

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Stephan Kersting, MBA)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Die immunologische Dysfunktion nach operativem Trauma und der Einfluss
des *N. vagus* im Mausmodell**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald

2024

vorgelegt von:
Bastian Wenke
geb. am 05.09.1990
in Radebeul

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter/in: PD Dr. med. Pia Menges

2. Gutachter/in: PD Dr. med. Sven Flemming

Disputation: 26.01.2024

Für meine Großmutter Monika Köhler

01.12.1940 – 05.07.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	10
1.1 Immundysfunktion nach chirurgischem Trauma	10
1.1.1 Immunologische und klinische Aspekte	10
1.1.2 Tiermodell der Surgically-induced Immune Dysfunction (SID)	10
1.2 Cholinergere antiinflammatorischer Signalweg und Bedeutung der Milz.....	11
1.3 Akteure des Immunsystems in der postoperativen Immundysfunktion.....	12
1.3.1 Zytokine – Effektoren und Biomarker	12
1.3.2 Corticosteron.....	14
1.3.3 Indolamin-2,3-Dioxygenase.....	15
1.3.4 Zelluläre Bestandteile des Immunsystems	16
1.4 Ziele der Arbeit	19
2 Material.....	21
2.1 Laborgeräte	21
2.2 Verbrauchsmaterialien	22
2.3 Reagenzien und Chemikalien	23
2.4 Kits	23
2.5 Puffer, Medien und Lösungen	24
2.6 Biologisches Material	25
2.7 Antikörper	25
2.8 Software und Datenbanken	26
3 Methoden	27
3.1 Tierexperimentelle Methoden	27
3.1.1 Tierhaltung und Zucht	27
3.1.2 Versuchsaufbau	27

3.1.3	Intraperitoneale Narkose und Anästhesie	28
3.1.4	Operationsvor- und -nachbereitung.....	29
3.1.5	Surgically-induced Immune Dysfunction (SID)	29
3.1.6	Subdiaphragmale Vagotomie	29
3.1.7	Retroorbitale Blutentnahme und –aufarbeitung.....	30
3.1.8	Euthanasie der Versuchstiere	30
3.1.9	Organentnahme	30
3.2	Zell- und molekularbiologische Methoden	31
3.2.1	Splenozytenisolation und -aufarbeitung	31
3.2.2	Durchflusszytometrie.....	31
3.2.3	Vetscan HM5.....	31
3.2.4	Phagozytose-Assay	32
3.2.5	LPS-Stimulation von Milzzellen und Vollblut	32
3.2.6	Analyse der Aktivierung von CD4 ⁺ -Zellen in der Milz im Durchflusszytometer.....	33
3.2.7	Analyse der Expression von MHC-II und CD11b auf Splenozyten im Durchflusszytometer.....	34
3.2.8	Analyse der NK- und T-Zellpopulationen in der Milz im Durchflusszytometer.....	35
3.2.9	Quantifizierung von Zytokinen in Serum und Überstand im Cytometric Bead Array (CBA).....	35
3.2.10	Bestimmung der Corticosteron-Serumkonzentration im ELISA.....	36
3.2.11	Tandem-Massenspektrometrie.....	37
3.3	Statistik.....	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Immunologische Parameter nach SID und Vgx im Blut.....	39
4.1.1	Zellulärer Immunstatus im Vollblut	39
4.1.2	Zytokinprofil im Blutplasma nach SID.....	42

4.1.3	Zytokinsekretion nach LPS-Stimulation von Vollblut	44
4.1.4	Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten im Blut	45
4.1.5	Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)	46
4.1.6	Plasmakonzentration von Corticosteron.....	49
4.2	Immunologische Parameter nach SID und Vgx in der Milz	50
4.2.1	Anzahl der Splenozyten	50
4.2.2	Verteilung der B- und T-Lymphozyten in der Milz	51
4.2.3	Verteilung der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ - und T-Lymphozyten in der Milz.....	53
4.2.4	Verteilung der T _{eff} ⁻ und T _{reg} -Lymphozyten in der Milz.....	54
4.2.5	Aktivierungsniveau von T _{eff} ⁻ und T _{reg} -Lymphozyten in der Milz	56
4.2.6	Expression von CTLA-4 auf T _{eff} ⁻ und T _{reg} -Lymphozyten in der Milz	58
4.2.7	Verteilung der neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen in der Milz..	60
4.2.8	Verteilung von dendritischen Zellen und Expression von MHC-II in der Milz	62
4.2.9	Zytokinreaktion der Splenozyten nach LPS-Stimulation.....	63
5	Diskussion	65
5.1	Zellpopulationen und ihr Funktionszustand	65
5.1.1	Die Lymphozyten sind bereits früh nach SID reduziert und vollständig aktiviert	65
5.1.1.1	Immunsuppression durch Expansion der regulatorischen T-Lymphozyten und Steigerung von CTLA-4	67
5.1.2	Verminderte MHC-II-Expression auf dendritischen Zellen	67
5.1.3	Frühe Neutrophilie ohne Funktionsverlust.....	68
5.2	Mediatoren	69
5.2.1	Früher Anstieg proinflammatorischer Zytokine.....	69
5.2.2	Gesteigerte Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase	71
5.2.3	Anstieg der Corticosteron-Konzentration	72
5.3	Die LPS-Reaktion zeigte einen zeitabhängigen Verlauf	72

5.3.1	Zustand der LPS-Toleranz sechs Stunden nach SID.....	72
5.3.1.1	Regulatorische T-Zellen und ihr Einfluss auf die LPS-Toleranz.....	73
5.3.2	Entwicklung eines hyperinflammatorischen Phänotyps nach drei Tagen	74
5.4	Der Einfluss des <i>N. vagus</i> auf die Immundysfunktion	78
5.4.1	<i>N. vagus</i> und die humorale Immunantwort.....	78
5.4.2	<i>N. vagus</i> und die zelluläre Immunantwort	78
5.4.3	<i>N. vagus</i> als Suppressionsmechanismus der Zytokinfreisetzung.....	79
6	Fazit und Zusammenfassung	81
7	Literatur	83
8	Anhang	97
8.1	Antikörperfärbungen.....	97
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	99
8.3	Tabellenverzeichnis.....	100
8.4	Gatingstrategien	102
8.5	Ergänzende Daten	106
9	Danksagung.....	107

Abkürzungsverzeichnis

APC	antigenpräsentierende Zelle
AhR	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>
AP	Akute Peritonitis
bspw.	beispielsweise
ca.	circa
CAIP	<i>Cholinergic Antiinflammatory Pathway</i>
CARS	<i>Compensatory antiinflammatory response Syndrom</i>
CASP	<i>Colon Ascendens Stent Peritonitis</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CLP	<i>Cecal Ligation Puncture</i>
CRH	<i>Corticotropin Releasing Hormon</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4</i>
DAMP	<i>Danger-associated Molecular Patterns</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	<i>et alii</i>
GK	Glukokortikoide
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
HPA	<i>Hypothalamic–pituitary–adrenal Axis</i>
HSP	Hitzeschockprotein
IFN	Interferon
IgG/M	Immunglobulin G/M
IL	Interleukin
IMM	intestinales Manipulationsmodell
LPS	Lipopolysaccharid

MAMP	<i>Microbe-associated Molecular Patterns</i>
MHC-II	<i>Major Histocompatibility Complex II</i>
n	Stichprobenmenge
<i>N. vagus</i>	<i>Nervus vagus</i>
NKT-Zelle	Natural-Killer-T-Zelle
NK-Zelle	Natural-Killer-Zelle
OP	Operation
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PI	Propidiumiodid
Rag ^{-/-} -Mäuse	ein lymphozytendefizienter Mausstamm
SID	<i>Surgically-induced Immune Dysfunction</i>
SIRS	<i>Septic Inflammation Response Syndrome</i>
T _{eff}	Effektor-T-Zelle
TGF-β	<i>Tumor Growth Factor beta</i>
T _{H1} -Zelle	Typ1-T-Helferzelle
T _{H2} -Zelle	Typ2-T-Helferzelle
T _{H17} -Zelle	Typ17-Helferzelle
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF-α	<i>Tumor Nekrosis Factor alpha</i>
T _{reg} -Zelle	regulatorische T-Zelle
Vgx	Vagotomie

1 Einleitung

1.1 Immundysfunktion nach chirurgischem Trauma

1.1.1 Immunologische und klinische Aspekte

Jeder chirurgische Eingriff verursacht ein Gewebstrauma. In Abhängigkeit von der Operation, dem gewählten Zugang und der Operationstechnik ist dieses unterschiedlich stark ausgeprägt. Durch die resultierende Gewebsschädigung mit Zelluntergang werden aus den zerstörten Zellen Moleküle freigesetzt, die das Immunsystem aktivieren, sogenannte Alarmine oder *Danger-associated Molecular Patterns* (DAMPs). Oftmals handelt es sich dabei um intrazelluläre Bausteine oder Proteine, die in erster Linie eine andere Aufgabe erfüllen und in physiologischer Weise nicht mit dem Immunsystem in Kontakt kommen. Im Falle eines nekrotischen Zellunterganges werden sie allerdings freigesetzt und signalisieren dem Immunsystem mit ihrem Auftreten den Gewebeschaden. Beispiele für solche Moleküle sind S-100, Adenosintriphosphat (ATP), Hitzeschockprotein 70 (HSP-70) oder das *High-Mobility-Group-Protein Box 1* (HMGB1) [1–3]. In der Folge kommt es zu einer sterilen Inflammation mit bis hin zu einem der Sepsis ähnlichen Verlauf mit Ausprägung einer hyper-, aber auch antiinflammatorischen Phase [4–6]. Die Schwere dieser postoperativen Immunparalyse korreliert direkt mit der Länge und Schwere des chirurgischen Eingriffs [7]. In dieser Phase ist die Gefahr für den Patienten durch septische Komplikationen besonders hoch [8]. So ist die Mortalität einer abdominalen Sepsis nach einer Anastomoseninsuffizienz höher als im Fall einer perforierten Sigmadivertikulitis: Bei dieser ist das Immunsystem ohne vorhergehendes chirurgisches Trauma voll funktionsfähig [9–11].

1.1.2 Tiermodell der Surgically-induced Immune Dysfunction (SID)

Zur Untersuchung der Immundysfunktion nach abdominalchirurgischen Eingriffen wurde von unserer Arbeitsgruppe das Tiermodell der SID entwickelt [12]. Nach einer medianen Laparotomie wird der Dünndarm nach extrakorporal verlagert und zwischen zwei Wattestäbchen dreimal antegrad ausgestrichen. Initial als Ileusmodell etabliert, wird durch die mechanische Manipulation der Darmwand ein Trauma mit primär steriler Inflammation gesetzt. Im Verlauf kann es zu einer Translokation von

Bakterien durch die inflammatorisch veränderte Darmwand kommen [4, 13]. Es wird vermutet, dass residente Makrophagen der Darmwand über mechanosensible Kanäle aktiviert werden und die Entzündungskaskade starten. Wehner *et al.* konnten zeigen, dass eine Depletion dieser Makrophagenpopulation die lokale Inflammation stark vermindert [14]. Mit diesem Modell wird ein abdominalchirurgischer Eingriff simuliert: Auch dort ist der Darm unphysiologischer Manipulation ausgesetzt. Die Eröffnung des Peritoneums stellt ein zusätzliches Trauma dar.

1.2 Cholinerg antiinflammatorischer Signalweg und Bedeutung der Milz

Im Jahr 2000 postulierten Borovikova *et al.* die Existenz einer neuroimmunologischen Verschaltung, über die das Zentralnervensystem via den *Nervus vagus* (*N. vagus*) die Sekretion proinflammatorischer Zytokine in der Milz inhibieren kann [15, 16]. Dieser Signalweg wurde *Cholinergic Antiinflammatory Pathway* (CAIP) genannt. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Ausschüttung von Acetylcholin über einen alpha-7-nikotinergen Acetylcholinrezeptor ($\alpha 7nACh$ -Rezeptor) die Ausschüttung von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) aus Milzmakrophagen attenuiert wird. Vermutlich geschieht dies durch die Inhibierung der Translokation von NF- κ B und die Aktivierung des JAK2/STAT3-Signalweges [17–19]. Unterstützend konnte nachgewiesen werden, dass nach Vagotomie im Falle einer Sepsis deutlich gesteigerte Zytokinkonzentrationen mit erhöhter Mortalität auftreten [20, 21]. Weiter zeigten Huston *et al.* in einem Mausmodell, dass eine Splenektomie die TNF- α -Konzentration nach Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) um ca. 80 % senkt. Führt man anstatt der Splenektomie eine zervikale Vagusstimulation durch, so konnten sie die TNF- α -Konzentration um circa 77 % senken. Sie schlossen daraus, dass die Milz einer der Hauptproduktionsorte für TNF- α ist und der CAIP dessen Ausschüttung im Falle von inflammatorischen Stimuli wirksam inhibieren kann [22]. Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Vagotomie die Mortalität einer abdominalen Sepsis im murinen Modell in etwa verdoppelt (64,7 %, bzw. 34 %) [23]. Dieser antiinflammatorische Reflex scheint folglich den Organismus im septischen Geschehen vor Schaden durch eine überschießende inflammatorische Reaktion bewahren zu können. Nach abdominalchirurgischen Eingriffen könnte er aber zum Nachteil des Organismus wirksam werden: Es ist denkbar, dass der CAIP durch die

intestinale Inflammation via den afferenten Vagusschenkel, aber auch über die ausgeschütteten Entzündungsmediatoren aktiviert und auf Ebene der Milz immunmodulatorisch wirksam wird [24, 25].

1.3 Akteure des Immunsystems in der postoperativen Immundysfunktion

Zahlreiche Botenstoffe und Zellen sind zentrale Akteure in der postoperativen Immundysfunktion. Die für diese Arbeit wichtigsten sollen in der Folge vorgestellt werden.

1.3.1 Zytokine – Effektoren und Biomarker

Zytokine sind von Immunzellen sezernierte Botenstoffe, die zum einen der Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen des Immunsystems dienen, zum anderen aber auch direkt Wirkung auf Zellen außerhalb des Immunsystems haben. Im Folgenden sollen die für die Arbeit wichtigsten Zytokine thematisiert werden.

Interleukin 1 β (IL-1 β)

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β gehört zu den endogenen Pyrogenen. Seine Ausschüttung erfolgt auf einen inflammatorischen Reiz wie beispielweise Lipopolysaccharid (LPS) oder TNF- α . Zu den Hauptproduzenten gehören mononukleäre Zellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. IL-1 β wirkt pyretisch und bereitet das Endothel auf die Diapedese von Immunzellen vor. Außerdem induziert es die Freisetzung neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark, die Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen und die Ausschüttung von Interleukin 6 [26].

Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 gehört ebenfalls zu den proinflammatorischen Zytokinen. Seine Konzentration im Serum steigt in der Inflammation stark an, fällt aufgrund der äußerst geringen Halbwertszeit aber auch schnell wieder ab. Die Konzentration korreliert dabei mit dem Schweregrad der Sepsis [27]. Hauptproduzenten sind Zellen des mononukleären Phagozytosesystems, aber auch T-Zellen und körpereigene Zellen,

die nicht dem Immunsystem angehören, wie Fibroblasten, Endothelien und Muskelzellen. Wie IL-1 β wirkt auch IL-6 pyretisch und induziert die Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen, aber auch Cortisol. Bei B- und T-Zellen greift es in die Aktivierung, Differenzierung und Apoptose ein [28].

Interleukin 10 (IL-10)

IL-10 hat vor allem eine antiinflammatorische Wirkung und begrenzt die Ausprägung des Entzündungsgeschehens. Hauptproduzenten sind Monozyten und Typ2-T-Helferzellen (T_H2-Zellen). Es hemmt die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und die Antigen-Präsentation von Monozyten, während es ihre Phagozytoseleistung eher unterstützt. B-Zellen regt es zur Antikörperbildung an, Typ1-T-Helferzellen (T_H1-Zellen) dagegen werden gehemmt [29]. Im Überschuss kann IL-10 aber auch an der Ausprägung einer Immunparalyse beteiligt sein.

Tumornekrosefaktor α (TNF- α)

TNF- α ist zusammen mit IL1- β und IL-6 eines der zentralen proinflammatorischen Zytokine und in hohen Konzentrationen entscheidend beteiligt an der Entwicklung einer septischen Symptomatik. Hauptproduzenten sind Makrophagen, aber auch viele andere Immun- und Nicht-Immunzellen sind in der Lage, TNF- α zu produzieren. Es bewirkt eine Ausschüttung des *Corticotropin Releasing Hormons* (CRH), induziert Fieber und fördert die Insulinresistenz peripherer Gewebe. Ausgeschüttet ist es ein potenter Migrationsstimulus für neutrophile Granulozyten und aktiviert das Endothel entsprechend. Auf Makrophagen wirkt es phagozytosesteigernd und induziert die Freisetzung von IL1- β und Prostaglandin E₂ [30, 31].

Interleukin 12 (IL-12)

IL-12 ist ein proinflammatorisches Zytokin. Hauptproduzenten sind aktivierte dendritische Zellen und Makrophagen. Eine seiner Hauptwirkungen ist die Differenzierung von T-Zellen zu T_H1-Helferzellen. Damit stellt es eine Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem her. Außerdem induziert es die Ausschüttung von Interferon γ [32]. Das Zytokin besteht aus zwei Untereinheiten: IL-12p35 und IL-12p40. Zusammen bilden sie das biologisch aktive IL-12p70, welches in dieser Arbeit quantifiziert wird [33].

Interleukin 17 (IL-17)

IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches von Typ17-T-Helferzellen (T_H17-Zellen) recht früh sezerniert wird. Es induziert die Freisetzung weiterer Zytokine und chemischer Lockstoffe, wodurch verstärkt neutrophile Granulozyten und Monozyten aus dem Knochenmark mobilisiert und zum Ort der Inflammation rekrutiert werden. Auch das Endothel wird auf die Diapedese vorbereitet. Es verstärkt damit eine lokale Entzündung und unterstützt die Zellen des angeborenen Immunsystems [34].

Interferon γ (IFN- γ)

IFN- γ ist ein insbesondere durch antigenpräsentierende Zellen (APC), T_H1-Lymphozyten und CD8⁺-zytotoxische T-Lymphozyten gebildetes Zytokin mit immunmodulierenden anti-proliferativen und antiviralen Eigenschaften. In APC kann es die Expression des *Major Histocompatibility Complex II* (MHC-II) verstärken [35].

1.3.2 Corticosteron

Stress, physische Anstrengung und Traumata aktivieren die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) und verstärken so die Ausschüttung von Glukokortikoiden (GK) aus der Nebennierenrinde. Aufgrund einer abweichenden Enzymausstattung ist in Nagetieren, anders als beim Menschen, Corticosteron das Hauptglukokortikoid. Angeregt wird die HPA-Achse unter anderem durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IL-6 [36]. Die Corticosteronsekretion kann aber auch direkt durch *Microbe-associated Molecular Patterns* (MAMP) und DAMPs über durch die Nebennierenzellen exprimierte TLR2 und TLR4 gesteigert werden [37]. Als lipophiles Cholesterinderivat diffundiert Corticosteron durch die Zellwand und vermittelt seine Wirkung unter anderem über den zytosolischen Glukokortikoidrezeptor. Dieser kann in der Folge an die DNA binden und Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B inhibieren, wodurch die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine vermindert wird [38, 39]. Von wesentlichem Interesse wird die Frage sein, ob die Aktivierung der HPA-Achse nach SID abhängig von efferenten Vagusfasern oder humeral erfolgt.

1.3.3 Indolamin-2,3-Dioxygenase

Die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist ein in zahlreichen Geweben des Körpers exprimiertes Schlüsselenzym des Tryptophan-Katabolismus. Als Schlüsselenzym bestimmt es die Reaktionsgeschwindigkeit dieser essentiellen Aminosäure zu N-Formylkynurenin. Neben der metabolischen Rolle ist IDO aber auch in zahlreiche immunologische Prozesse involviert, wo es vor allem eine immunsuppressive Wirkung ausübt. Aber auch im inflammatorischen Geschehen wird die IDO-Expression in B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen durch Mediatoren wie Interferone, TNF- α und IL-10, sowie verschiedene TLR-Agonisten wie LPS oder CpG-Dinukleotide gesteigert [40, 41]. In septischen Patienten stellt eine hohe IDO-Aktivität einen negativen Prädiktor für das Überleben dar [42, 43].

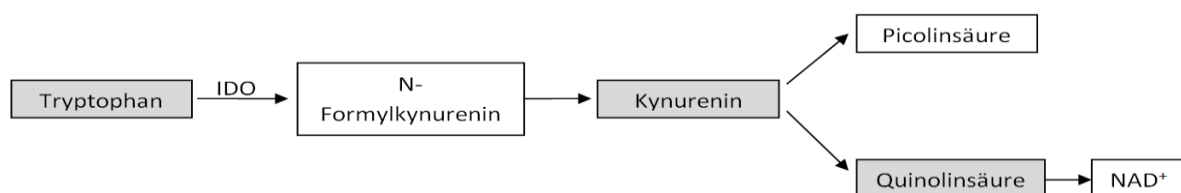


Abbildung 1: Der Tryptophan-Katabolismus

Die für Säugetiere essentielle Aminosäure Tryptophan wird im Organismus unter anderem für den katabolen Kynurenin-Stoffwechselweg benötigt. Der initiale Schritt ist die Umsetzung von Tryptophan zu N-Formylkynurenin unter Beteiligung des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO). Im weiteren Verlauf der Stoffwechsellkaskade entstehen zahlreiche Intermediate mit unterschiedlichen Eigenschaften. Am Ende des Abbaus werden unter anderem die als biochemische Cofaktoren benötigten Nicotinamidadenindinukleotide (NAD⁺) gebildet.

