMI	Zellvermittelter Immunabwehr
CO_2	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
D	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälber Serum
FITC	Fluorisothiocyanat
g	Gramm
h	Stunde
HSF	Hepatocyte stimulating factor
IE	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin
INF	Interferon
IRS	Ischämie-Reperfusions-Syndrom
ISS	Injury Severity Score
kb	kilo Basenpaar
kDA	kilo Dalton
LAT	Linker of activated T-cells

LEI	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion
LPB	LPS Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharid
l	Liter
M	Molar
m	milli
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
Mio.	Million
MW	Mittelwert
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
MOF	Multiple Organ Failure
MOV	Multiorganversagen
MØ	Monozyt
mRNA	messenger RNA
µ	Mikro (x 10^{-6})
n	nano (x 10^{-9})
NK	Natural Killer Cell
O_2	Sauerstoff
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBMC	Mononukleärer Leukozyt aus dem peripheren Blut
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC-5	Phycoerythrin-Cyanin-5
PE	Phycoerthrein
PGE2	Prostaglandin E2
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (Phorbolester)
PMN	Polymorphkerniger Leukozyt
präOP	präoperativ
R	Rezeptor
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Reactive Oxygen Intermediates

RPM	Umdrehungen pro Minute
rh	recombinant human
SAC	Staphylococcus aureus cowan I
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler)
SHT	Schädelhirntrauma
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit
V	Volt
vs.	versus
w/v	Gewicht pro Volumen

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Chlodwig Kirchhoff
Geburtsdatum:	24.06.1978
Geburtsort:	München
Konfession:	römisch-katholisch
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Wohnort:	Ganghoferstraße 35
	80339 München
Eltern:	PD Dr. med. Rainer Kirchhoff, Arzt
	Dr. med. Gertrud Kirchhoff, geb. Zollner, Ärztin

Schulische Ausbildung:

1984-1988	Grundschule, München
1988-1993	Ludwigs-Gymnasium, München
1993-1997	Maximilians-Gymnasium, München

Grundwehrdienst:

01.07.1997 – 30.4.1998	Verteidigungsbezirkskommando 65, München

Studium

1998-2000:	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
2000-2003	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität, München

2003	Forschungsaufenthalt an der Universidad Catholica, Cordoba Argentinien
2003-2004	Praktisches Jahr an Lehrkrankenhäusern der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Beruflicher Werdegang

06/2004-09/2004:	Arzt im Praktikum an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt (Direktor: Prof. Dr. med. W. E. Mutschler)
01.10.2004	Approbation
Seit 01.10.2004	Assistent an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt (Direktor: Prof. Dr. med. W. E. Mutschler)

Mitgliedschaften

Deutsche Gesellschaft für Chirurgie

Sektion Chirurgische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie

Preise

Posterpreis der Vereinigung der Bayerischen Chirurgen 2005

10. Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wolf Mutschler, dem Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München, möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für seine ständige Unterstützung danken. Er wurde mir zum wissenschaftlichen und klinischen Lehrer, seiner Begeisterung und Begeisterungsfähigkeit für die Wissenschaft verdanke ich meinen bisherigen Werdegang, so ermöglichte er mir die aktive Teilnahme an unzähligen wissenschaftlichen Kongressen auf nationaler und internationaler Ebene.

Meinem Betreuer, Herrn PD Dr. Peter Biberthaler möchte ich für die Heranführung an das vielseitige Gebiet sehr danken. Durch seine Unterstützung und Anregungen wurde die Forschung für mich zum festen Bestandteil meines medizinischen Werdegangs. Unter seiner Anleitung erlernte ich das wissenschaftliche Arbeiten von der Versuchsplanung bis hin zur kritischen Interpretation der Daten und der Verfassung von Vorträgen. Er wurde mir zu einem guten Freund, dem ich zu großem Dank verbunden bin.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Dipl. Biol. Sigfried Zedler sowie Frau Maren Klein aus der Arbeitsgruppe Trauma von Herrn Prof. Eugen Faist am Klinikum Großhadern für die substantielle Unterstützung bei der Entwicklung der Methodik und insbesondere ihre Freundschaft bedanken.

Besonderer Dank gilt auch meinen Ko-Doktoranden in der Arbeitsgruppe „Trauma/Resuscitation“ für Ihre Hilfe bei den durchgeführten Untersuchungen und ihre Freundschaft.

Meinen geliebten Eltern und meiner Verlobten Dr. Sonja Buhmann danke ich für Ihr Verständnis und Ihre unerschöpfliche Geduld.