Vermittelt wird der immunsuppressive Effekt der IDO durch eine Reihe verschiedener Mechanismen. Durch die verstärkte IDO-Aktivität in aktivierten antigen-präsentierende Zellen (APC)s wird lokal ein tryptophanarmes Milieu geschaffen, welches in erster Linie die Proteinsynthese und Expansion aktivierter T-Zellen einschränkt [44, 45]. Aber auch Kynurenin und die weiter stromabwärts entstehenden Metabolite des Tryptophans wie Quinolinsäure induzieren in aktivierten T-Zellen Apoptose, während ruhende T-Zellen nicht betroffen sind [46–48]. Interessanterweise konnten Fallarino *et al.* 2002 demonstrieren, dass die proapoptotische Wirkung der Tryptophanmetabolite auf T_H1-differenzierte Lymphozyten wesentlich größer ist als auf T_H2-Lymphozyten [49]. Ein

korrespondierender T_H2 -Shift wurde von vielen Arbeitsgruppen nach Trauma beschrieben [50, 51]. Einen weiteren wichtigen Mechanismus stellt die Induktion von regulatorischen T-Zellen (T_{reg} s) aus naiven $CD4^+$ -Zellen unter Einwirkung des *Tumor Growth Factor beta* (TGF- β) durch Bindung von Kynurenin (Kyn) an den Transkriptionsfaktor Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) dar, wodurch IDO-exprimierende APCs in der Lage sind, den immunsuppressiven Zweig der adaptiven Immunantwort zu stärken [52–54]. Bemerkenswerterweise trifft dies aber auch in der Gegenrichtung zu. So induziert die Bindung von *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4* (CTLA-4), welches von T_{reg} s verstärkt exprimiert wird, an CD80/CD86 in APCs eine Steigerung der IDO-Aktivität [55, 56].

1.3.4 Zelluläre Bestandteile des Immunsystems

T-Lymphozyten

Die $CD4^+$ -T-Helfer-Lymphozyten sind Teil des adaptiven Immunsystems. Ihre Hauptfunktion liegt in der Wahrung der Selbsttoleranz, welche durch verschiedene Selektionsmechanismen im Thymus garantiert wird. Man unterscheidet verschiedene Unterkategorien, wie T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -T-Helferzellen. Im Kontext von MHC-II bekommen sie durch APCs wie dendritische Zellen, Makrophagen oder auch B-Zellen Peptidfragmente präsentiert. Findet über den T-Zellrezeptor (TCR) eine Bindung statt und exprimiert die APC gleichzeitig noch costimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86, so kommt es zu einer Aktivierung des T-Lymphozyten. Dieser proliferiert zu einer $CD4^+$ -Effektor-T-Zelle (T_{eff}), enthemmt seinerseits wiederum B-Lymphozyten und unterstützt das angeborene Immunsystem in seiner Funktion. So wird beispielsweise die Phagozytosefähigkeit von neutrophilen Granulozyten durch aktivierte T-Lymphozyten im septischen Geschehen gesteigert und so eine bessere Beseitigung von Pathogenen erreicht. [57]

Im posttraumatischen Setting ist die Funktionsfähigkeit dieses Systems auf verschiedenen Ebenen eingeschränkt. So sinkt die Anzahl der Lymphozyten in der Zirkulation [58, 59] und das Verhältnis der Zellpopulationen zueinander verschiebt sich.

Eine besondere Zellpopulation der T-Lymphozyten stellen die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) dar, denen vor allem eine immunsuppressive Rolle zugerechnet wird

[60, 61]. Von herausragender Bedeutung für ihre Funktion ist das Protein CTLA-4, welches in vielerlei Hinsicht immundämpfend wirkt. Auf aktivierten Effektor-T-Zellen exprimiert, konkurriert es mit CD28 um die Bindung an CD80/CD86, vermittelt aber ein inhibierendes Signal, indem es unter anderem die Transkription von IL-2 stoppt und ein Voranschreiten im Zellzyklus unterbindet [62–64]. Qurehi *et al.* beschreiben einen Mechanismus, nach dem die Bindung von CTLA-4 an CD80/CD86 die Transzytose und Degradierung der beiden costimulatorischen Moleküle durch die CTLA-4-tragende Zellen auslöst. Dadurch wird das stimulatorische Potential der APC stark eingeschränkt [65]. Die Wirkungsweise von CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen ist noch nicht vollständig erforscht. Allerdings scheint der Einfluss bedeutend zu sein, da CTLA-4-defiziente T_{reg} s ihrer T_{eff} -suppressiven Eigenschaften beraubt sind, was zu einer schnell voranschreitenden lymphoproliferativen Erkrankung und Autoimmunität führt [66].

Dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen

Dendritische Zellen sind eine der wichtigsten antigenpräsentierenden Zellpopulationen (APC) der Milz. Aktivierte dendritische Zellen phagozytieren Antigene und präsentieren den T-Lymphozyten prozessierte Fragmente dieser Proteine über MHC-II auf ihrer Zelloberfläche. Vorher durchläuft die dendritische Zelle einen Reifungsprozess, in dem MHC-II und verschiedene costimulatorische Proteine hoch reguliert werden [67]. Erkennt der Lymphozyt ein solches Antigen mit seinem T-Zellrezeptor (Schlüssel-Schloss-Prinzip) im Kontext von costimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86, wird dieser aktiviert und kann nun seinerseits B-Zellen enthemmen. Durch die Sekretion verschiedener Zytokine kann die dendritische Zelle auch die Polarisation der T-Zellen in Richtung T_H1 (IL12) oder T_H2 (IL-10) steuern. Obgleich selbst dem angeborenen Immunsystem zugehörig kommt ihnen folglich eine zentrale Rolle in der Initiierung einer adaptiven Immunantwort zu. Durch ihre starke Expression von MHC-II und den costimulatorischen Molekülen sind sie die potentesten Aktivatoren von T-Zellen [68]. Bei postoperativen Patienten konnte eine in ihrer Schwere von Länge und Ausmaß der Operation abhängige Suppression von MHC-II-Proteinen auf Makrophagen nachgewiesen werden [7].

Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind Teil des angeborenen Immunsystems und stellen im inflammatorischen Geschehen die erste Verteidigungslinie dar. Sie werden durch verschiedene Entzündungs- und Stressmediatoren wie Chemokine und Zytokine schnell rekrutiert und migrieren zum Ort der Entzündung, wo sie durch Phagozytose, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, die Sekretion eigener Mediatoren und andere Mechanismen die lokale Entzündung unterhalten und vorhandene Pathogene eliminieren. Es ist bekannt, dass nach endogenem, aber auch exogenem Trauma oftmals eine Abnahme der Abwehrleistung von neutrophilen Granulozyten auftritt, wodurch konsekutive Infektionen begünstigt werden [69, 70].

1.4 Ziele der Arbeit

In bereits durchgeführten Projekten konnte gezeigt werden, dass es im Tiermodell „Surgically-induced Immune Dysfunction“ (SID) zu einer verminderten *ex-vivo* LPS-Stimulierbarkeit von Splenozyten kommt [12]. Außerdem waren nach SID eine Lymphopenie sowie erhöhte Corticosteron-Spiegel als Zeichen der Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse nachweisbar [7]. Als weiteres Anzeichen einer reduzierten Immunabwehr konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass die SID die Mortalität bei Pankreaskarzinomen steigert [71]. Die SID stellt demnach ein geeignetes Modell zur Untersuchung der postoperativen Immundysfunktion dar. Weiterhin liegt die Vermutung nahe, dass der CAIP über die Milz diese Veränderung zumindest anteilig begünstigt. In dieser Arbeit soll untersucht werden, durch welche weiteren immunologischen Veränderungen sich die postoperative Immunsuppression auszeichnet und ob diese durch den *N. vagus* moduliert werden.

Damit ergeben sich für diese Arbeit zwei zentrale Fragen:

- Welche Veränderungen sind nach SID auf Ebene des angeborenen und des adaptiven Immunsystems nachweisbar? Dabei sind die Kompartimente der Milz und das Blut von besonderem Interesse, da die Milz als zentrales immunologisches Organ und das Blut als Kompartiment des „zirkulierenden Immunsystems“ von herausstechender Bedeutung sind.
- Welchen Einfluss hat dabei der *N. vagus* auf die Vorgänge im Immunsystem?

Zur Beantwortung dieser Frage wird sechs Tage vor SID eine Vagotomie durchgeführt. Anschließend werden 6 h und 72 h nach SID die Versuchstiere geopfert und den nachfolgenden Analysen zugeführt. Hierfür werden Splenozyten und Blutzellen mit LPS stimuliert sowie eine Untersuchung der Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten vorgenommen. Außerdem wird ein Blutbild erstellt und die Konzentration ausgewählter Plasmazytokine sowie des Corticosterons bestimmt. Durch Einsatz eines Massenspektrometers soll die Aktivität derIDO als zentrales Enzym in immunologischen Vorgängen quantifiziert und im Durchflusszytometer die Zellzusammensetzung und Expression ausgewählter Marker von Splenozyten näher betrachtet werden. Hierdurch soll ein besseres Verständnis für die pathophysiologischen Vorgänge nach abdominalchirurgischen Operationen

gewonnen werden, damit langfristig eine Lösung für diese klinische Problematik entwickelt werden kann.

2 Material

2.1 Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
VetScan HM5	Abraxis, Union City, USA
Durchflusszytometer LSR II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kryostat CM3050 S	Leica, Wetzlar
CD+Labs Kleintieroperationssystem	Southmedic, Ontario, Canada
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence, Osaka, Japan
CO ₂ -Brutschrank CB 150	Binder, Tuttlingen
Tecan Infinite M200 Pro	Tecan Trading AG, Switzerland
Pinzetten	Aesculap, Tuttlingen
Mikroschere, Schere	Aesculap, Tuttlingen
Nadelhalter	Aesculap, Tuttlingen
Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel
Vortex Mixer V-1 Plus	Biosan, Riga, Lettland
OP-Mikroskop M651	Leica, Wetzlar
Elektrokauter	Faromed, Berlin
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Wärmeunterlage Thermolux	Witte + Sutor, Murrhardt
Versuchstierinkubator Uni-Protect	Ehret Labor- u. Pharmatechnik, Emmendingen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
25 ml Röhrrchen	Sarstedt, Nürnbergrecht
5 ml + 50 ml Röhrrchen Falcon	Corning Incorp., Corning, USA
96-Well-Platte, Cellstar, U-bottom	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
EDTA 1,3 ml Tube	Sarstedt, Nürnbergrecht
Einmalkanüle Microlance 20G, 24G	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Einmalspritze Injekt 5 ml	Braun, Bethlehem, USA
Einmalspritze Plastipak 1 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Kapillare 20 µl EDTA (K2E)	Sarstedt, Nürnbergrecht
Kompressen 5 x 5 cm	Fuhrmann, Much
Leukoplast	BSN Medical, Hamburg
Li-Heparin 1,3 ml Tube	Sarstedt, Nürnbergrecht
Meriderm schwarz 7/0 USP	Catgut, Markneukirchen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polyester weiß 4/0 USP	Catgut, Markneukirchen
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nürnbergrecht
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Tissue-Tek Cryomold Einbettschälchen	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude Niederlande
Tissue-Tek O.C.T. Einbettmedium	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude Niederlande
Wattestäbchen, steril	
Zellsieb 70 µm Falcon	Corning Incorp., Corning, USA

2.3 Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller
A. bidest.	
BD CompBeads	Becton Dickinson, San Jose, USA
BD Trucount Tubes	Becton Dickinson, San Jose, USA
Ethanol 70%, MEK-vergällt	Universitätsapotheker, Greifswald
FACS Clean Solution	Becton Dickinson, San Jose, USA
FACS Rinse Solution	Becton Dickinson, San Jose, USA
FACSFlow Sheath Fluid	Becton Dickinson, San Jose, USA
LPS <i>E. coli</i> 055:B5	Sigma-Aldrich, St. Luis, USA
Natriumchlorid-Lösung, 0,9%	Berlin-Chemie, Berlin
PBS, 10x	Sigma-Aldrich, St. Luis, USA
RBC Lyse-Puffer (10x)	Biolegend, San Diego, USA

2.4 Kits

Kit	Katalognummer	Hersteller
Foxp3 Staining Buffer Set	130-093-142	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CBA FlexSet mouse IL1 β	560232	Becton Dickinson, San Jose, USA
CBA FlexSet mouse IL6	558301	Becton Dickinson, San Jose, USA
CBA FlexSet mouse IL10	558300	Becton Dickinson, San Jose, USA
CBA FlexSet mouse IL12p70	558303	Becton Dickinson, San Jose, USA
CBA FlexSet mouse IL17A	560283	Becton Dickinson, San Jose, USA
CBA FlexSet mouse TNF α	558299	Becton Dickinson, San Jose, USA
CBA FlexSet mouse IFN γ	558296	Becton Dickinson, San Jose, USA
Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit	558267	Becton Dickinson, San Jose, USA

Phagotest	10-0100	Glycotope Heidelberg	Biotechnology,
HMGB1 ELISA	ST51011	IBL International, Hamburg	
Corticosteron (Rat/Mouse) ELISA	EIA-5186	DRG Instruments, Marburg	

2.5 Puffer, Medien und Lösungen

Injektionsnarkose Ketamin/Xylazin

0,5 ml Xylasel	20 mg/ml Injektionslösung, Xylazinhydrochlorid, Selectavet Dr. Otto Fischer, Zul.-Nr: 400300.00.00
1 ml Ketamin 10 %	10 mg/ml Injektionslösung, Ketaminhydrochlorid, Selectavet Dr. Otto Fischer, Zul.-Nr: 9089.01.00
8,5 ml 0,9 % Natriumchlorid-Lösung	Berlin-Chemie, Berlin

FACS-Puffer

2 mM EDTA	200 mM, neoLab Migge, Heidelberg
2 % FCS	Biochrom, Berlin
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Luis, USA

Zell-Medium

RPMI 1640 + GlutaMAX	Life Technologies, Carlsbad, USA
10 % FCS	Biochrom, Berlin
50 µg/ml Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Carlsbad, USA
0,05 mM β-Mercaptoethanol	Life Technologies, Carlsbad, USA

2.6 Biologisches Material

Material	Hersteller
C57BL/6N Mäuse	Charles River Laboratories, Sulzfeld

2.7 Antikörper

Spezifität	Konjugat	Host	Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller	Verdünnung
7AAD						BD512359KC, L.76401	
Anti-Arm. & Syrian Hamster IG	Biotin		IgG1, κ + IgG2b, κ	G70-204 + G94-56	0,5 mg/ml	BD 554010	1:200
B220	V500	rat	IgG2a, κ	RA3-6B2	0,2 mg/ml	BD 561226, L. 04335	1:50
CD11b	APC-A780	rat	IgG2b, κ	M1/70	0,2 mg/ml	eBioscience 47-0112-82, L. E10339-1637	1:50
CD11b	V450	rat	IgG2b, κ	M1/70	0,2 mg/ml	BD 560455, L. 85417	1:200
CD11c	FITC	Arm. Hamster	IgG1, λ2	HL3	0,5 mg/ml	BD 557400, L. 78595	1:50
CD19	A647	rat	IgG2a, κ	eBio1D3 (1D3)	0,2 mg/ml	eBioscience 51-0193-82, L. E08560-1630	1:100
CD25	PE-Cy7	rat	IgG1, λ	PC61.5	0,2 mg/ml	eBioscience 25-0251-82, L. E07536-1630	1:50
CD3e	V500	Hamster	500A2	500A2	0,2 mg/ml	BD 560771, L. 80245	1:50
CD4	FITC	rat	IgG2b, κ	L3T4	0,5 mg/ml	BD 553729, L. 68488	1:50
CD4	PE	rat	IgG2a, κ	RM4-5	0,2 mg/ml	BD 553049, L. 42069	1:500
CD4	A700	rat	IgG2a,κ	GK1.5	0,5 mg/ml	Biologend 100536, L. B155549	1:50
CD49b	FITC	rat	IgM, κ	DX5	0,5 mg/ml	Pharmingen 09944D, L. M026781	1:50
CD69	PE	Arm. Hamster	IgG1, λ3	H1.2F3	0,2 mg/ml	BD 553237, L. 28310	1:50
CD8a	Biotin	rat	IgG2a,κ	53-6.7	0,5 mg/ml	Biologend 100704, L. B144948	1.50
CTLA-4	pure	Hamster	IgG1, κ	UC10-4F10-11	0,5 mg/ml	BD 553719, L. 0000064169	1:50
Fc-Block						Miltenyi 130-092-575, L. 5100928131	1 µl pro 2x10 ⁶ Zellen
Foxp3	APC	mouse	IgG1	3G3	unbekannt	Miltenyi 130-093-013, L. 5110616121	1:12,5

Ly6G	V450	rat	IgG2a, κ	1A8	0,2 mg/ml	BD 560603, L. 75483	1:200
MHC-II	Biotin	rat	IgG2b, κ	M5/114 .15.2	0,5 mg/ml	eBioscience 13-5321-82, L. E02876-280	1:200
NK1.1	PE	rat	IgG2a, κ	PK136	0,2 mg/ml	eBioscience 12-5941-82, L. E034025	1:50
Streptavidin	PE				0,2 mg/ml	eBioscience 12-4317-87	1:200
Streptavidin	PE-Cy7				0,2 mg/ml	eBioscience 25-4317-82, L. E07615-1597	1:500
	pure	Hamster	IgG1, κ	A19-3	0,5 mg/ml	BD 553969, L.3074739	1:50
	PE-Cy7	rat	IgG1, λ	EBRG1	0,2 mg/ml	eBioscience 25-4301	1:50
	PE	Arm. Hamster	IgG1, λ1	G235-2356	0,2 mg/ml	BD 553954	1:50

2.8 Software und Datenbanken

Software	Hersteller
Citavi 5.5	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
FACS Diva Software v6.2	BD Biosciences, San Jose, USA
FCAP Array v3.0.1	Soft Flow, Pécs, Ungarn
FlowJo v10.1	Tree Star Inc., OR, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., CA, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft, Redmond, USA
NCBI Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

3 Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden

3.1.1 Tierhaltung und Zucht

Für die tierexperimentellen Versuche wurden Mäuse des Stammes C57BL/6N im Alter von 10-12 Wochen verwendet. Die Tiere wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) im Alter 4-8 Wochen gekauft. Vor Beginn der Versuche wurde ihnen mindestens 2 Wochen Akklimatisationszeit gewährt. Die Haltung erfolgte in der ZSFV Greifswald (Walther-Rathenau-Straße 49A, 17489 Greifswald) unter konventionellen Bedingungen in offenen Käfigen. Es wurden maximal sechs Tiere in einem Käfig auf Einstreu gehalten, mit Trinkwasser *ad libitum* und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Wechsel. Alle Versuche erfolgten in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und nach Genehmigung durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-VL/TSD/7221.3-1.1-045/12-4).

3.1.2 Versuchsaufbau

Um die postoperative Immundysfunktion und den Einfluss des *N. vagus* näher charakterisieren zu können, wurde eine Versuchsgruppe sechs Tage vor SID einer Vagotomie unterzogen. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte dann die SID. Als Kontrollgruppen dienten eine SID-operierte Gruppe ohne vorhergehende Vagotomie (Gruppe 1) und eine komplett unbehandelte Gruppe (Gruppe 3). Zum Zeitpunkt der Organentnahme sechs Stunden beziehungsweise drei Tage nach SID erfolgte die Opfierung aller Tiere eines Versuchsdurchlaufs und die entnommenen Organe wurden den Analysen zugeführt. Die Gruppengröße lag zu Beginn des Versuchs bei 12 Tieren pro Zeitpunkt und Gruppe. Abweichungen von dieser Zahl in den einzelnen Analysen entstanden durch ein verstorbenes Versuchstier oder zu geringe Probenmengen für die Durchführung der jeweiligen Analyse. An jedem Versuchstag wurden 2-3 unbehandelte Kontrolltiere mitgeführt. Für die Kontrollgruppe wurden diese zusammengefasst und als Kontrolle für beide Zeitpunkte verwendet.

Tabelle 1: Gruppenaufbau zur Untersuchung der immunologischen Dysfunktion nach operativem Trauma unter Einfluss des *N. vagus*

Bei C57BL/6N-Mäusen wurde eine Vagotomie durchgeführt. Sechs Tage später wurde durch SID ein Trauma induziert und nach weiteren 6 bzw. 72 h die Organentnahme durchgeführt. Als Kontrollen dienten SID-operierte Tiere und unbehandelte Tiere.

	Organentnahme nach SID	Intervention	n=
Gruppe 1	6 h	SID	12
	72 h	SID	11
Gruppe 2	6 h	Vgx + SID	11
	72 h	Vgx + SID	12
Gruppe 3	-	Unbehandelt	13

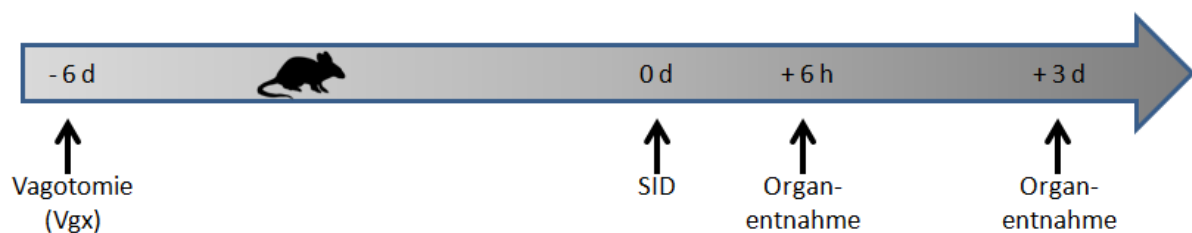


Abbildung 2: Zeitstrahl des Versuches zur Untersuchung der immunologischen Dysfunktion nach operativem Trauma unter Einfluss des *N. vagus*

Eine Versuchsgruppe erhielt 6 Tage vor SID eine Vagotomie. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die SID in den definierten Versuchsgruppen. Anschließend blieben die Tiere entweder 6 Stunden oder 3 Tage lang sitzen, bevor die Organentnahme und die Analyse durchgeführt wurden.

3.1.3 Intraperitoneale Narkose und Anästhesie

Die Narkose erfolgte durch die Applikation von 10 µl/g Körpergewicht einer definierten Ketamin/Xylazin-Lösung intraperitoneal (i.p.) in den unteren linken Quadranten. Vor Versuchsbeginn wurde die Narkosetiefe durch die fehlende Auslösbarkeit des Zwischenzehensreflexes getestet.

3.1.4 Operationsvor- und -nachbereitung

Die Versuchstiere wurden vor Beginn der Narkose für 5 Minuten unter Rotlicht gehalten und auch nach Narkoseapplikation so belassen. Es wurde darauf geachtet, dass im Käfig keine zu hohen Temperaturen entstanden. Die Operationen erfolgten auf elektrischen Wärmeplatten, auf denen die Tiere an den Pfoten mit Leukoplast fixiert wurden. Jedem Eingriff ging eine Desinfektion des Abdomens mit 70-%igem Alkohol voraus. Es wurde desinfiziertes, aber unsteriles OP-Besteck verwendet. Vor dem Wundverschluss wurden den Tieren 500 µl einer angewärmten 0,9-%igen Natriumchloridlösung zum Flüssigkeitsausgleich in den Bauchraum gegeben. Das Aufwachen erfolgte in den Käfigen auf einer weiteren Wärmeplatte unter Abdeckung des Käfigs mit einem Filtertop zur Verminderung konvektionsbedingten Körperwärmeverlustes.

3.1.5 Surgically-induced Immune Dysfunction (SID)

Wie von Koerner *et al.* erstmals beschreiben, wurden die Versuchstiere durch einen medianen circa 1,5 cm langen Hautschnitt laparotomiert [12]. Anschließend wurde das Peritoneum, unter Schonung der Gefäße, entlang der Linea alba in gleicher Länge durchtrennt. Mit angefeuchteten, sterilen Wattetupfern wurde danach im rechten unteren Quadranten das Caecum aufgesucht und nach außen verlagert, wo es auf das OP-Feld umschließende, angefeuchtete Kompressen abgelegt wurde. Vom terminalen Ileum ausgehend wurde nun der restliche Dünndarm bis zum Treitz-Band ebenfalls nach außen verlagert und abgelegt. Anschließend wurde vom Duodenum aus beginnend der Dünndarm zwischen den Wattestäbchen dreimal sanft in Richtung Caecum unter Mitnahme des Darminhaltes antegrad ausgestrichen, wobei Einblutungen möglichst vermieden wurden. Nach Beendigung wurde der Darm in umgekehrter Reihenfolge wieder in das Abdomen verlagert und das Peritoneum sowie die Haut mit 4/0 Polyester verschlossen.

3.1.6 Subdiaphragmale Vagotomie

Verwendet wurde eine leicht modifizierte subdiaphragmale Vagotomie nach Kessler *et al.* [23]. Am Versuchstier wurde ein circa 1,5 cm langer, medianer Hautschnitt, beginnend kurz unter dem Sternum, vorgenommen. Nach Durchtrennung des Peritoneums entlang der Linea alba und Freilegung des Processus xyphoideus

wurde die Laparatomie durch ein magnetisch gehaltenes Wundhakensystem offen gehalten. Mit einem weiteren Haken wurde die Leber nach kranial verlagert und so aus dem Operationsgebiet gehalten. Nach Freilegung des Ösophagus und leichter Verlagerung des Magens nach kaudal konnte der vordere Vagusast unter 16-facher Vergrößerung mikrochirurgisch durchtrennt werden. Dies geschah möglichst weit kranial, vor der Abgabe erster Nervenfasern. Anschließend wurde unter leichter seitlicher Verlagerung des Ösophagus auch der hintere Vagusast durchgetrennt. Nach Reposition von Magen und Leber wurden das Peritoneum und die Haut mit 4/0 Polyester verschlossen.

3.1.7 Retroorbitale Blutentnahme und –aufarbeitung

Unter Ketamin/Xylazin-Narkose wurden die Versuchstiere zum Zeitpunkt der Organentnahme durch Punktierung des Retroorbitalplexus mittels einer 20 µl EDTA-Kapillare ausgeblutet. Zum 6-h-Zeitpunkt wurden zuerst 250 µl in einem EDTA-Blutentnahmeröhrchen gesammelt und der Rest in einem Lithium-Heparin-Röhrchen. Zum 72-h-Zeitpunkt wurde das gesamte Blutvolumen in Lithium-Heparin-Röhrchen gesammelt. Im Anschluss wurde das Blut auf Eis bis zur weiteren Verarbeitung zwischengelagert.

Zur Gewinnung von Blutplasma wurden die Blutproben zweimal mit 13.000 g zentrifugiert und anschließend in Aliquoten bei -80 °C weggefroren.

3.1.8 Euthanasie der Versuchstiere

Nach Sistieren des Blutflusses wurden die Versuchstiere in tiefer Injektionsnarkose schmerzlos durch zervikale Dislokation getötet.

3.1.9 Organentnahme

Nach Durchführung der zervikalen Dislokation wurde das Abdomen durch eine mediane Laparatomie eröffnet. Den Tieren wurde die Milz entnommen und in PBS + 10 % FCS auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert. Allen Tieren wurden die mesenterialen Lymphknoten entnommen und in Tissue-Tek Einbettmedium weggefroren.

3.2 Zell- und molekularbiologische Methoden

3.2.1 Splenozytenisolation und -aufarbeitung

Die Milz wurde unter Spülung mit FACS-Puffer durch ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Reaktionsgefäß gedrückt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit FACS-Puffer auf 35 ml aufgefüllt und für 10 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden 5 ml des Erythrozytenlysepuffers zugegeben und nach sofortigem Vortexen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion mit 20 ml FACS-Puffer abgestoppt, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Zellpellet in 3 ml FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellzahl wurde durch BD Trucount im Durchflusszytometer bestimmt.

3.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine immunologische Methode, bei der eine Partikelsuspension mit meist Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern inkubiert wird. Hierbei kann es sich beispielsweise um Zellen oder auch Kunststoffteilchen handeln. Diese konjugierten Partikel werden anschließend vom Durchflusszytometer in einer dünnen Kapillare vereinzelt und nacheinander an Laser verschiedener Wellenlängen vorbeigeführt. Dadurch werden die gekoppelten Fluorochrome auf ein höheres Energieniveau gehoben und emittierend bei Rückfall auf ihr Ausgangsniveau ihrerseits Licht bestimmter Wellenlängen. Über Photosensoren kann dieses emittierte Licht auf Einzelzellebene detektiert werden, wobei die Intensität unter anderem mit der Menge der gebundenen Antikörper und somit der Expression der Zielstrukturen korreliert.

3.2.3 Vetscan HM5

Zur Erstellung eines großen Blutbildes wurde der Vetscan HM5 verwendet. Unter Verwendung von 40 µl Vollblut errechnet das Gerät durch Impedanzmessung, spezielle Lyseverfahren und Spektrophotometrie ein Differentialblutbild sowie grundlegende Eigenschaften von Thrombozyten und Erythrozyten.

3.2.4 Phagozytose-Assay

Die Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Phagozytose-Assays gemessen. Hierfür werden im Vollblut vorhandene neutrophile Granulozyten über die Zugabe von Propidiumjodid (PI) sowie einen Fluorochrom-gekoppelten Ly6G-Antikörper identifiziert. Die wurde mit ebenfalls Fluorochrom-gekoppelten, attenuierten *Escherichia coli* (*E. coli*) inkubiert. Im Durchflusszytometer konnte anschließend über die Signalintensität der *E. coli* in den neutrophilen Granulozyten eine relative Aussage zur phagozytierten Menge an Bakterien getroffen werden.

Dafür wurden 50 µl heparinisertes Vollblut in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min im Eisbad mit 0,5 µl Fc-Block inkubiert. Anschließend wurden 5 µl eines 1:200 verdünnten Ly6G-V450-Antikörpers zur Markierung der neutrophilen Granulozyten hinzugegeben und weitere 20 min im Eisbad belassen. Danach wurden 10 µl einer vorgekühlten FITC-markierten attenuierten *E.-coli*-Suspension zugegeben und für 10 min im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert, während ein Röhrchen zur Negativkontrolle im Eisbad verblieb. Anschließend wurden die Proben mit 50 µl einer gekühlten Quenching-Lösung versetzt und die Reaktion mit 3 ml kaltem Waschpuffer abgestoppt. Danach wurden die Proben mit 410 G und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zur Entfernung der Erythrozyten wurde anschließend 1 ml eines Lyse-Puffers hinzugegeben und die Röhrchen für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal gewaschen und zur Färbung der DNA mit 50 µl einer PI-Lösung versetzt und für weitere 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen. Im Anschluss wurden alle Ansätze innerhalb von 30 min im Durchflusszytometer gemessen. Für die Aufnahme wurden die neutrophilen Granulozyten über den Farbstoff ausgewählt und mindestens 30.000 von ihnen gezählt. Die Gatingstrategie ist in Abbildung 22 dargestellt.

3.2.5 LPS-Stimulation von Milzzellen und Vollblut

Zur Quantifizierung der Stimulierbarkeit durch einen inflammatorischen Reiz wurden Milzzellen und Vollblut mit einer definierten Konzentration von LPS versetzt, um dann in einem zweiten Schritt die sezernierte Menge an Zytokinen im Überstand zu

quantifizieren. Dafür wurden nach der Zählung der Milzzellen 10^7 Zellen entnommen und mit Zellmedium auf 1 ml resuspendiert. Anschließend wurden drei Wells einer 96-Well-Platte mit jeweils 100 μ l der Zellsuspension versehen und in jedes Well 100 μ l einer LPS-Lösung gegeben, die 25 μ g/ml LPS, gelöst in Zellmedium, enthielt. Die Endkonzentration im Well betrug so 12,5 μ g/ml. In drei weiteren Wells wurde die Zellsuspension mit 100 μ l Zellmedium als Kontrolle inkubiert.

Für die Stimulation des Vollblutes wurden 100 μ l Blut zusammen mit 25 μ l einer LPS-Lösung inkubiert, die 65,5 μ g/ml LPS, gelöst in Zellmedium, enthielt. Weitere 100 μ l Vollblut wurden mit 25 μ l Zellmedium zur Kontrolle versetzt.

Im Anschluss wurden die Proben über 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Milzproben mit 300 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, die Überstände der einzelnen Versuchstiere gepoolt und anschließend aliquotiert. Die Vollblutproben wurden bei 1880 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Alle Aliquots wurden anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Messung gelagert.

3.2.6 Analyse der Aktivierung von CD4⁺-Zellen in der Milz im Durchflusszytometer

Um die Aktivierung von CD4⁺-Effektor- und regulatorischen T-Zellen in der Milz zu bestimmen, wurden auf diesen die Marker CD69, CD25 und CTLA4 angefärbt und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Eine Auflistung der verschiedenen Färbungen findet sich in Tabelle 2.

Für diesen Versuch wurden von jedem Versuchstier 2×10^6 vereinzelte Milzzellen pro Versuchsansatz mit 2 ml FACS-Puffer bei 300 g und 4 °C für 6 min gewaschen. Nach dem Abkippen des Überstandes wurde 1 μ l Fc-Block zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l des primären Antikörpergemischs zugegeben und nach der Durchmischung für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Hierauf folgte ein weiterer Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer (300 g, 6 min, 4 °C) und die darauffolgende Fixation und Permeabilisierung mit 1 ml der Fix- und Permlösung aus dem *Foxp3 Staining Buffer Set* (Miltenyi Biotec) für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Daraufhin wurden die Proben je einmal mit 1 ml kaltem FACS-Puffer und 1 ml Permeabilisierungspuffer gewaschen (300 g, 6 min, 4 °C) und

danach eine erneute Blockade der Fc-Rezeptoren durchgeführt (5 min, 4 °C, dunkel). Dann erfolgte die Inkubation aller Proben mit dem Sekundärmastermix (30 min, 4 °C, dunkel) sowie im Anschluss ein Waschschrift mit 1 ml Permeabilisierungspuffer (300 g, 6 min, 4 °C). Nach dem Abkippen des Überstandes konnten Färbung 1 und 2 anschließend in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und am LSR-II gemessen (100.000 *events*) werden. Die Färbungen 3 und 4 wurden nach dem letzten Waschschrift mit dem Tertiärantikörpergemisch versetzt und inkubiert (30 min, 4 °C, dunkel) und mit 1 ml Permeabilisierungspuffer gewaschen (300 g, 6 min, 4 °C). Zum Schluss wurden die beiden Färbungen mit ihrem Quartärantikörpergemisch inkubiert (30 min, 4 °C, dunkel). Nach dem Waschen mit 1 ml Permeabilisierungspuffer (300 g, 6 min, 4 °C) konnten auch diese Proben mit 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und am Durchflusszytometer (100.000 *events*) gemessen werden. Eine Auflistung der verwendeten Antikörper sowie Sekundär- und Tertiärreagenzien findet sich in Tabelle 3 und Tabelle 4. Die Gatingstrategie ist in Abbildung 23 dargestellt.

3.2.7 Analyse der Expression von MHC-II und CD11b auf Splenozyten im Durchflusszytometer

Zur näheren Untersuchung des Immunstatus wurden auf dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten und B-Zellen CD11b und MHC-II durchflusszytometrisch quantifiziert. Für Details der Färbung sind in Tabelle 5 aufgeführt

Dafür wurden von jedem Versuchstier 2×10^6 vereinzelte Milzzellen pro Versuchsansatz mit 2 ml FACS-Puffer bei 300 g und 4 °C für 6 min gewaschen. Nach dem Abkippen des Überstandes wurde 1 µl Fc-Block zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 µl des primären Antikörpergemischs zugegeben und nach der Durchmischung für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Hierauf folgte ein weiterer Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer (300 g, 6 min, 4 °C) und die Inkubation aller Proben mit dem Sekundärmastermix (30 min, 4 °C, dunkel). Zum Schluss wurden nach einem letzten Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer (300 g, 6 min, 4 °C) die Proben in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und am LSR-II gemessen (100.000 *events*). Eine Auflistung der verwendeten Antikörper und sowie Sekundärreagenzien findet sich in Tabelle 6 und

Tabelle 9. Die Gatingstrategie ist in Abbildung 24 dargestellt.

3.2.8 Analyse der NK- und T-Zellpopulationen in der Milz im Durchflusszytometer

In einer weiteren durchflusszytometrischen Messung wurden die NK- und T-Zellpopulationen in der Milz näher bestimmt. Für eine Aufstellung der Färbung siehe Tabelle 7.

Dafür wurden von jedem Versuchstier 2×10^6 vereinzelte Milzzellen pro Versuchsansatz mit 2 ml FACS-Puffer bei 300 g und 4 °C für 6 min gewaschen. Nach dem Abkippen des Überstandes wurde 1 µl Fc-Block zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 µl des primären Antikörpergemischs zugegeben und nach der Durchmischung für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Hierauf folgte ein weiterer Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer (300 g, 6 min, 4 °C) und die Inkubation aller Proben mit dem Sekundärmastermix sowie 20 µl 7-AAD (30 min, 4 °C, dunkel). Zum Schluss wurden nach einem weiteren Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer (300 g, 6 min, 4 °C) die Proben in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und am LSR-II gemessen (100.000 *events*). Eine Auflistung der verwendeten Antikörper und sowie Sekundärreagenzien findet sich in Tabelle 8 und Tabelle 9.

3.2.9 Quantifizierung von Zytokinen in Serum und Überstand im Cytometric Bead Array (CBA)

Zur Messung von Zytokinleveln im Serum und Stimulationsüberstand wurde das weitgehend frei zusammenstellbare *Cytometric Bead Array Mouse Flex Set* mit den Zytokinen IL1 β , IL6, IL10, IL12p70, IL17A, TNF α und IFN γ gemäß Herstellerangaben, aber mit halbierten Proben- und Materialmenge verwendet. Testprinzip ist die Inkubation der Probe mit an Polymerkügelchen gekoppelten Antikörpern. Nach der Bindung wird ein Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper hinzugegeben, welcher an die gebundenen Zytokine konjugiert. Im Durchflusszytometer kann anschließend über eine Standardreihe die Konzentration an Zytokinen über die Signalintensität quantifiziert werden.

Zunächst wurden dafür die den verwendeten Zytokinen entsprechenden lyophilisierten Standard-Kügelchen in 4 ml Assay Diluent (*Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit*, BD 558267) aufgelöst und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Dieser Top-Standard wurde dann in 8 1:2-Schritten bis 1:256 verdünnt. Als Leerwert der Standardreihe diente pures *Assay Diluent*. Anschließend wurden zu jeweils 25 µl der Standardreihe und der entsprechenden Proben 50 µl des *Capture-Bead-Mix* gegeben. Anschließend wurde das Gemisch für 1 h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 50 µl des PE-Detection-Reagenzes hinzugegeben und alles wurde für eine weitere Stunde unter Schütteln inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml Waschpuffer (200 g, 5 min, 4 °C) wurden die Proben in 300 µl Waschpuffer resuspendiert und am LSR-II gemessen. Gezählt wurden 300 *events* pro verwendetem Zytokin. Ausgewertet wurden die Daten in FCAP Array v3.0.1 und die Standardkurve mit einer 5-Parameter-Logistik berechnet.

3.2.10 Bestimmung der Corticosteron-Serumkonzentration im ELISA

Es wurde ein kommerziell erhältliches ELISA-Kit zur Quantifizierung von Corticosteron im Serum verwendet. Die Durchführung geschah gemäß den Herstellerangaben mit leichten Anpassungen der empfohlenen Inkubationszeit. Das Reaktionsprinzip ist ein kompetitiver ELISA. Hierbei wird die Probe in ein mit Corticosteron beschichtetes Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wird ein mit einem Enzym gekoppelter Corticosteron-spezifischer Antikörper zugegeben und das Gemisch inkubiert. Im folgenden Waschschrift wird das gelöste Corticosteron mit den daran gebundenen Antikörpern entfernt. Ein im nächsten Schritt zugegebenes Substrat erzeugt durch das gekoppelte Enzym einen Farbumschlag. Da nur die Antikörper an den bereits gebundenen Corticosteronmolekülen noch im Reaktionsgefäß verbleiben, fällt dieser Farbumschlag umso kräftiger aus, je weniger Corticosteron in der zugegebenen Probe war. Über eine Standardreihe kann die Konzentration berechnet werden.

Zunächst wurden 10 µl der Standardreihe und Proben in je 2 Wells zur Doppelbestimmung gegeben. Diesen wurden erst 100 µl des Inkubationspuffers und dann 50 µl des Enzymkonjugats zugefügt. Anschließend wurden die Platten für 2 h bei Raumtemperatur unter konstantem Schütteln (600 rpm) inkubiert. Danach wurde

der Wellinhalt verworfen und 4-mal mit 300 µl Waschlösung gewaschen. Nach der Hinzugabe von 200 µl Substratlösung in jedes Well wurden die Platten erneut für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss die Reaktion mit 50 µl der Stopplösung beendet. Die Messung erfolgte am Tecan Infinite M200 Pro innerhalb von 15 min bei 450 nm. Mit einer 4-Parameter-Logistik wurde die Regression der Durchschnittswerte in Graphpad 6 durchgeführt.

3.2.11 Tandem-Massenspektrometrie

Zur Untersuchung des Tryptophankatabolismus als Ausdruck der Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase wurden per Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) Tryptophan, Kynurenin und Quinolonsäure im EDTA-Plasma 6 h nach SID quantifiziert. Zur Vorbereitung wurden 100 µl EDTA-Plasma mit 100 µl Methanol, 10 µl 50%-iger Trichloressigsäure und 60 µl LiChrosolv versetzt. Um die Metabolite quantifizieren zu können, wurden den Proben zusätzlich je 10 µl D₅-Phenylalanin (2,65 µM), D₅-KynA (1,03 µM) und D₆-Kyn (7,8 µM) zugegeben. Anschließend inkubierten diese über Nacht bei -20 °C. Danach wurden sie erneut gemischt und anschließend für 15 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Proben wurden im Rahmen eines Kooperationsprojekts durch Dr. rer. nat. Grazyna Domanska des Institutes für Immunologie und Biochemie, Universitätsmedizin Greifswald mit dem API 200 (Perkin-Elmer Sciex Instruments) gemessen.

3.3 Statistik

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Daten erfolgte mit Graphpad Prism 6. Zunächst wurden alle Daten durch den *Shapiro-Wilk normality test* auf Normalverteilung überprüft. Lag keine Normalverteilung vor, erfolgte die Gruppenanalyse durch den nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test, sowie *Dunn's post test for selected pairs* zur Differenzierung der Gruppenunterschiede. Lag eine Normalverteilung vor, erfolgte der Test auf die Homogenität der Varianzen durch den *Bartlett's test*. Lag auch diese vor, erfolgte die Gruppenanalyse durch one way-ANOVA mit *Sidak's multiple comparisons test* zur Differenzierung der Gruppenunterschiede. Andernfalls wurde ebenfalls der *Kruskal-Wallis-Test* durchgeführt. Um die Testpower für die entscheidenden Gruppenvergleiche möglichst hoch zu halten, wurden nur die Paare Unbehandelt – SID und SID – Vgx-

SID miteinander verglichen. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ definiert und mit * dargestellt. Hochsignifikante Unterschiede wurden durch ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ dargestellt.

Die grafische Darstellung erfolgte durch *Box Plots* mit *Whiskers* nach *Tukey*. Die Box umfasst die mittleren 50 % der Werte, der Strich zeigt den Median an. Die *Whiskers* umspannen alle Werte, die sich innerhalb der 25 %-Perzentile minus des 1,5-fachen Interquartilabstandes sowie der 75 %-Perzentile zuzüglich des 1,5-fachen Interquartilabstandes befinden. Alle Werte außerhalb dieser Spannweite werden als Punkte dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Immunologische Parameter nach SID und Vgx im Blut

4.1.1 Zellulärer Immunstatus im Vollblut

Die Bestimmung der prozentualen und absoluten zellulären Zusammensetzung des zirkulierenden Immunsystems ist in der klinischen Praxis ein gängiger Parameter zur schnellen Einschätzung des Immunstatus eines Patienten. In diesem Versuch wurde sechs Stunden und drei Tage nach Induktion der SID Vollblut entnommen und mittels VetScan ein Blutbild erstellt.

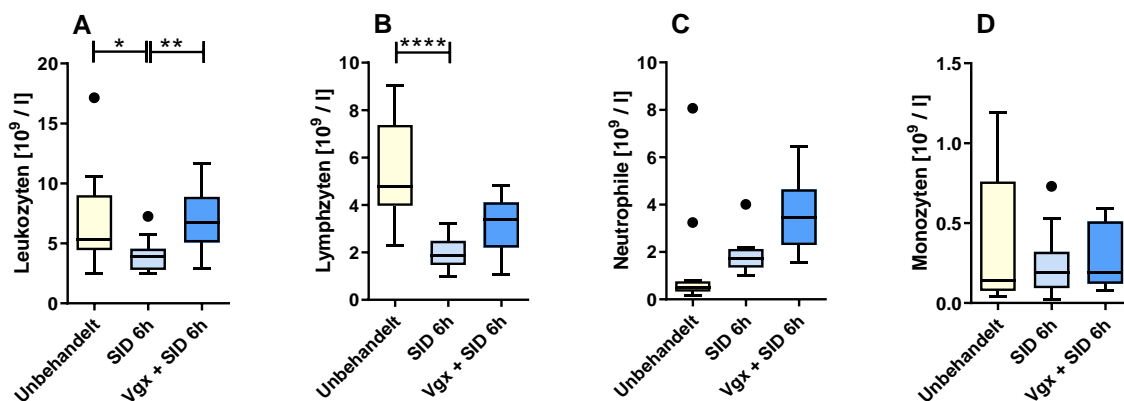


Abbildung 3: Absolute Zellzahl der Leukozytenpopulationen im Blut 6 h nach SID

Von C57BL/6N-Mäusen wurde 6 h nach der SID-Operation ein Blutbild erstellt (n=12). In einer weiteren Gruppe wurde 6 Tage vor SID eine Vagotomie durchgeführt (n=11). Als Kontrollen dienten unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). Abgebildet sind die Leukozyten (A), Lymphozyten (B), neutrophilen Granulozyten (C) und Monozyten (D). Dargestellt ist die Anzahl in $10^9/l$ in Form von Box Plots nach Tukey. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$

Sechs Stunden nach SID fiel die Leukozytenzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant ab. Wurde sechs Tage vor der SID eine Vagotomie durchgeführt, war die Anzahl signifikant höher (Abbildung 3A). Aufgeschlüsselt nach einzelnen Zellpopulationen wurde dies vor allem durch eine Reduktion der Lymphozyten vermittelt, die innerhalb der ersten sechs Stunden nach SID hochsignifikant abfielen. Eine vorangegangene Vagotomie verminderte diesen Abfall tendenziell (Abbildung 3B; *Dunn's post test*: SID vs. Vgx-SID $p=0,067$). Die Anzahl der neutrophile

Granulozyten erhöhte sich tendenziell nach SID gegenüber der Kontrollgruppe. In vagotomierten SID-Tieren war dieser Anstieg tendenziell noch einmal verstärkt (Abbildung 3C; *Kruskal-Wallis-Test*: $p=0,0002$; *Dunn's post test*: Unbehandelt vs. SID $p=0,063$; SID vs. Vgx-SID $p=0,09$). Auf die Anzahl der Monozyten hatten die operativen Eingriffe keine Auswirkung (Abbildung 3D).

Zusammengefasst konnte sechs Stunden nach SID eine Lymphopenie sowie tendenziell eine Neutrophilie beobachtet werden. In zuvor vagotomierten SID-Tieren konnte eine gesteigerte Anzahl beider Zelllinien gezeigt werden.

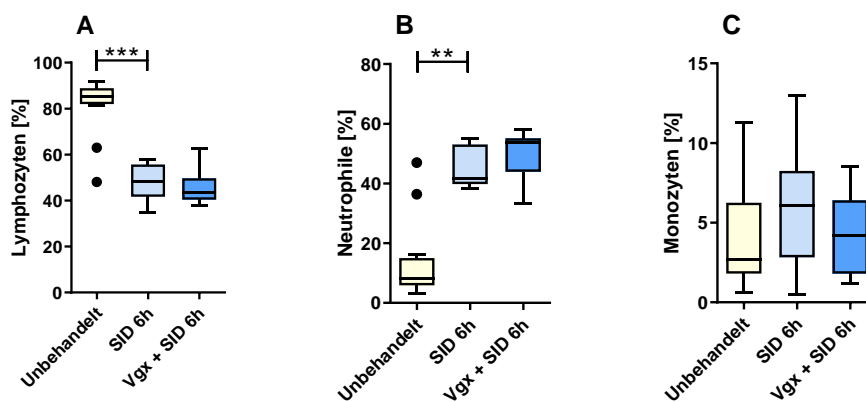


Abbildung 4: Relative Verteilung der Zellpopulationen 6 h nach SID

Von C57BL/6N-Mäusen wurde 6 h nach der SID-Operation ein Blutbild erstellt ($n=12$). In einer weiteren Gruppe wurde 6 Tage vor SID eine Vagotomie durchgeführt ($n=11$). Als Kontrollen dienen unbehandelte Tiere ($n=13$, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). Abgebildet sind die Lymphozyten (A), neutrophilen Granulozyten (B) und Monozyten (C). Dargestellt ist der relative Anteil in % in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

In der relativen Verteilung der Zellpopulationen bildete sich sechs Stunden nach SID erwartungsgemäß ein Abfall des Anteils der Lymphozyten ab (Abbildung 4: Relative Verteilung der Zellpopulationen 6 h nach SID), während der Anteil neutrophiler Granulozyten signifikant anstieg (Abbildung 4B). Auf die relative Menge der Monozyten zeigte sich kein Einfluss (Abbildung 4C). Ein Einfluss der Vagotomie war nicht nachweisbar.

Drei Tage nach SID konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede mehr nachgewiesen werden. Nur die Neutrophilen lagen im Vergleich zur unbehandelten

Gruppe noch in tendenziell höherer Anzahl vor (Anhang, Abbildung 26C; *Kruskal-Wallis-Test*: $p=0,0033$; *Dunn's post test*: Unbehandelt vs. SID $p=0,056$).

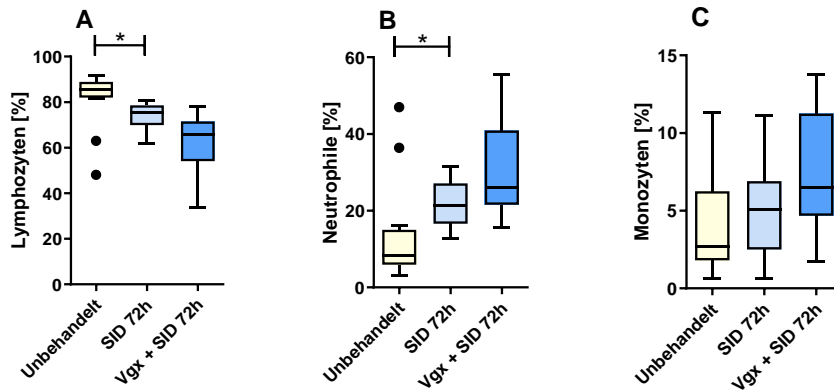


Abbildung 5: Relative Verteilung der Zellpopulationen im Blut 72 h nach SID

Von C57BL/6N-Mäusen wurde 72 h nach der SID-Operation ein Blutbild erstellt (n=11). In einer weiteren Gruppe wurde 6 Tage vor SID eine Vagotomie durchgeführt (n=12). Als Kontrollen dienen unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). Abgebildet sind die Lymphozyten (A), neutrophilen Granulozyten (B) und Monozyten (C). Dargestellt ist der relative Anteil in % in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

* $p \leq 0,05$

Die relative Verteilung der Zellpopulationen im Blut zeigte drei Tage nach SID noch ähnliche Veränderungen wie zum 6-h-Zeitpunkt: Der relative Anteil der Lymphozyten war nach SID signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe vermindert (Abbildung 5A), während der Anteil der neutrophilen Granulozyten erhöht war (Abbildung 5B). Eine zuvor durchgeführte Vagotomie hatte keinen signifikanten Effekt auf die relative Verteilung der Zellen. Der Anteil der Monozyten (Abbildung 5C) blieb nach SID unbeeinflusst.

4.1.2 Zytokinprofil im Blutplasma nach SID

Zytokine sind Signalstoffe, mittels derer Zellen mit anderen Zellen kommunizieren und so die Reaktion des Körpers an die immunologische Situation anpassen. Aus dem gemessenen Zytokinprofil nach einer Intervention können Rückschlüsse auf die Reaktionsart, den Reaktionsumfang und den Fortschritt gezogen werden. Es ist bekannt, dass bereits kurze Zeit nach SID proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF- α ansteigen [12]. Den Versuchstieren wurde sechs Stunden und drei Tage nach SID Blut entnommen und die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A und TNF- α im Plasma per *Cytometric Bead Array* quantifiziert.

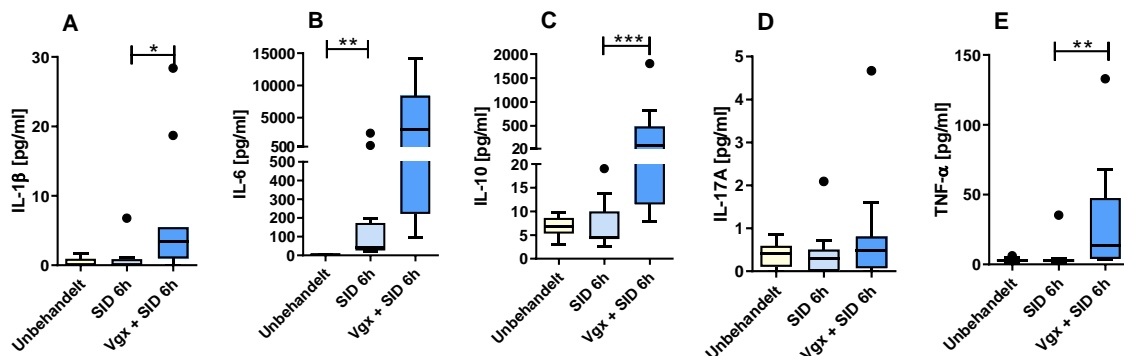


Abbildung 6: Zytokinprofil 6 h nach SID

Von C57BL/6N-Mäusen wurden 6 h nach der SID-Operation die Zytokine im Blutplasma per *Cytometric Bead Array* quantifiziert (n=12). In einer weiteren Gruppe wurde 6 Tage vor SID eine Vagotomie durchgeführt (n=11). Als Kontrollen dienen unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). Abgebildet sind IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C), IL-17A (D) und TNF- α (E). Dargestellt ist die Konzentration in pg/ml in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

* p \leq 0,05; ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001

Sechs Stunden nach SID war im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe einzig IL-6 signifikant erhöht (Abbildung 6B). Eine sechs Tage zuvor durchgeführte Vagotomie erhöhte die Zytokinkonzentration dagegen deutlich. So lagen die Zytokine IL-1 β (Abbildung 6A), IL-10 (Abbildung 6C) und TNF- α (Abbildung 6E) gegenüber der SID-Gruppe mit intaktem Vagus in signifikant höheren Konzentrationen vor. Für IL-6 besteht dieser Effekt nur tendenziell (Abbildung 6B, *Dunn's post test*: SID vs. Vgx-SID p=0,079). IL17A (Abbildung 6D) und IL-12p70 (Daten nicht gezeigt) zeigten keine Veränderungen.

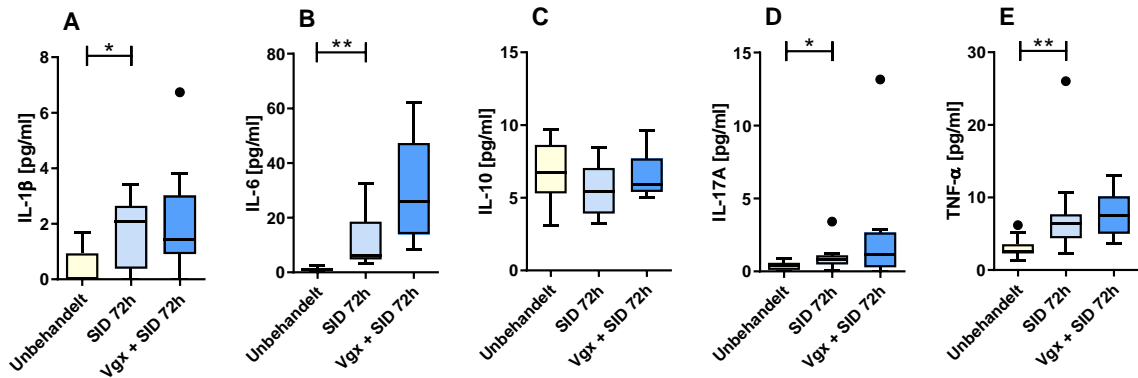


Abbildung 7: Zytokinprofil 72 h nach SID

Von C57BL/6N-Mäusen wurden 72 h nach der SID-Operation die Zytokine im Blutplasma per *Cytometric Bead Array* quantifiziert (n=11). In einer weiteren Gruppe wurde 6 Tage vor SID eine Vagotomie durchgeführt (n=12). Als Kontrollen dienten unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). Abgebildet sind IL-1β (A), IL-6 (B), IL-10 (C), IL-17A (D) und TNF-α (E). Dargestellt ist die Konzentration in pg/ml in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Drei Tage nach Induktion der SID waren auch die Zytokine IL-1β (Abbildung 7A), IL-17A (Abbildung 7D) und TNF-α (Abbildung 7E) zusätzlich zu IL-6 (Abbildung 7B) signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe signifikant erhöht. Eine vorangegangene Vagotomie hatte drei Tage nach SID nur auf die IL6-Konzentration einen tendenziell erhöhenden Effekt (Abbildung 7B; *Dunn's post test*: SID vs. VgX-SID $p=0,096$). IL-12p70 (Daten nicht gezeigt) zeigte keine Veränderungen.

4.1.3 Zytokinsekretion nach LPS-Stimulation von Vollblut

Die *ex-vivo* Stimulation von Immunzellen mit LPS ist eine gut etablierte Methode, um insbesondere das angeborene Immunsystem einer funktionellen Untersuchung zu unterziehen. Hierfür wurde sechs Stunden sowie drei Tage nach SID die Stimulation von Vollblut mit einer Endkonzentration von 12,5 µg/ml über 24 h durchgeführt. Anschließend wurden die Zytokine IL-1β, IL-6, IL-10 und TNF-α im Überstand per *Cytometric Bead Array* quantifiziert.

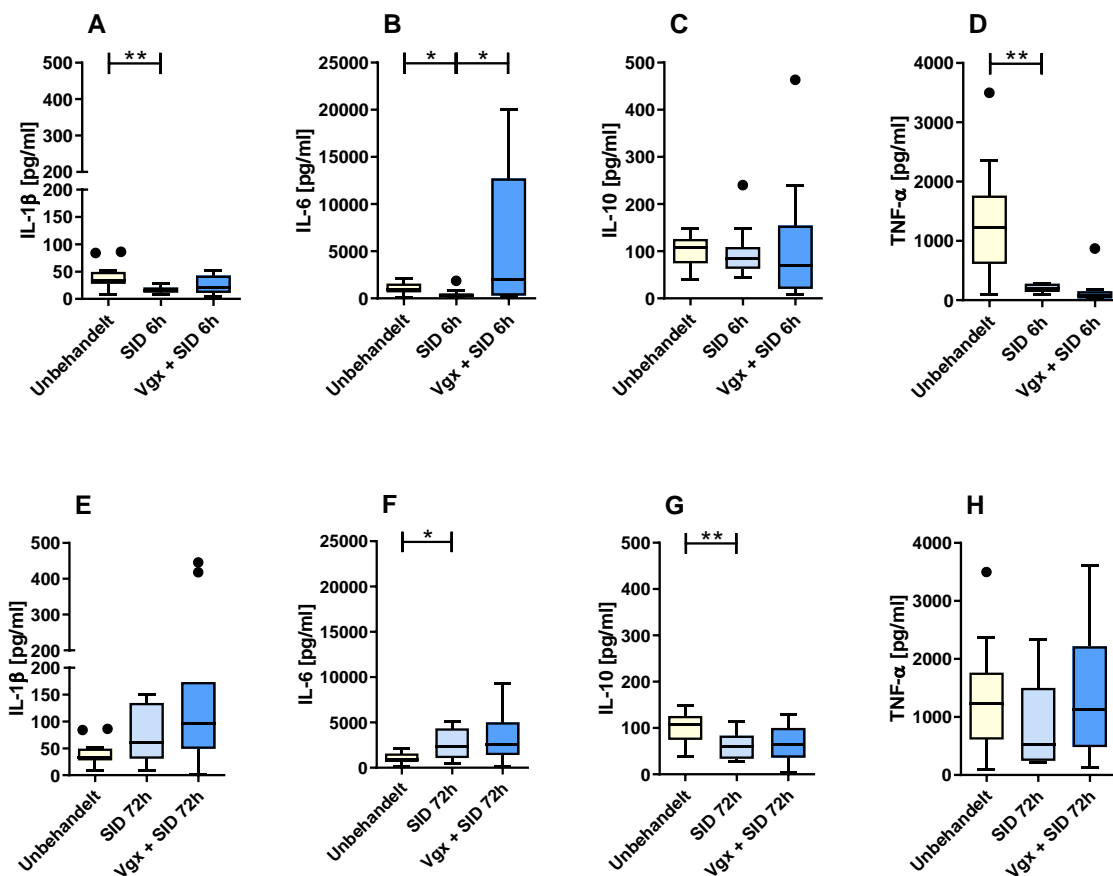


Abbildung 8: Zytokinsekretion nach LPS-Stimulation von Vollblut 6 h und 72 h nach SID

In C57BL/6N-Mäusen wurde durch SID ein Trauma induziert (6 h n=12; 72 h n=11) und nach weiteren 6 h (A-D) bzw. 72 h (E-H) die Organentnahme durchgeführt. Eine weitere Gruppe erhielt 6 Tage vor der SID eine Vagotomie (6 h n=12; 72 h n=11). Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). 100 µl Vollblut wurden über 24 h mit LPS inkubiert und anschließend im Überstand die Zytokine per *Cytometric Bead Array* quantifiziert. Abgebildet sind IL-1β (A, E), IL-6 (B, F), IL-10 (C, G) und TNF-α (D, H). Dargestellt ist die Konzentration in pg/ml in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01

Im Vollblut zeigte sich 6 h nach SID eine signifikant verminderte Ausschüttung von IL-1 β (Abbildung 8A), IL-6 (Abbildung 8B) und TNF- α (Abbildung 8D) auf den *ex-vivo* LPS-Stimulus hin gegenüber der Kontrollgruppe. Nach Vagotomie ließen sich in der Vgx-SID-Gruppe signifikant höhere IL-6-Konzentrationen nachweisen als in der SID-Gruppe (Abbildung 8B). Auf die Ausschüttung der anderen untersuchten Zytokine ließ die Vagotomie keinen signifikanten Einfluss erkennen. Für IL-10 bestand kein Gruppenunterschied (Abbildung 8C) nach sechs Stunden.

Drei Tage nach SID entnommenes Blut zeigte eine signifikant höhere Ausschüttung von IL-6 (Abbildung 8F) gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Auch für IL-1 β bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 8E; *Kruskal-Wallis-Test*: $p=0,038$; negativer *Dunn's post test*). Die IL-10-Sekretion nach LPS war dagegen signifikant eingeschränkt (Abbildung 8G). Ein Einfluss der Vagotomie war bei keinem der gemessenen Zytokine zu diesem Zeitpunkt mehr zu beobachten.

4.1.4 Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten im Blut

Zur Messung der Phagozytoseleistung wurde sechs Stunden sowie drei Tage nach Induktion der SID Blut entnommen und mittels eines kommerziellen Kits mit Fluoreszenz-gekoppelten *E. coli* inkubiert. Anschließend konnte im Durchflusszytometer die Phagozytoseleistung über die Fluoreszenzintensität der phagozytierten *E. coli* quantifiziert werden. Als Marker zur Identifikation der neutrophilen Granulozyten wurde Ly6G verwendet.

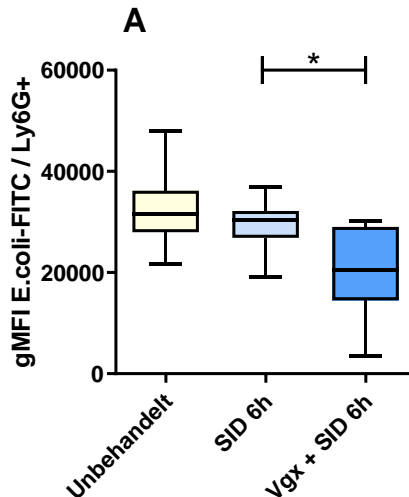


Abbildung 9: Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten im Blut 6 h nach SID

In C57BL/6N-Mäusen wurde durch SID ein Trauma induziert (n=12) und nach 6 h die Organentnahme durchgeführt. Eine weitere Gruppe erhielt 6 Tage vor der SID eine Vagotomie (n=10). Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). FITC-gekoppelte *E. coli* wurden über 10 min mit dem Blut inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer quantifiziert. Dargestellt ist die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (gMFI) von FITC-gekoppelten *E. coli* in den Ly6G⁺-Zellen in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *one-way-ANOVA* und *Sidak's-Post-Test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

* $p \leq 0,05$

Die Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten unterschied sich nach SID zu beiden untersuchten Zeitpunkten nicht von der unbehandelten Kontrollgruppe. Wurde allerdings sechs Tage vor SID eine Vagotomie durchgeführt, so fiel die Phagozytoseleistung sechs Stunden nach SID signifikant ab (Abbildung 9A). Drei Tage nach SID ließ sich, unabhängig von der Versuchsgruppe, kein Effekt auf die Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten mehr nachweisen (Daten nicht gezeigt).

4.1.5 Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)

Die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist ein in zahlreichen Geweben des Körpers exprimiertes Schlüsselenzym des Tryptophan-Katabolismus. Neben der metabolischen Rolle ist IDO aber auch in zahlreichen immunologischen Prozessen involviert, wo es vor allem eine immunsuppressive Wirkung hat. Sechs Stunden nach SID wurden mittels Tandem-Massenspektrometrie Tryptophan, Kynurenin und Quinolonsäure gemessen. Zur Abschätzung der IDO-Aktivität wurde das Verhältnis des Eduktes Tryptophan zu den Produkten Kynurenin und Quinolonsäure bestimmt.

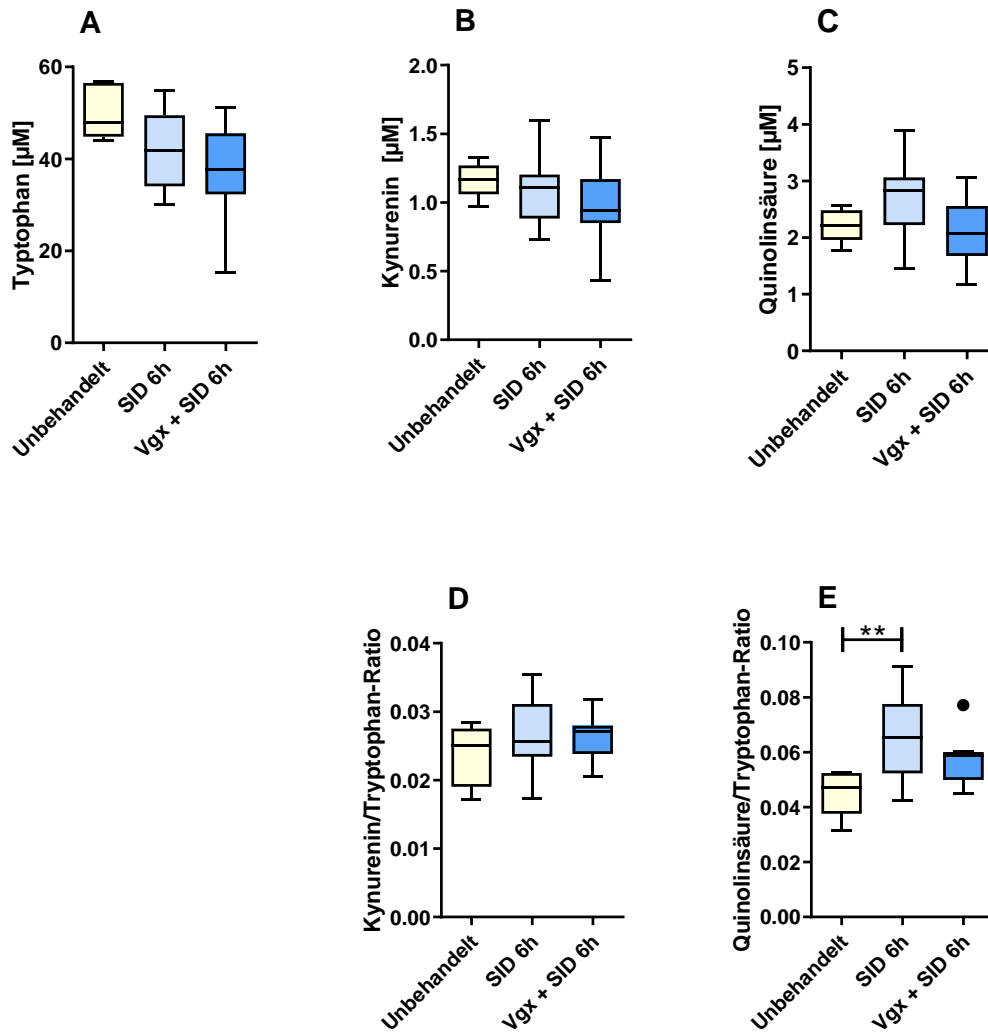


Abbildung 10: Konzentration und Ratio der Edukte und Produkte des Tryptophan-Katabolismus 6 h nach SID

In C57BL/6N-Mäusen wurde durch SID ein Trauma induziert (n=12). Eine weitere Gruppe erhielt 6 Tage vor der SID eine Vagotomie (n=8). Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere (n=6, gepoolt aus 3 Einzelversuchen). 6 h nach SID wurde den Mäusen Blut entnommen und im gewonnenen Serum die Tryptophan- (A), Kynurenin- (B) und Quinolonsäure-Konzentrationen (C) mit Hilfe der Massenspektrometrie bestimmt. Die Kynurenin/Tryptophan-Ratio (D) und Quinolonsäure/Tryptophan-Ratio (E) wurden berechnet und als Marker für die IDO-Aktivität genutzt. Dargestellt ist die Konzentration in μM (A-C) bzw. die Ratio (D, E) in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

** $p \leq 0,01$

Insgesamt ergaben sich für die Edukte und Produkte des Tryptophan-Katabolismus keine signifikanten Gruppenunterschiede 6 h nach SID. Allerdings war die Konzentration des Eduktes Tryptophan (Abbildung 10A) tendenziell gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe verringert (*Dunn's post test*: Unbehandelt vs. SID

$p=0,077$ mit signifikantem *Kruskal-Wallis-Test*). Das Verhältnis des Produktes Kynurenin zu Tryptophan zeigte 6 h nach SID keine relevante Veränderung mehr (Abbildung 10C). Dagegen lag das Verhältnis der Quinolonsäure zu Tryptophan signifikant über der Kontrollgruppe (Abbildung 10E). Ein Effekt der Vagotomie war nicht nachweisbar.

4.1.6 Plasmakonzentration von Corticosteron

Für ein Abbild der Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse wurde im Blutplasma 6 h und 72 h nach SID der Corticosteronspiegel gemessen.

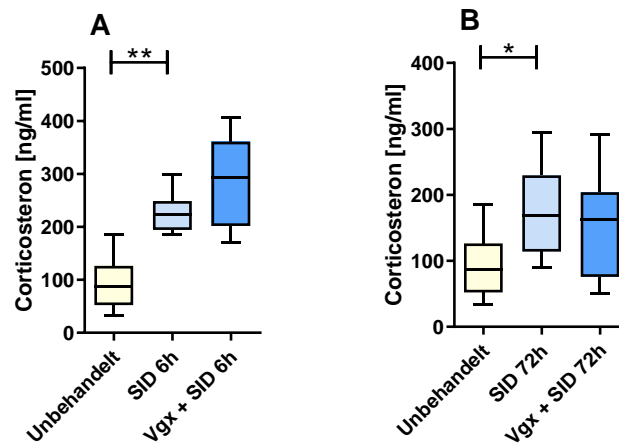


Abbildung 11: Plasmakonzentration von Corticosteron 6 h und 72 h nach SID

In C57BL/6N-Mäusen wurde durch SID ein Trauma induziert (6 h n=10; 72 h n=11). Eine weitere Gruppe erhielt 6 Tage vor der SID eine Vagotomie (6 h n=7, 72 h n=11). Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere (n=10, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). 6 h bzw. 72 h nach SID wurde den Mäusen Blut entnommen und im gewonnenen Plasma mittels eines kommerziellen ELISAs die Corticosteronkonzentration gemessen.

Dargestellt ist die Konzentration in ng/ml in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Die Corticosteronkonzentration war im Plasma sechs Stunden nach SID hochsignifikant gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 11A). Diese Steigerung nach SID ist auch nach drei Tagen noch in leicht verminderter Form nachweisbar (Abbildung 11B). Ein Einfluss der Vagotomie war nicht nachweisbar.

4.2 Immunologische Parameter nach SID und Vgx in der Milz

4.2.1 Anzahl der Splenozyten

Die Milz ist eines der zentralen immunologischen Kompartimente. Zur Untersuchung der zellulären Veränderungen nach SID auf Ebene der Milz wurden die Splenozyten sechs Stunden und drei Tage nach SID isoliert und im Durchflusszytometer untersucht. Zuerst wurde die absolute Anzahl der Splenozyten mittels *TruCount-Beads* quantifiziert, um einen Überblick über die Veränderungen dieses immunologischen Zellreservoirs zu erhalten und Rückschlüsse auf die zahlenmäßige Verteilung der einzelnen Zellpopulationen ziehen zu können.

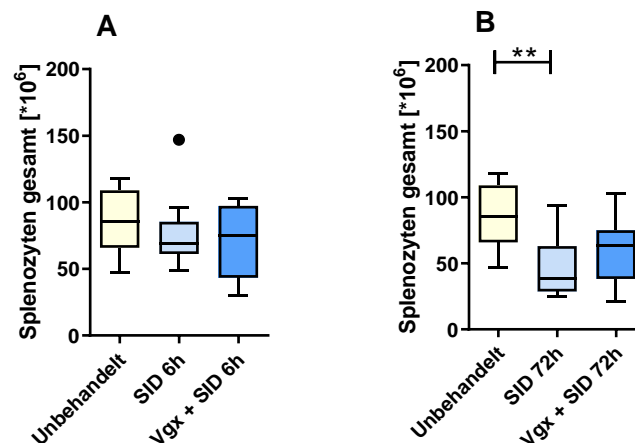


Abbildung 12: Absolute Anzahl der Splenozyten nach SID

In C57BL/6N-Mäusen wurde durch SID ein Trauma induziert (6 h n=12; 72 h n=11). Eine weitere Gruppe erhielt 6 Tage vor der SID eine Vagotomie (6 h n=11, 72 h n=12). Als Kontrolle dienen unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). 6 h bzw. 72 h nach SID wurde den Mäusen die Milz entnommen und die Splenozyten wurden im Durchflusszytometer gezählt.

Dargestellt ist die Splenozytenzahl $\times 10^6$ in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

** $p \leq 0,01$

Die absolute Anzahl der Splenozyten war sechs Stunden nach SID unverändert (Abbildung 12A), während drei Tage nach SID eine signifikante Reduktion der Milzzellen auftrat (Abbildung 12B). Der Mittelwert der SID-Gruppe reduziert sich um etwa 45 % gegenüber den unbehandelten Versuchstieren. Ein Effekt der Vagotomie zeigt sich zu keinem der beiden Zeitpunkte.

4.2.2 Verteilung der B- und T-Lymphozyten in der Milz

In den entnommenen Splenozyten wurden die B-Zellen über die doppelpositive Expression von B220 und CD19 identifiziert. Als T-Lymphozyten wurden die CD3⁺ Zellen eingeordnet.

Sowohl der Anteil der B- und T-Zellen als auch ihre absolute Anzahl veränderte sich in den ersten sechs Stunden nach SID nicht in relevantem Maße. Auch eine Vagotomie zeigte keinen Effekt auf die Populationen (Daten nicht gezeigt).

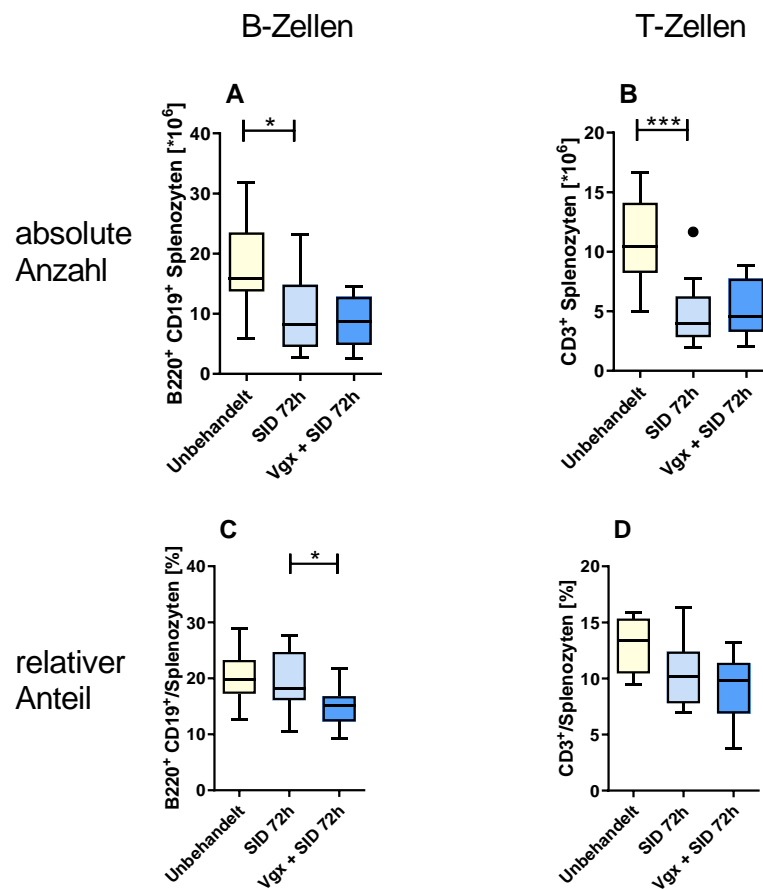


Abbildung 13: Anzahl und Verteilung der B- und T-Lymphozyten in der Milz 72 h nach SID

In C57BL/6N-Mäusen wurde durch SID ein Trauma induziert (n=11). Eine weitere Gruppe erhielt 6 Tage vor der SID eine Vagotomie (n=12). Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). 72 h nach SID wurde den Mäusen die Milz entnommen und die Splenozyten wurden im Durchflusszytometer analysiert. Abgebildet sind die B220⁺CD19⁺-B-Zellen (A, C) und CD3⁺-T-Zellen (B, D). Dargestellt ist die Zellanzahl $\cdot 10^6$ sowie der relative Anteil in % in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$

Die Anzahl von B- und T-Lymphozyten in der Milz nahm drei Tage nach SID gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe signifikant ab (Abbildung 13A, B). Diese Reduktion der Anzahl betraf die T-Lymphozyten etwas stärker, wodurch ihr relativer Anteil tendenziell absank (Abbildung 13D; *Kruskal-Wallis-Test*: $p=0,019$; *Dunn's post test*: Unbehandelt vs. SID $p=0,11$). Der Anteil der B-Lymphozyten blieb drei Tage nach SID gegenüber der Kontrollgruppe konstant. Wurde sechs Tage vor Induktion der SID eine Vagotomie durchgeführt, fiel der relative Anteil der B-Lymphozyten in der Milz im Vergleich zur Gruppe mit intaktem Vagus ab (Abbildung 13C). Für T-Lymphozyten findet sich kein entsprechender Effekt.

4.2.3 Verteilung der CD4⁺- und CD8⁺- und T-Lymphozyten in der Milz

Zur weiteren Auftrennung der T-Zell-Populationen wurden in den isolierten Splenozyten die CD3⁺CD4⁺- und CD3⁺CD8⁺-Lymphozyten identifiziert. Anschließend wurden ihre absolute Anzahl und ihre relativen Anteile an allen Splenozyten bestimmt.

In den ersten 6 h nach SID waren keine Verschiebungen der Zellpopulationen zu messen. Sowohl der relative Anteil als auch die absolute Zahl blieben konstant gegenüber der Kontrollgruppe. Auch die Vagotomie hatte keinen Einfluss auf die T-Lymphozytensubpopulationen in der Milz (Daten nicht gezeigt).

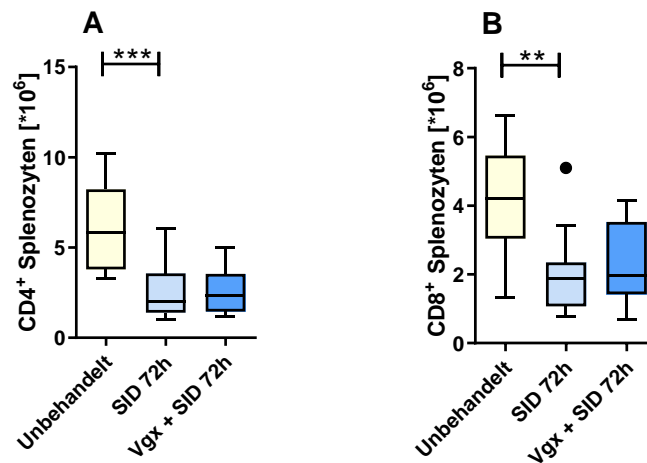


Abbildung 14: Anzahl der CD4- und CD8-T-Lymphozyten in der Milz 72 h nach SID

In C57BL/6N-Mäusen wurde durch SID ein Trauma induziert (n=11). Eine weitere Gruppe erhielt 6 Tage vor der SID eine Vagotomie (n=12). Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). 72 h nach SID wurde den Mäusen die Milz entnommen und die CD3⁺CD4⁺- (A) und CD3⁺CD8⁺-Splenozyten (B) wurden im Durchflusszytometer quantifiziert. Dargestellt ist die Zellanzahl $\times 10^6$ in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001

Sowohl die Anzahl der CD4⁺- als auch der CD8⁺-Lymphozyten fiel 72 h nach SID signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ab (Abbildung 14A, B), während die relativen Anteile gleichblieben. Dies schlug sich auch in dem unveränderten CD4/CD8-Quotienten nieder (Daten nicht gezeigt). Die Vagotomie hatte keinen Einfluss auf die untersuchten Zellpopulationen zu diesem Zeitpunkt.

4.2.4 Verteilung der T_{eff}- und T_{reg}-Lymphozyten in der Milz

Für eine genauere Untersuchung der zellulären Immunantwort wurden die CD3⁺-CD4⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Lymphozyten (T_{reg}) und die CD3⁺-CD4⁺Foxp3⁻ Effektor-T-Lymphozyten (T_{eff}) durchflusszytometrisch quantifiziert.

Die Verteilung und Anzahl der T_{eff}- und T_{reg}-Lymphozyten zeigten sechs Stunden nach Induktion der Immundysfunktion keine Veränderungen unabhängig vom Einfluss des *N. vagus* (Daten nicht gezeigt).

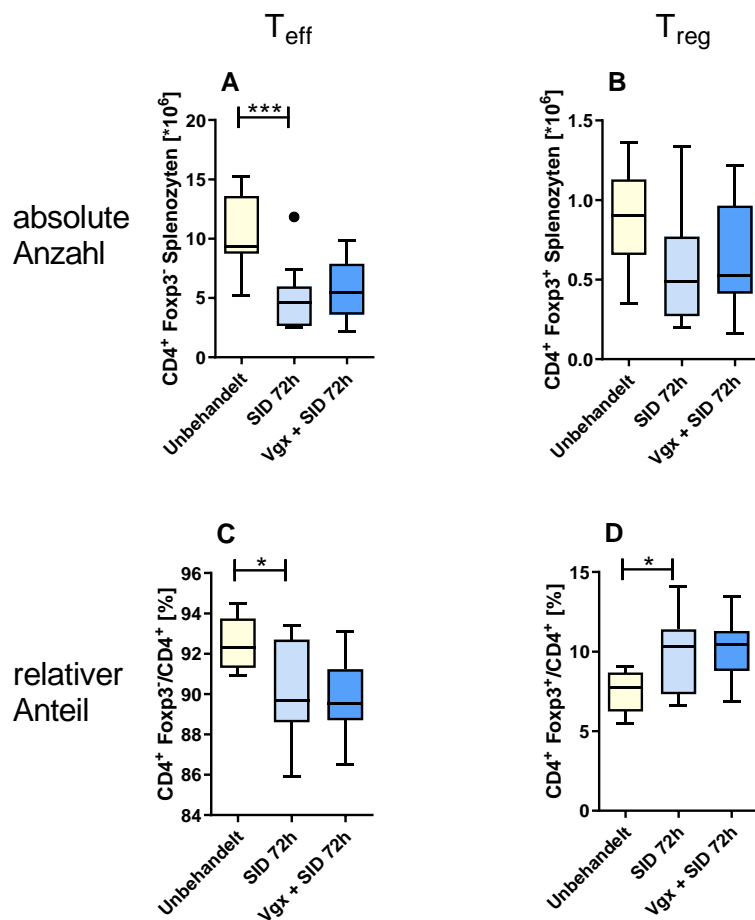


Abbildung 15: Anzahl und Verteilung der T_{reg}- und T_{eff}-Lymphozyten in der Milz 72 h nach SID

In C57BL/6N-Mäusen wurde durch SID ein Trauma induziert (n=11). Eine weitere Gruppe erhielt 6 Tage vor der SID eine Vagotomie (n=12). Als Kontrolle dienten unoperierte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). 72 h nach SID wurde den Mäusen die Milz entnommen und die CD4⁺Foxp3⁻ (A, C) und die CD4⁺Foxp3⁺Splenozyten (B, D) wurden im Durchflusszytometer quantifiziert. Dargestellt ist die Zellanzahl *10⁶ sowie der relative Anteil in % in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

* p≤0,05; *** p≤0,001

Dagegen fand drei Tage nach SID eine Verschiebung der Verteilung der T_{eff}- und T_{reg}- Lymphozyten statt. Zu diesem Zeitpunkt war die Zahl der T_{eff}-Zellen signifikant geringer als in der unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 15A). Für die T_{reg}-Zellen bestand dieser Effekt nur tendenziell (Abbildung 15B; *Kruskal-Wallis-Test*: $p=0,055$; *Dunn's post test*: Unbehandelt vs. SID $p=0,042$). Diese Reduktion schien die T_{eff}-Zellen allerdings in stärkerem Maße zu betreffen, da ihr relativer Anteil nach SID gegenüber der Kontrollgruppe signifikant abnahm (Abbildung 15C), während der Anteil der T_{reg}-Zellen signifikant zunahm (Abbildung 15D). Eine vor der SID durchgeführte Vagotomie zeigte keine zusätzlichen Effekte.

4.2.5 Aktivierungsniveau von T_{eff}- und T_{reg}-Lymphozyten in der Milz

Neben der Zahl und Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen in der Milz stellt auch ihr Aktivierungsstatus einen wichtigen Parameter einer immunologischen Reaktion dar. In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck die Expressionen der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf T_{eff} (CD4⁺Foxp3⁻) und T_{reg} (CD4⁺Foxp3⁺) sechs Stunden und drei Tage nach SID durchflusszytometrisch quantifiziert.

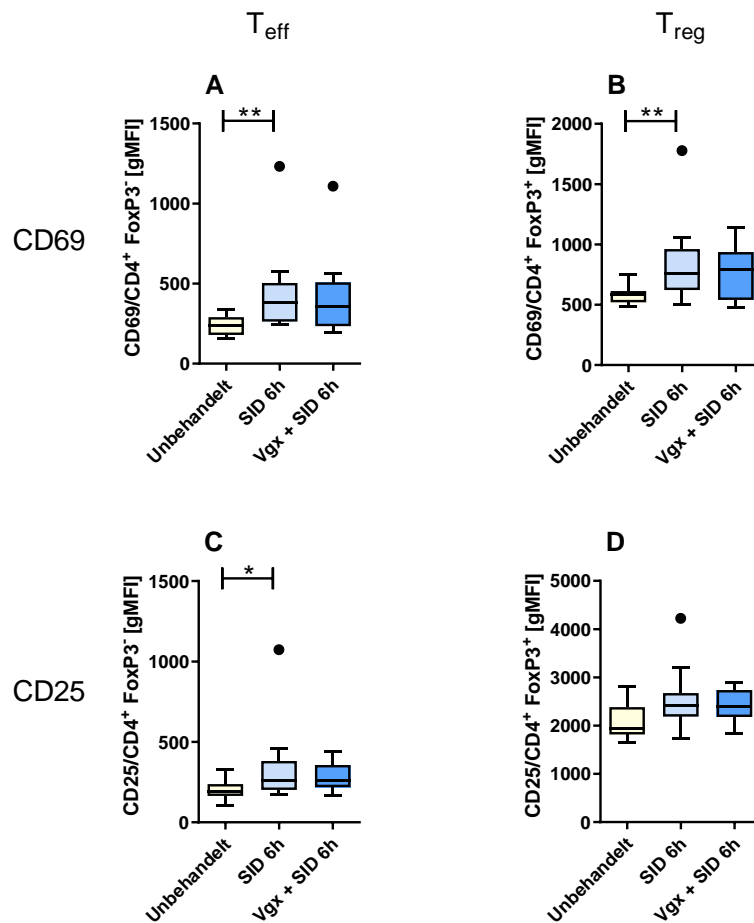


Abbildung 16: Expression von CD69 und CD25 auf T_{eff} und T_{reg} in der Milz 6 h nach SID

In C57BL/6N-Mäusen wurde durch SID ein Trauma induziert (n=12). Eine weitere Gruppe erhielt 6 Tage vor der SID eine Vagotomie (n=11). Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). 6 h nach SID wurde den Mäusen die Milz entnommen und CD25 und CD69 auf T_{eff} (CD4⁺Foxp3⁻) (A, C) und T_{reg}-Lymphozyten (CD4⁺Foxp3⁺) (B, D) im Durchflusszytometer quantifiziert. Dargestellt ist die gMFI in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

* p < 0,05; *** p < 0,001

Bereits sechs Stunden nach SID zeigten die T_{eff}-Lymphozyten eine signifikant höhere Expression von CD69 (Abbildung 16A) und CD25 (Abbildung 16C) als die unbehandelte Kontrollgruppe. Auch die immunsuppressiv wirksamen T_{reg}-

Lymphozyten zeigten sechs Stunden nach SID eine signifikant höhere Expression von CD69 (Abbildung 16B), aber nur tendenziell von CD25 (Abbildung 16D; *Kruskal-Wallis-Test*: $p=0,078$; *Dunn's post test*: Unbehandelt vs. SID $p=0,085$). Eine vorangegangene Vagotomie hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die Aktivierung der T-Lymphozyten.

Drei Tage nach SID sind die vorher gefundenen Aktivierungszustände bereits wieder rückläufig. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Versuchsgruppen (Daten nicht gezeigt). Ein Einfluss der Vagotomie war nicht nachweisbar.

4.2.6 Expression von CTLA-4 auf T_{eff}- und T_{reg}-Lymphozyten in der Milz

Jede Aktivierung des Immunsystems hat neben der inflammatorischen Reaktion auch eine antiinflammatorische Gegenreaktion im Sinne eines negativen Feedbacks zur Folge. Ein Beispiel für solch einen Mechanismus stellt das immunsuppressive Protein CTLA-4 auf T_{eff}- und T_{reg}-Lymphozyten dar, dessen intra- und extrazelluläre Expression nach SID durchflusszytometrisch bestimmt wurde.

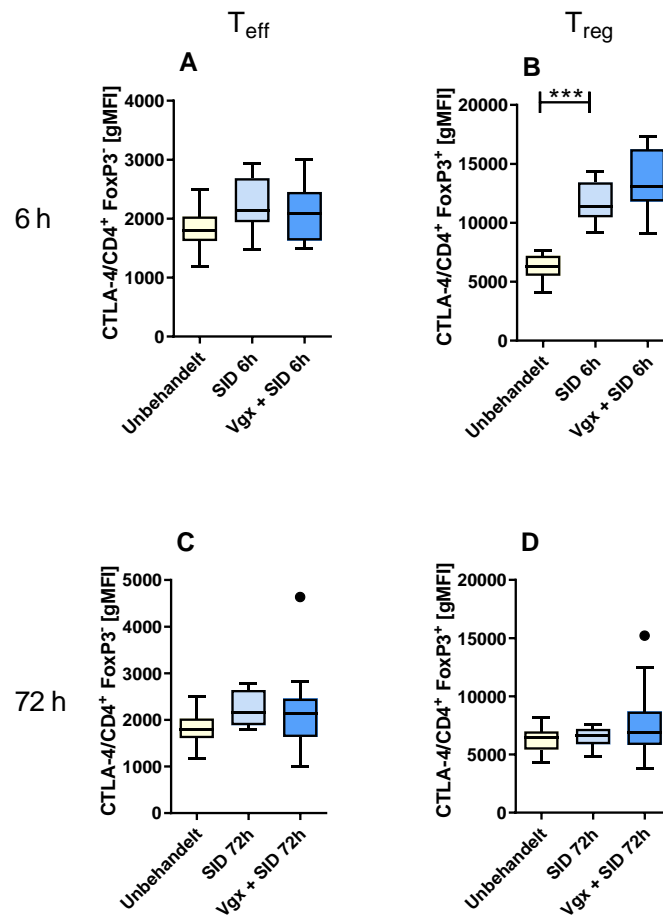


Abbildung 17: Expression von CTLA-4 auf T_{eff} und T_{reg} in der Milz 6 h und 72 h nach SID

In C57BL/6N-Mäusen wurde durch SID ein Trauma induziert (6 h n=12; 72 h n=11). Eine weitere Gruppe erhielt 6 Tage vor der SID eine Vagotomie (6 h n=11, 72 h n=12). Als Kontrolle dienen unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). 6 h bzw. 72 h nach SID wurde den Mäusen die Milz entnommen und CTLA-4 auf T_{eff}⁻ (CD4⁺Foxp3⁻) (A, C) und T_{reg}⁻ Lymphozyten (CD4⁺Foxp3⁺) (B, D) im Durchflusszytometer quantifiziert. Dargestellt ist die gMFI in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

*** p≤0,001

Die CTLA-4-Expression auf T_{eff}-Lymphozyten war sowohl sechs Stunden als auch drei Tage nach SID tendenziell, aber nicht signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 17A u. C; *Kruskal-Wallis-Test*: p=0,095 u. p=0,06,

Dunn's post test: Unbehandelt vs. SID $p=0,065$ u. $p=0,037$). Auf regulatorischen T-Zellen war die Expression von CTLA-4 6 h nach SID hochsignifikant gegenüber der unbehandelten Gruppe erhöht (Abbildung 17**B**). Drei Tage nach SID war die Expression auf T_{reg}-Lymphozyten bereits wieder auf ihr Normalniveau zurückgekehrt (Abbildung 17**D**). Ein Einfluss der Vagotomie war nicht nachweisbar.

4.2.7 Verteilung der neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen in der Milz

Neben den zellulären Bestandteilen der adaptiven Immunantwort sollten auch Veränderungen in den Zellpopulationen der angeborenen Immunantwort in der Milz nach SID untersucht werden. Durchflusszytometrisch wurden mittels $CD11b^+Ly6G^+$ die neutrophilen Granulozyten und über $CD3^+NK1.1^+$ die NK-Zellen identifiziert und quantifiziert.

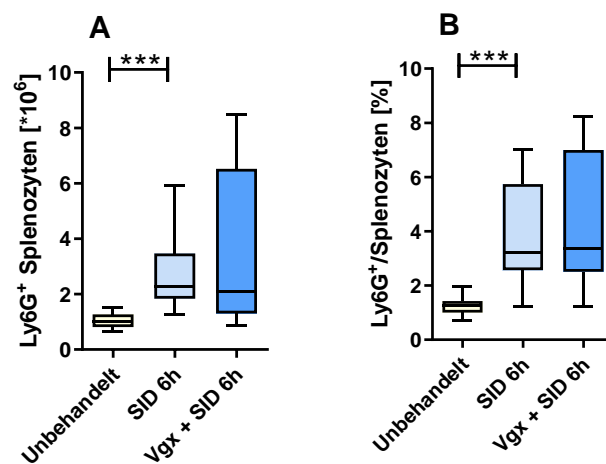


Abbildung 18: Anzahl und Verteilung der neutrophilen Granulozyten 6 h nach SID

In C57BL/6N-Mäusen wurde durch SID ein Trauma induziert (n=12). Eine weitere Gruppe erhielt 6 Tage vor der SID eine Vagotomie (n=11). Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). 6 h nach SID wurde den Mäusen die Milz entnommen und die $CD11b^+Ly6G^+$ neutrophilen Granulozyten im Durchflusszytometer quantifiziert. Dargestellt ist die Zellanzahl $\times 10^6$ sowie der relative Anteil in % in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

*** p<0,001

Die neutrophilen Granulozyten lagen sechs Stunden nach SID gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe in signifikant höherer Anzahl vor (Abbildung 18A). Auch ihr relativer Anteil an allen Splenozyten nahm zu (Abbildung 18B). Auf die Verteilung und Anzahl von NK-Zellen war sechs Stunden nach SID kein Effekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Ein Effekt der Vagotomie war bei keiner der Zellpopulationen nachweisbar.

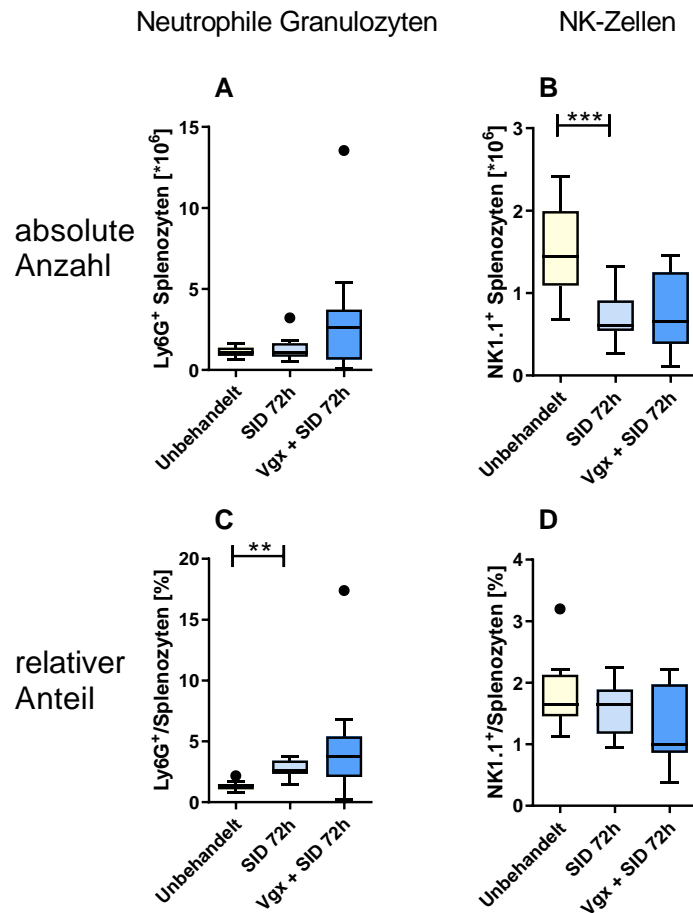


Abbildung 19: Anzahl und Verteilung der neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen 72 h nach SID

In C57BL/6N-Mäusen wurde durch SID ein Trauma induziert (n=11). Eine weitere Gruppe erhielt 6 Tage vor der SID eine Vagotomie (n=12). Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). 72 h nach SID wurde den Mäusen die Milz entnommen und die CD11b⁺Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten (A, C) und die CD3⁻NK1.1⁺ NK-Zellen (B, D) wurden im Durchflusszytometer quantifiziert. Dargestellt ist die Zellanzahl $\cdot 10^6$ sowie der relative Anteil in % in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Die neutrophilen Granulozyten zeigten zu diesem späten Zeitpunkt keine Veränderung ihrer absoluten Zahl mehr (Abbildung 19A). Ihr relativer Anteil erhöhte sich signifikant, da ein Großteil der anderen Leukozyten in ihrer Anzahl verringert vorlag (Abbildung 19C). Betrachtete man die NK-Zellen drei Tage nach SID erneut, so verringerte sich ihre Anzahl signifikant (Abbildung 19B), ohne dass sich eine relative Verschiebung der Zellpopulationen ergab (Abbildung 19D). Ein Effekt der Vagotomie war bei keiner der Zellpopulationen nachweisbar.

4.2.8 Verteilung von dendritischen Zellen und Expression von MHC-II in der Milz

Dendritische Zellen gehören zu den wichtigsten APCs des Immunsystems und sind als solche in der Lage, über die Präsentation von Peptidfragmenten im MHC-II-Kontext CD4⁺-T-Zellen zu aktivieren. Sechs Stunden sowie drei Tage nach SID wurden die Splenozyten isoliert und durchflusszytometrisch die MHC-II^{HI}CD11c⁺ dendritischen Zellen identifiziert und quantifiziert.

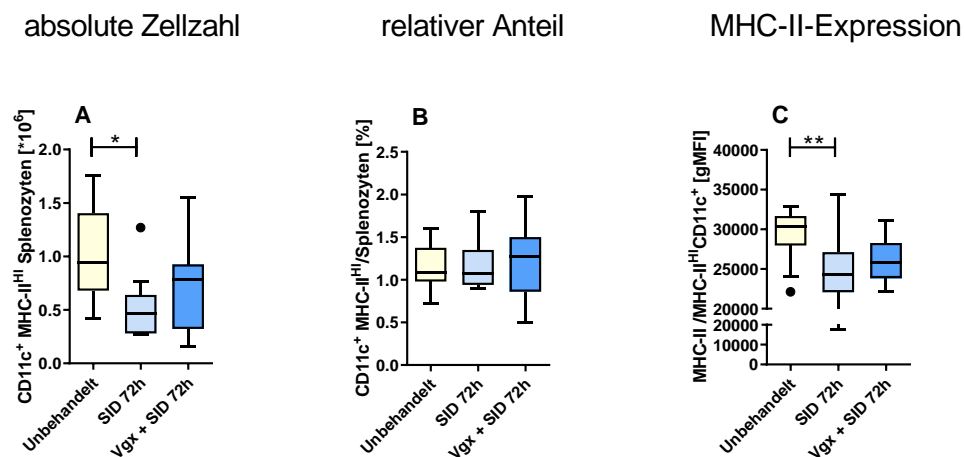


Abbildung 20: Die Expression von MHC-II, Anzahl und Verteilung der dendritischen Zellen 72 h nach SID in der Milz

In C57BL/6N-Mäusen wurde durch SID ein Trauma induziert (n=11). Eine weitere Gruppe erhielt 6 Tage vor der SID eine Vagotomie (n=12). Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). 72 h nach SID wurde den Mäusen die Milz entnommen und die MHC-II^{HI}CD11c⁺ dendritischen Zellen im Durchflusszytometer quantifiziert. Dargestellt ist die Zellanzahl $\times 10^6$ (**A**), der relative Anteil in % (**B**) sowie die gMFI von MHC-II auf den dendritischen Zellen (**C**) in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

** p<0,01; *** p<0,001

Die dendritischen Zellen zeigten in den ersten sechs Stunden nach SID keine absolute oder relative Veränderung ihrer Zellpopulation oder der Expression von MHC-II (Daten nicht gezeigt). Drei Tage nach SID sank die Anzahl der dendritischen Zellen in der Milz signifikant (Abbildung 20A), ohne dass sich der relative Anteil änderte (Abbildung 20B). Gleichzeitig reduzierte sich zu diesem Zeitpunkt auf den verbliebenen Zellen die Expression von MHC-II signifikant (Abbildung 20C). Eine Vagotomie hatte zu beiden Zeitpunkten keinen Einfluss auf die untersuchten Parameter.

4.2.9 Zytokinreaktion der Splenozyten nach LPS-Stimulation

Die Stimulation von Splenozyten mit LPS ist eine gut etablierte Methode, um insbesondere das angeborene Immunsystem über die resultierende Zytokinsekretion einer funktionellen Untersuchung zu unterziehen. Hierfür wurde sechs Stunden sowie drei Tage nach SID die Stimulation von 10^6 Splenozyten mit $12,5 \mu\text{g/ml}$ LPS über 24 h durchgeführt. Anschließend wurden die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ und TNF- α im Überstand per *Cytometric Bead Array* quantifiziert.

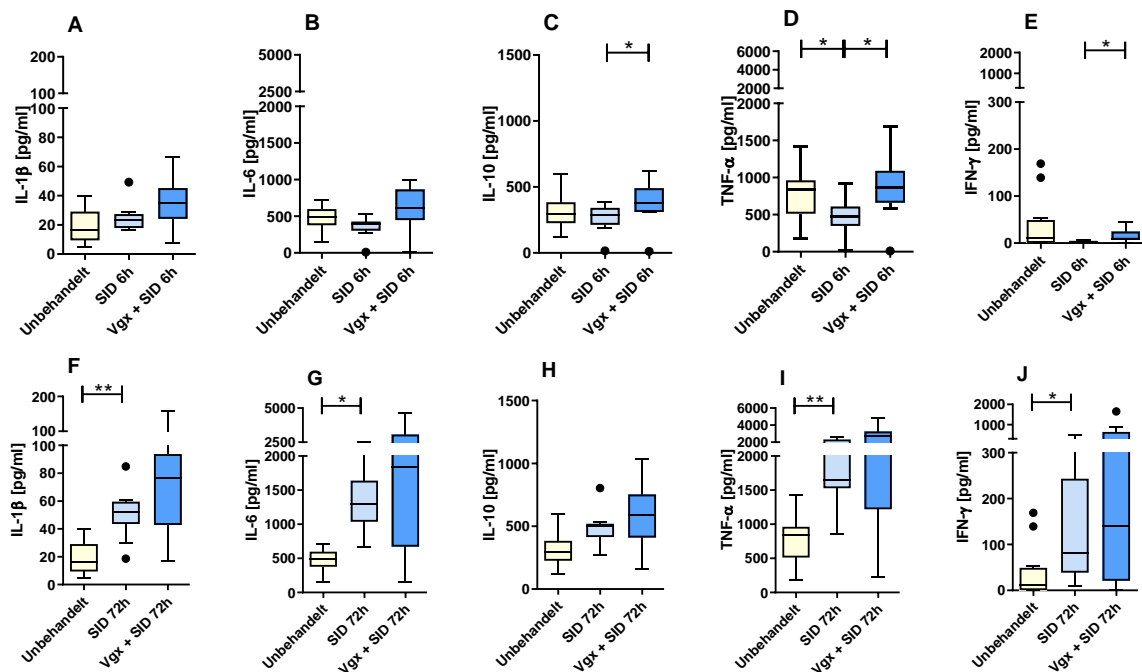


Abbildung 21: Zytokinlevel im Überstand LPS-stimulierter Splenozyten 6 h und 72 h nach SID

In C57BL/6N-Mäusen wurde durch SID ein Trauma induziert (6 h n=12; 72 h n= 11) und nach weiteren 6 h (A-D) bzw. 72 h (E-H) die Organentnahme durchgeführt. Eine weitere Gruppe erhielt 6 Tage vor der SID eine Vagotomie (6 h n=11; 72 h n=12). Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). 10^6 Splenozyten wurden über 24 h mit LPS inkubiert und anschließend wurden im Überstand die Zytokine per *Cytometric Bead Array* quantifiziert. Abgebildet sind IL-1 β (A, F), IL-6 (B, G), IL-10 (C, H), TNF- α (D, I) und IFN- γ (E, J). Dargestellt ist die Konzentration in pg/ml in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Sechs Stunden nach SID war die Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α (Abbildung 21D) gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringert. Für IL-6 (Abbildung 21B) und IFN- γ (Abbildung 21E) bestand dieser Effekt nur tendenziell (*Kruskal-Wallis-Test*: $p=0,006$ u. $p=0,02$; *Dunn's post test*: Unbehandelt vs. SID $p=0,1$ u. $p=0,095$). Eine sechs Tage vor SID durchgeführte Vagotomie führte bei

diesen drei Zytokinen zu einer signifikant erhöhten Ausschüttung gegenüber der SID-Gruppe ohne Vagotomie. Das antiinflammatorisch wirksame Zytokin IL-10 zeigte diese Steigerung nach Vagotomie nur tendenziell (Abbildung 21C; *Kruskal-Wallis-Test*: $p=0,092$; *Dunn's post test*: SID vs. Vgx-SID $p=0,062$). Auch die Sekretion von IL-1 β zeigte einen signifikanten Gruppenunterschied, der sich aber nicht weiter eingrenzen ließ (Abbildung 21A; *Kruskal-Wallis-Test*: $p=0,017$; *Dunn's post test*: Unbehandelt vs. SID $p=0,47$ bzw. SID vs. Vgx-SID $p=0,19$).

Auch drei Tage nach SID war das Sekretionsverhalten der einzelnen Zytokine ähnlich. Bemerkenswerterweise wurden IL-1 β (Abbildung 21F), IL-6 (Abbildung 21G), TNF- α (Abbildung 21I) und IFN- γ (Abbildung 21J) drei Tage nach SID gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe in signifikant höherem Maße ausgeschüttet. Für IL-10 bestand dieser Effekt nur tendenziell (Abbildung 21H; *Kruskal-Wallis-Test*: $p=0,0062$; *Dunn's post test*: Unbehandelt vs. SID $p=0,075$). Ein Effekt der Vagotomie ließ sich nicht darstellen.

5 Diskussion

5.1 Zellpopulationen und ihr Funktionszustand

5.1.1 Die Lymphozyten sind bereits früh nach SID reduziert und vollständig aktiviert

In dieser Arbeit konnte bereits sechs Stunden nach SID eine starke Reduktion der Lymphozyten in der Peripherie nachgewiesen werden, die auch nach 3 Tagen noch bestand. Dies bestätigt die bereits in einem vorhergehenden Projekt erhobenen Daten zur Leukopenie 72 h nach SID [7]. Weiterhin konnte Julia Zeun in einem Kooperationsprojekt mit dem Institut für Immunologie Greifswald diese Reduktion noch bis Tag 7 nach SID nachweisen [72]. In der Milz reduzierte sich die Anzahl der Lymphozyten erst nach 72 h in signifikantem Maße, wobei die T-Lymphozyten besonders betroffen waren. Entgegen anderer Trauma-Modelle ließ sich kein T_H2 -Shift nachweisen: Zwischen den $CD4^+$ -T-Helfer-Zellen und den $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen bestand kein Unterschied [50]. Diese Reduktion der Lymphozytenzahl kann durch verschiedene Mechanismen verursacht worden sein. Einerseits könnten Kompartimentalisierungseffekte und Migration von Immunzellen hin zum Ort der Entzündung eine wichtige Rolle spielen. Toft *et al.* konnten in einem Endotoxinämiemodell zeigen, dass die Applikation von Endotoxin zu einer Umverteilung von Lymphozyten aus der Zirkulation und der Milz in kleinere lymphatische Gewebe führt [73]. Ein ähnlicher Effekt ließe sich auch postoperativ vermuten, da der Organismus abhängig von der Schwere des Traumas mit DAMPs wie HMGB1 geflutet wird und auf diese inflammatorisch reagiert. Hinweise darauf gaben auch Daten aus unserer eigenen Arbeitsgruppe, nach denen fünf Tage nach SID die Anzahl von B- und T-Zellen in der Milz und im Blut stark abnahm, jedoch im gleichen Zeitfenster in der Darmmuskularis stark zunahm [74]. Andererseits wurde postoperativ auch eine starke Neigung der T-Lymphozyten in der Peripherie zur Apoptose nachgewiesen [75–77], welche im septischen Geschehen auch für das Kompartiment Milz beschrieben ist [78, 79]. Einen Hinweis auf diesen Mechanismus stellte die drei Tage nach SID gemessene relative T_{reg} -Expansion dar, welche vor allem mit der höheren Apoptoseresistenz dieser Zellen assoziiert wird [80, 81].

Gleichzeitig zeigten die verbliebenen CD4⁺-T-Lymphozyten in der Milz bereits sechs Stunden nach SID eine gesteigerte Expression von CD69, CD25 und CTLA-4. Das ist überraschend, da diese vollständige Aktivierung, gemessen anhand der gesteigerten CD25-Expression, als antigenabhängiger Vorgang beschrieben ist. So konnten unter anderem Schmoeckel *et al.* zeigen, dass CD4⁺-Zellen von OTII-Mäusen (Transgener Mausstamm mit Ovalbumin-spezifischen TCR auf ca. 80 % der T-Lymphozyten) nach Induktion einer Sepsis nur partiell aktiviert werden (alleinige Expression von CD69), während im Wildtyp eine vollständige Aktivierung ablief [82]. Zwar kann die Aktivierung von T-Zellen TCR-unabhängig durch das angeborene Immunsystem durch Zytokine wie IL-12, IL-18 oder Interferone vom Typ I geschehen, doch führt dies nur zu einer partiellen Aktivierung, ohne dass es zu einer Expression von späten Aktivierungsmarkern wie CD25 kommt [83–86]. Dieser Zustand der „*T cell readiness*“ befähigt die Lymphozyten, besonders schnell auf einen Antigenstimulus durch APCs zu reagieren. Bleibt dieser aus, so beschreiben Jiang *et al.* bereits nach zwei Tagen eine umfassende Depletion der nur partiell aktivierten T-Lymphozyten, welche nach drei Tagen größtenteils abgeschlossen ist [86].

Eine weitere Überraschung dieses Aktivierungszustandes stellte die bemerkenswert schnelle Kinetik dieser Aktivierung dar. Es konnte eine vollständige Aktivierung bereits nach sechs Stunden nachgewiesen werden, die nach drei Tagen bereits wieder aufgehoben war. Gleichzeitig hatte sich die Anzahl der CD4⁺-T-Lymphozyten nach drei Tagen in etwa halbiert. Im Sepsismodell wird eine vollständige Aktivierung der CD4⁺-Lymphozyten meist erst nach ca. 24 h registriert [87–90], die aber bis zu 7 Tage anhalten kann [91]. Das stellt einen Hinweis auf eine möglicherweise abgelaufene Depletion der aktivierten T-Zellen dar, die ihrem spezifischen Antigen nicht begegnet sind.

Dieser Umstand lässt in Bezug auf die postoperative Situation mindestens zwei denkbare Szenarien zu: In der SID kommt es sehr schnell zu einer Permeabilitätssteigerung der Darmbarriere und zu einem Anfluten fremder Antigene, welche nach Aufnahme durch APCs den T-Zellen über MHC-II präsentiert werden und zumindest teilweise eine spezifische TCR-vermittelte vollständige Aktivierung auslösen. Dagegen sprechen allerdings die nach SID durchgeführten Bakteriologien verschiedener Kompartimente durch unsere Arbeitsgruppe, in welchen sich frühestens 24 h nach SID Bakterien in der Zirkulation nachweisen lassen [92]. Oder

aber die Inflammation ist zu diesem Zeitpunkt noch wie angenommen aseptisch und DAMPs stellen einen weiteren Weg dar, T-Zellen vollständig und rasch zu aktivieren bzw. die Expression von CD25 in rascher Kinetik zu steigern.

5.1.1.1 Immunsuppression durch Expansion der regulatorischen T-Lymphozyten und Steigerung von CTLA-4

Drei Tage nach SID stieg der Anteil der regulatorischen T-Zellen in der Milz signifikant an. Dies war die unmittelbare Folge einer weniger starken Reduktion im Vergleich zu anderen Zellpopulationen wie den Effektor-T-Zellen. Diese T_{reg} -Expansion ist nach Sepsis in der Maus und im Menschen gut beschrieben und wird hauptsächlich ihrer erhöhten Apoptoseresistenz zugeschrieben [80, 81, 93], aber auch postoperativ ist eine Verschiebung hin zu Suppressorzellen beschrieben [59, 94, 95]. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die T_{reg} s bereits 6 h nach SID ebenfalls vollständig aktiviert waren und gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren in wesentlich höherem Umfang das inhibitorische Molekül CTLA-4 exprimierten. Da die Zellen vor der Antikörperfärbung aber permeabilisiert wurden, lässt sich nicht differenzieren, ob diese Zunahme sich auch in einer erhöhten Expression auf der Zelloberfläche niederschlägt. Insbesondere in T_{reg} s wird das Protein in Vesikeln gespeichert und kann von dort aus schnell an der Zelloberfläche eingebaut und auch wieder internalisiert werden [96]. Auch gibt es Hinweise darauf, dass T_{reg} s über die Interaktion von CTLA-4 mit CD80/CD86 auf APCs eine Aktivitätssteigerung der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in selbigen induzieren und so die Proliferation von T-Zellen supprimieren können [55, 56]. Zusammengefasst könnte der zunehmende Anteil von T_{reg} s in Verbindung mit deren früh gesteigerter inhibitorischer Potenz ein relevanter, aktiver Suppressionsmechanismus in der postoperativen Situation sein.

5.1.2 Verminderte MHC-II-Expression auf dendritischen Zellen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass drei Tage nach einem abdominalchirurgischen Eingriff die Anzahl der dendritischen Zellen in der Milz abnahm und die restlichen Zellen signifikant weniger MHC-II exprimierten. Es ist anzunehmen, dass dies zu einer verminderten Fähigkeit, T-Lymphozyten zu aktivieren, führt. Im Trauma-Hämorrhagie-Modell konnte eine verringerte Expression

von MHC-II auf dendritischen Zellen der Milz nachgewiesen werden, was eine reduzierte Fähigkeit, auf einen inflammatorischen Stimulus hin Zytokine zu sekretieren, zur Folge hatte [97]. Im immunologisch leicht abweichenden inflammatorischen Geschehen der Sepsis konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen ein relevanter Abfall der Anzahl dendritischer Zellen in der Milz durch Apoptose sowie eine Einschränkung ihrer aktivierenden Eigenschaften aufgrund des Verlusts von MHC-II, CD80, CD86 und CD40 beschrieben werden [98, 99]. Weiterhin steht der reduzierten Anzahl an APC ein größerer Anteil an T_{reg}s gegenüber, die über CTLA-4 eine Aktivitätssteigerung derIDO induzieren und so die APC-Funktion weiter einschränken können [55, 56, 100]. Die beobachteten Veränderungen an den dendritischen Zellen nach SID fügen sich somit in ein Bild von verminderten immunologischen Kapazitäten nach Trauma und Inflammation ein, wie sie auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden konnten.

5.1.3 Frühe Neutrophilie ohne Funktionsverlust

Sechs Stunden nach SID konnte eine starke Neutrophilie in Blut und Milz nachgewiesen werden, die nach drei Tagen noch immer persistierte, aber leicht rückläufig war (siehe Abschnitt 4.1.1 und 4.2.7). Es ist bekannt, dass verschiedenste Stresszustände des Körpers, wie zum Beispiel Traumata, Operationen oder psychischer Stress, durch Mobilisation unreifer neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark eine Neutrophilie zur Folge haben („Linksverschiebung“) [101–103].

Die Messung der Phagozytoseleistung nach SID konnte zu keinem der beiden untersuchten Zeitpunkte eine signifikante Veränderung der Aktivität der neutrophilen Granulozyten im Blut im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nachweisen. Trauma, Operation oder Sepsis gehen oft mit einer verminderten Phagozytoseleistung der neutrophilen Granulozyten einher, wodurch die Antwort des Organismus auf eindringende Pathogene in der Folge stark eingeschränkt ist [70, 104–106]. Hierfür kann es verschiedene Gründe geben. So besitzen beispielsweise die aus dem Knochenmark mobilisierten unreifen Granulozyten eine etwas geringere Phagozytosekapazität [105]. Gleichzeitig kann ein Trauma aber auch zu weiteren und in dieser Arbeit nicht untersuchten Einschränkungen der Neutrophilenfunktion führen. Kurihara *et al.* beschreiben einen Defekt im Migrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten nach einem Verbrennungstrauma. Die Wiederherstellung

dieser Funktion verbesserte das Überleben nach einem septischen *second hit* signifikant [107]. Ähnliche Effekte sind auch nach Operationen und Allgemeinanästhesie beschrieben [108]. Auch die Fähigkeit dieser Zellen, Pathogene mittels radikaler Sauerstoffspezies abzutöten, kann eingeschränkt sein. So werden erhöhte Spiegel des Traumaproteins HMGB1 mit einer Dysfunktion des zur Produktion der radikalen Sauerstoffspezies verantwortlichen Enzyms NADPH-Oxidase in Verbindung gebracht [109]. HMGB1 wird unter anderem aus nekrotischen Zellen freigesetzt und aktiviert als DAMP das Immunsystem. Koerner *et al.* konnten noch 24 h nach SID erhöhte HMGB1-Konzentrationen im Serum nachweisen [12], so dass auch dies im postoperativen Setting einen möglichen Pathomechanismus darstellen könnte. Zusammenfassend konnte überraschenderweise kein relevanter Einfluss der SID auf die Funktionsfähigkeit der neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Da nur eine der vielen antimikrobiellen Strategien dieser Immunzellen untersucht wurde, ist es durchaus möglich, dass die Ursache in anderen Funktionen der Zellen zu finden ist.

5.2 Mediatoren

5.2.1 Früher Anstieg proinflammatorischer Zytokine

Zur weiteren Untersuchung der Immunhomöostase und Evaluierung des inflammatorischen Status wurden sechs Stunden sowie drei Tage nach SID im Blutplasma die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-12p70, IL-17A und TNF- α sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 quantifiziert. Sechs Stunden nach SID war gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe nur die IL-6-Konzentration in signifikantem Ausmaß erhöht, während alle anderen untersuchten Zytokine keine Veränderungen zeigten. IL-6 wirkt vor allem proinflammatorisch und gehört zur Akut-Phase-Reaktion in der Inflammation. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die IL-6-Konzentration postoperativ mit Lokalisation, Ausmaß und Länge der Operation korreliert [110–113]. Weiterhin stellt eine frühe, stark erhöhte IL-6-Konzentration einen prognostischen Faktor für die Entstehung eines SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) dar und korreliert mit der Mortalität im Falle septischer Komplikationen [114–116]. Interessanterweise trifft dies auch auf das antiinflammatorische IL-10 zu, welches nach operativen Eingriffen meist ebenfalls in erhöhter Konzentration vorliegt [114]. Hohe IL-10-Konzentrationen

korrelieren stark mit einem negativem Outcome, sollte es posttraumatisch zu septischen Komplikationen kommen [117, 118]. Aufgrund der als niedrig einzuschätzenden IL-6-Konzentration (Mittelwert: 321,8 pg/ml; Median: 43,8 pg/ml) und dem fehlenden Anstieg der IL-10-Konzentration muss davon ausgegangen werden, dass das durch die SID zugefügte operative Trauma im Vergleich mit anderen Trauma-Modellen eher gering ist.

Drei Tage nach Induktion des operativen Traumas stiegen die Konzentrationen der Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α und IL-17A signifikant gegenüber der Kontrollgruppe an, allerdings in so geringen Konzentrationen, dass diese Erhöhung biologisch keine Relevanz mehr haben sollte. Insgesamt war das Zytokinprofil nach SID in dieser Arbeit von einer milden inflammatorischen Reaktion ohne nennenswerte antiinflammatorische Gegenreaktion auf Zytokinebene geprägt.

Bemerkenswert ist jedoch der auf den ersten Blick ungewöhnliche zeitliche Verlauf des Zytokinprofils. Die Ergebnisse dieser Arbeit erwecken den Eindruck, dass sechs Stunden nach SID in erster Linie IL-6 vermehrt vorliegt und nach drei Tagen weitere proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α hinzukommen. Tatsächlich sollten die Plasmakonzentrationen dieser beiden Zytokine unmittelbar nach Traumainduktion steigen und erst in der Folge die Ausschüttung von IL-6 aus verschiedensten Geweben induzieren [119, 120]. Nach abdominalchirurgischen Operationen im Menschen tritt die höchste IL-6-Konzentration im Mittel nach vier Stunden auf und kehrt innerhalb von drei Tagen praktisch auf das Ausgangslevel zurück [121]. Das IL-10-Peak erfolgt zeitlich wiederum nach IL-6 [119]. Diese gut beschriebene Kinetik nach Trauma lässt vermuten, dass die Hinzunahme früherer Messzeitpunkte in Folgeversuchen sinnvoll sein kann. Aufgrund der äußerst geringen Plasmahalbwertszeiten von IL-1 β und TNF- α von wenigen Minuten steht zu vermuten, dass 6 h nach SID IL-6 in bereits fallender Konzentration nachweisbar war. Der Anstieg der IL-10-Plasmakonzentration fand entsprechend möglicherweise zwischen 6 h und 72 h statt. Die beobachteten mild erhöhten Zytokinkonzentrationen nach drei Tagen sind gut mit einer leichten Schrankenstörung der intestinalen Barriere und nachfolgender bakterieller Translokation zu erklären [122].

5.2.2 Gesteigerte Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase

Beschrieben wurdeIDO zuerst 1998 von Munn *et al.* in Versuchen an schwangeren Mäusen, in denen die Behandlung der Tiere mit dem IDO-Antagonisten 1-Methyltryptophan zur Abstoßung der Feten durch den maternalen Körper führte. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte daraus, dass die lokal erhöhte IDO-Aktivität in der Plazenta einen zentralen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Immuntoleranz gegenüber dem allogenen Gewebe des Feten darstellte [123].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der IDO sechs Stunden nach SID gesteigert war, da das Verhältnis des indirekten Produktes Quinolinsäure zum Edukt Tryptophan hochsignifikant erhöht war. Da Quinolinsäure ein weiter stromabwärts gelegener Metabolit des Tryptophanskatabolismus ist und zum selben Zeitpunkt das Verhältnis des direkten Metaboliten Kynurenin zu Tryptophan unverändert war, ist davon auszugehen, dass die IDO-Aktivierung sechs Stunden nach SID bereits wieder rückläufig war und ihr Höhepunkt zeitlich davor lag. Da Quinolinsäure aber nur eine Halbwertszeit von etwa 20 min hat [124] und kein stabiles Endprodukt darstellt, ist trotz der relativ geringen absoluten Änderung der Plasmakonzentration von einer starken Aktivierung der IDO auszugehen, welche als kompensatorische Reaktion auf die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren und unter Einwirken der verstärkten CTLA-4-Expression von T_{reg} s auch glaubhaft ist. Wie eingangs erwähnt, führt eine stärkere IDO-Aktivierung unter anderem zu einer Induktion von CTLA-4, wie sie auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte [52–54]. CTLA-4 wiederum ist in der Lage, die verstärkte Aktivität von IDO in APC zu induzieren [55, 56]. Weiterhin wird durch die Metabolite Kynurenin und Quinolinsäure in aktivierten T-Zellen Apoptose induziert [46–48]. Die starke Reduktion von Lymphozyten im Blut und insbesondere T-Lymphozyten in der Milz können eine Folge der erhöhten IDO-Aktivität darstellen. Zusammenfassend weist die Fülle an IDO-assoziierten Veränderungen in der Zellzusammensetzung und Rezeptorexpression nach SID auf eine wichtige Rolle dieses Enzyms im Shift zu einem immunsuppressiven Phänotyp hin.

5.2.3 Anstieg der Corticosteron-Konzentration

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bereits sechs Stunden nach SID die Corticosteron-Konzentration im Plasma hochsignifikant erhöht war und dies auch noch drei Tage später persistierte. Diese Ergebnisse bestätigen Ergebnisse aus vorangegangenen Versuchen [7]. Eine Arbeitshypothese war, dass ein Teil der HPA-Achsenaktivierung durch afferente vagale Fasern vermittelt wird. Da eine sechs Tage vor SID durchgeführte Vagotomie aber keinen Einfluss auf die Corticosteronlevel hatte, wird die Sekretion am ehesten auf die direkte Aktivierung der HPA durch DAMPs und inflammatorische Zytokine zurückzuführen sein [125]. Koerner *et al.* konnten zeigen, dass bereits sechs Stunden nach SID die Serumkonzentration des DAMPs und TLR4-Agonisten HMGB1 stark erhöht ist [12].

Glukokortikoide wirken auf T-Lymphozyten proapoptotisch und können ihre Aktivierung sowie die Herunterregulation von Molekülen wie CD86, MHC-II oder CD1a auf professionellen APCs beeinträchtigen [126, 127]. Interessanterweise inhibieren Glukokortikoide vornehmlich T_H1-Lymphozyten, während die Polarisation in Richtung T_H2- und T_{reg}-Lymphozyten unterstützt wird [128–130]. Die anhaltend erhöhte Corticosteron-Konzentration ist also als ein weiterer wesentlicher Faktor für die beobachteten zellulären Veränderungen wie verminderte T-Lymphozytenzahlen, T_{reg}-Expansion und verminderte MHC-II-Expression auf dendritischen Zellen anzusehen. Weiterführende Versuche werden zeigen müssen, wie lang diese Steigerung der Plasmalevel nach SID anhält.

5.3 Die LPS-Reaktion zeigte einen zeitabhängigen Verlauf

5.3.1 Zustand der LPS-Toleranz sechs Stunden nach SID

Zur weiteren funktionellen Untersuchung des angeborenen Immunsystems wurden sechs Stunden sowie drei Tage nach SID Splenozyten und Vollblut über 24 h mit einer definierten Konzentration LPS inkubiert und im Anschluss verschiedene Zytokine im Überstand quantifiziert. Hauptproduzenten dieser Zytokine sind im Wesentlichen Makrophagen, dendritische Zellen und zu einem geringen Teil auch B-Zellen [131]. Generell ergab sich in beiden Kompartimenten sechs Stunden nach SID ein ähnliches Muster: Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-6 wurden

sowohl von den Vollblutzellen als auch durch die Splenozyten in geringerer Menge sekretiert. Im Vollblut traf dies auch auf IL-1 β zu. Gleichzeitig blieb die Ausschüttung des antiinflammatorisch wirksamen Zytokins IL-10 in beiden Kompartimenten unverändert.

Dieser Zustand der LPS-Toleranz ist ein gut beschriebener Effekt, dem mehrere verschiedene Mechanismen zugrunde liegen können, die nur zum Teil verstanden sind [132]. Generell ist anzunehmen, dass die Stimulation der Immunzellen sowohl durch das eingesetzte LPS über TLR4 als auch durch Verunreinigungen mit Lipoproteinen über TLR2 vermittelt wurde. Für beide Rezeptoren ist eine transiente LPS-Toleranz sowie eine Kreuztoleranz nach Aktivierung auf weitere LPS-Stimuli bekannt [132–136]. Aber auch DAMPs wie HSP70 oder HMGB1, die über diese TLRs detektiert werden, können diese Toleranz induzieren [137, 138]. Koerner *et al.* konnten noch 24 h nach SID erhöhte HMGB1-Konzentrationen im Serum nachweisen [12]. Es ist anzunehmen, dass zumindest ein Teil der Hyporeagibilität durch die nach Trauma freigesetzten DAMPs und nach der Stimulation der TLRs *in vivo* verursacht wird, wodurch sie auf die *ex-vivo* Re-Stimulation in eingeschränkter Weise reagieren.

5.3.1.1 Regulatorische T-Zellen und ihr Einfluss auf die LPS-Toleranz

Neben der im folgenden Kapitel beschriebenen attenuierenden Wirkung des *N. vagus* stellt auf Milzebene die aktive Suppression der Zellen des angeborenen Immunsystems durch regulatorische T-Zellen einen weiteren Mechanismus der postoperativen Immunsuppression dar. Murphy *et al.* konnten zeigen, dass die Splenozyten von CD4⁺-lymphozytendefizienten Mäusen sieben Tage nach einem Verbrennungstrauma wesentlich höhere Zytokinmengen auf einen LPS-Stimulus hin sekretierten als die von Wildtypen. Durch den adoptiven Transfer von CD4⁺CD25⁺-Lymphozyten konnte dies wieder aufgehoben werden. Sie wiesen damit einen direkten attenuierenden Effekt der T_{reg}S auf die Zellen des angeborenen Immunsystems nach [139]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die regulatorischen T-Zellen 6 h nach SID in der Milz vollständig aktiviert sind und CTLA4 stärker exprimieren, so dass äquivalent eine aktive Suppression der Zytokinsekretion denkbar ist. Auch die fehlende Suppression der IL-10-Ausschüttung in beiden Kompartimenten kann einen Hinweis auf Einfluss der T_{reg}S ermöglichen, da

diese in ihrem aktivierten Zustand eine weitere IL-10-produzierende Population darstellen [140].

In die Betrachtung einbezogen werden müssen aber auch Hinweise aus der Sepsisforschung, nach denen die Zytokinreaktionen im hämatopoetischen System nach LPS-Stimulation kein Abbild eines generalisierten Zustands sind. Stattdessen entstehen Kompartimentalisierungsphänomene, und die Immunzellen am Entzündungsort besitzen keine funktionellen Einschränkungen [141]. Gleichzeitig korreliert aber die reduzierte Reagibilität auf LPS bei Intensivpatienten stark mit einem negativen Outcome im Falle septischer Komplikationen [142–145]. In diesem Kontext ist die induzierte LPS-Toleranz für den Organismus ein zweiseitiges Schwert. Auf der einen Seite wird im möglicherweise auf das Trauma folgenden septischen Geschehen das Risiko von Organschäden durch die attenuierte systemische Inflammation vermindert. Auf der anderen Seite reduziert sich die Reaktionsbereitschaft des Immunsystems auf Pathogene, mit denen es konfrontiert wird.

5.3.2 Entwicklung eines hyperinflammatorischen Phänotyps nach drei Tagen

Drei Tage nach Traumainduktion schlug der immunsupprimierte Phänotyp des frühen Zeitpunkts in einen hyperinflammatorischen Phänotyp um. Sämtliche untersuchten proinflammatorischen Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ) wurden in hochsignifikant höherer Quantität durch Splenozyten sekretiert, als dies in der unbehandelten Kontrollgruppe der Fall war. Auch für das antiinflammatorische IL-10 traf dies tendenziell zu. Im LPS-stimulierten Vollblut dagegen wurden nur IL-6 signifikant und IL-1 β tendenziell verstärkt sekretiert, zugleich war die IL-10-Sekretion hochsignifikant eingeschränkt.

Während also nach sechs Stunden die LPS-induzierten Zytokine in ihrer Balance eher in Richtung der Antiinflammation verändert waren, stellte sich die Reaktion des angeborenen Immunsystems auf den in-vitro *second hit* drei Tage nach SID in beiden Kompartimenten in ähnlicher Weise hyperinflammatorisch dar.

Diese Beobachtungen sind gut vereinbar mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die nach Trauma einen hyperinflammatorischen Phänotyp von

Makrophagen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten beschrieben haben [146–148]. In der Bewertung dieses Primings allerdings besteht keine Einigkeit: Paterson *et al.* beschrieben eine gesteigerte LPS-Reaktion in einem in-vivo Endotoxinämiemodell ab 24 h nach Trauma in verschiedenen Geweben, die noch sieben Tage später nachweisbar war. Sie vermuteten einen negativen Einfluss auf den Organismus im septischen Geschehen, da sie die verstärkte Zytokinsekretion in Verbindung mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Multiorganversagens sahen [131].

Auch Murphy *et al.* sahen eine verstärkte Sekretion von TNF- α aus Milzmakrophagen sieben Tage nach Trauma, ohne dass jedoch eine Überexpression des TLR4-MD2-Komplexes nachweisbar gewesen wäre. Interessanterweise verhielt es sich nach CLP (ein abdominales Sepsismodell) in genau umgekehrter Weise. Dort beobachteten sie eine Expressionssteigerung von TLR4-MD2, ohne aber eine gesteigerte TNF- α -Sekretion nachweisen zu können. Sie vermuteten divergente Regulationsmechanismen von septischer Inflammation und Trauma, auch wenn MAMPs und DAMPs primär über dieselben Rezeptoren detektiert werden [149]. Diese gesteigerte inflammatorische Reaktion auf LPS nach Trauma wird meist mit einer erhöhten Mortalität bei nachfolgender Sepsis in Verbindung gebracht, insbesondere wenn die Infektion von gramnegativen Bakterien getragen wird, wie es bei den meisten abdominalen Sepsismodellen der Fall ist [150, 151].

Aber auch gegenteilige Ergebnisse wurden beobachtet. Maung *et al.* beschrieben im Mausmodell bereits 24 h nach einem Verbrennungstrauma eine Mortalitätssenkung im Falle einer nachfolgenden Sepsis, die nach sieben Tagen ihr Maximum erreichte und mindestens bis Tag 14 persistierte. Frühere Zeitpunkte wiesen keinen Gruppenunterschied auf. Im selben Modell sahen sie eine stark verminderte Suszeptibilität für die Injektion lebender *E. coli* in der Traumagruppe. Begründet fand die Arbeitsgruppe dies in erhöhten Neutrophilen- und Monozytenzahlen im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche zusätzlich in ihrer antimikrobiellen Aktivität gesteigert waren. Aber auch die gesteigerte Empfänglichkeit der TLRs auf MAMPs sahen sie als positiven Mechanismus für eine schnellere und fulminantere Reaktion des Immunsystems auf eindringende Pathogene an [152].

Ebenfalls eine verminderte Mortalität sah in unserer Arbeitsgruppe Mathias Feuerherd, welcher ein intestinales Manipulationsmodell (IMM) anwandte [153]. Bei diesem Modell wurde der Dünndarm im Gegensatz zur SID nur einmal, anstelle von dreimal antegrad ausgestrichen. Er konnte bei einer drei Tage nach IMM durchgeführten CASP (ein abdominales Sepsismodell) einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber der Kontrollgruppe zeigen. Denselben Effekt konnte er auch für das Modell der CLP und die Injektion von *E. coli* zeigen. Interessanterweise lag die Mortalität der Versuchsgruppe in Folge einer CASP, die bereits sechs Stunden nach IMM durchgeführt wurde, noch über jener der Kontrollgruppe (Mortalität 85 % bzw. 60 % in der Kontrollgruppe), wenn auch ohne signifikanten Unterschied. Da die Traumagruppe zum Zeitpunkt der später induzierten Sepsis eine wesentlich geringere Mortalität aufweist, scheint der Zeitpunkt des Beginns der septischen Inflammation ein wesentlicher Parameter zu sein.

Zusammengefasst kann dieser Zustand der Hyperinflammation also vorteilhaft für den Organismus sein, wenn damit eine schnellere und effektivere Bekämpfung von Pathogenen möglich wird. Allerdings kann sie auch zu einer überschießenden systemischen Inflammation und gesteigerten Mortalität führen, wenn die Infektion aus anderen Gründen lokal nicht kontrolliert werden kann. In diesem Zusammenhang könnte der Unterschied zwischen Mortalitätssenkung und -steigerung zum einen das Ausmaß des septischen Insults sein und zum anderen der wechselnde Erfolg des aktivierten Immunsystems, diesen lokal zu begrenzen. Eine mögliche Theorie wäre, dass traumainduzierte DAMPs die Präaktivierung des angeborenen Immunsystems verursachen und so den hyperinflammatorischen Phänotyp induzieren. Folgt man der Theorie der DAMPs bzw. Alarmine, so wäre es nur folgerichtig anzunehmen, dass ihr Auftreten den Organismus auf einen Barrieredefekt vorbereitet und sein Immunsystem in Alarmbereitschaft für eindringende Pathogene versetzt [1, 2]. Evolutionär könnte solch ein Mechanismus einen Überlebensvorteil geboten haben.

Besonders interessant in der Betrachtung der LPS-induzierten Zytokinreaktion der Splenozyten und Immunzellen im Vollblut ist der offensichtliche zeitliche Verlauf. Sowohl die frühe Antiinflammation als auch die späte Hyperinflammation stellen in gegenteiliger Art und Weise sowohl Chance als auch Gefahr für den Organismus im Falle einer immunologischen Herausforderung dar. In Zusammenschau mit den Überlebenskinetiken von Mathias Feuerherd [153] wäre es denkbar, dass ein früh

nach einem Trauma im Stadium der Antiinflammation auftretender septischer Fokus, mit einer erhöhten Mortalität einher geht. Tritt er stattdessen mehrere Tage nach dem Trauma auf, so treffen die Pathogene auf ein voraktiviertes Immunsystem mit der Kapazität, diese kritische Situation besser abzuwehren. Die klinische Praxis zeichnet indes ein anderes Bild. Erfahrungsgemäß ist die Mortalität nach einem chirurgischen Eingriff hier andauernd erhöht. Diese Diskrepanz könnte in unterschiedlichen Strategien des murinen und humanen Immunsystems begründet sein und eine Limitation der Untersuchung im Mausmodell darstellen.

Dennoch werden durch die Ergebnisse deutlich die schwerwiegenden Auswirkungen eines operativen Traumas auf die Immunhomöostase aufgezeigt. Dadurch wird einmal mehr die Bedeutung einer möglichst breiten Anwendung minimal-invasiver Ansätze in der Chirurgie betont. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass laparoskopische Eingriffe gegen über konventionellen mit einer verminderten Ausschüttung von Inflammationsmediatoren sowie einer besseren Funktion von Immunzellen assoziiert sind [154–156]. Dies führt postoperativ zu einer verringerten Mortalität, einem geringeren Medikamentenbedarf und insgesamt zu verkürzten Krankenhausaufenthalten. In der Folge bedeutet das auch wirtschaftlich signifikant geringere Kosten trotz der höheren Materialkosten [157, 158].

Mit Blick auf die gegensätzlichen Schlussfolgerungen anderer Arbeitsgruppen bezüglich der Bewertung der posttraumatischen anti- und hyperinflammatorischen Phasen kann darauf geschlossen werden, dass Surrogatparameter wie die *ex-vivo* LPS-Stimulierbarkeit keine verlässlichen Aussagen über das Outcome im Falle septischer Komplikationen zulassen. So ergab die zuvor dargestellte Literaturrecherche, dass die beobachtete Hyperreagibilität nach Trauma teilweise mit einer erhöhten, aber auch mit einer verminderten Letalität assoziiert ist. Aufgrund dessen sollte darüber nachgedacht werden, in zukünftigen Projekten vermehrt mit Überlebenskinetiken als Endpunktstudien in Verbindung mit intermittierenden Blutentnahmen zu arbeiten. Auf diese Weise ließen sich beobachtete Parameter besser interpretieren und qualitative Aussagen über die Pathophysiologie komplexer Fragestellungen erreichen.

5.4 Der Einfluss des *N. vagus* auf die Immundysfunktion

Ein Ziel dieser Arbeit war es, auch die Rolle des cholinerg antiinflammatorischen Signalwegs via den *N. vagus* in der postoperativen Immundysfunktion zu untersuchen, um die Bedeutung dieser neuro-immunologischen Verschaltung besser zu verstehen. Auf einige der untersuchten Parameter konnte ein vagaler Einfluss nachgewiesen werden. Diese sollen folgend erneut diskutiert werden.

5.4.1 *N. vagus* und die humorale Immunantwort

Ein starker Einfluss des *N. vagus* konnte auf die Ausprägung der Zytokinlevel im Plasma nachgewiesen werden. Sechs Stunden nach SID waren die Konzentrationen von IL-1 β , IL-6, TNF- α und IL-10 in vagotomierten SID-Mäusen signifikant erhöht. Auch nach drei Tagen persistierten noch immer tendenziell erhöhte IL-6-Level gegenüber der SID-Gruppe mit intaktem *N. vagus*. Diese Beobachtung deckt sich mit der Literatur. Kessler *et al.* konnten 24 h nach CASP signifikant erhöhte Werte für TNF- α , IL-6, MCP-1 und IL-10 nachweisen, wenn zuvor eine Vagotomie durchgeführt wurde [23]. Dies korrelierte mit einer erhöhten Mortalität gegenüber der Gruppe mit intaktem CAIP [20]. Andere Arbeitsgruppen konnten durch eine zervikale Vagusstimulation die TNF- α -Plasmakonzentrationen nach i.v. LPS-Gabe senken [15]. Diese Ergebnisse unterstreichen den attenuierenden Einfluss des CAIP im Falle eines Traumas. Erst nach Vagotomie erreichen die Zytokinkonzentrationen nach SID Werte, die mit septischen Konstellationen vergleichbar sind.

5.4.2 *N. vagus* und die zelluläre Immunantwort

Diese Arbeit konnte auch deutliche vagale Einflüsse auf die Zellpopulationen im Blut zeigen. Sechs Stunden nach SID war die Leukozytenzahl in vagotomierten Tieren signifikant höher als bei intaktem CAIP. Dies wurde vor allem durch erhöhte Zahlen von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten verursacht: Die postoperative Lymphopenie war weniger stark ausgeprägt, die Neutrophilie eher verstärkt. Nur wenige Arbeitsgruppen haben bisher den Einfluss des CAIP auf die Zellmigration näher betrachtet, so dass über die genauen Signalwege und Auswirkungen in verschiedenen Kompartimenten Unklarheit besteht. Huston *et al.* konnten im Tiermodell zeigen, dass durch Vagusstimulation und Nikotingabe in der Inflammation

die Anzahl von neutrophilen Granulozyten in der Zirkulation schnell abfiel. Sie führten dies auf einen CD11b-abhängigen Effekt zurück und schlossen so auf eine wichtige Rolle des CAIP für die Neutrophilenmigration [159]. Da in dieser Arbeit durch die Durchführung einer Vagotomie der gegenteilige Effekt ausgelöst werden sollte, erscheinen die hier erhobenen Daten in eine ähnliche Richtung zu zeigen. Weitere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe geben Hinweise auf eine weniger ausgeprägte Leukozyteninfiltration in die Darmmuskularis nach SID bei vorangegangener Vagotomie [74]. Ob die höheren Leukozytenzahlen auf eine stärkere Mobilisierung durch die höheren Zytokinlevel, eine verringerte Migration zum Ort der Inflammation oder auch eine geringere Apoptoserate zurückzuführen sind, muss in weiteren Studien untersucht werden. Vorerst fügen sie sich aber in das Bild einer dysregulierten und verstärkt ablaufenden systemischen Inflammation nach SID ein.

Interessanterweise konnte sechs Stunden nach SID auch eine verringerte Phagozyteleistung der neutrophilen Granulozyten in vagotomierten SID-Tieren aufgezeigt werden. Es ist anzunehmen, dass dies direkt vor dem Hintergrund der verstärkten Neutrophilie zu sehen ist, die diese Gruppe aufweist. Denkbar ist, dass es sich dabei um größtenteils unreifere Granulozyten handelt. So besitzen beispielsweise die aus dem Knochenmark mobilisierten unreifen Granulozyten eine etwas geringere Phagozytosekapazität [105]. Dies könnte die leichte Reduktion der Phagozytosefähigkeit pro Zelle in den vagotomierten Mäusen sechs Stunden nach SID erklären. Allerdings ist anzunehmen, dass die höhere Anzahl an Effektorzellen die etwas geringere Leistung kompensiert.

5.4.3 *N. vagus* als Suppressionsmechanismus der Zytokinfreisetzung

Der dämpfende Effekt einer vagalen Stimulation auf die Zytokinsekretion in der Sepsis war eine der ersten Erkenntnisse, die zur Entdeckung des cholinerg antiinflammatorischen Signalweges führten. Borovikova *et al.* beschrieben 2000 die Fähigkeit des Acetylcholins, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch LPS-stimulierte humane Makrophagen zu dämpfen [15]. Inzwischen ist bekannt, dass dies vor allem über den $\alpha 7$ -nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor auf residenten Milzmakrophagen geschieht [17, 160]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sechs Stunden nach SID zu einer signifikanten Suppression der Sekretion von

TNF- α durch LPS-stimulierte Splenozyten kam, welche durch eine vorhergehende Vagotomie verhindert werden konnte. In ähnlicher Weise traf dies auch auf die tendenziell supprimierte Sekretion von IL-6 und IFN- γ zu. Da die LPS-Toleranz der Splenozyten mit vorher durchgeführter Vagotomie nicht auftrat, scheint der CAIP hier der dominante Suppressionsmechanismus zu sein. Im Vollblut ließ sich dieser Effekt sechs Stunden nach SID nur für IL-6 nachweisen, nicht aber für TNF- α , so dass von weiteren suppressiven Mechanismen wie der DAMP-induzierten LPS-Toleranz auszugehen ist. Einen weiteren Hinweis bietet die fehlende Suppression der IL-10-Sekretion nach SID. So beschrieben Baez-Pagan *et al.* 2015, dass durch die Aktivierung des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors selektiv proinflammatorische Zytokine, nicht aber antiinflammatorische supprimiert werden [18]. Drei Tage nach SID konnten keine vagalen Einflüsse mehr nachgewiesen werden, da zu diesem Zeitpunkt auch die SID-Gruppe mit intaktem *N. vagus* in eine Hyperinflammation umgeschlagen war. Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse den bedeutenden Einfluss dieses neuroimmunologischen Signalweges insbesondere in den ersten Stunden nach operativem Trauma.

6 Fazit und Zusammenfassung

Trotz aller medizinischen Fortschritte der letzten Jahrzehnte ist der Einfluss operativer Trauen auf die Immunhomöostase noch weitgehend unklar. Im Falle septischer Komplikationen sind postoperative Patienten meist mit einer noch höheren Mortalität assoziiert als septische Patienten ohne ein vorhergehendes operatives Trauma. Einen Grund dafür stellt die postoperative Immundysfunktion dar, welche von Länge und Ausmaß der Operation abhängt. Die pathophysiologischen Hintergründe sind noch unbekannt und erscheinen traumaspezifisch. Um diese einer näheren Betrachtung unterziehen zu können, wurde in unserer Arbeitsgruppe das Tiermodell der *Surgically induced Immune Dysfunction* (SID) etabliert. Dafür wird zur Simulation eines abdominalchirurgischen Eingriffs der Dünndarm nach einer medianen Laparotomie dreimal antegrad ausgestrichen. Einen möglichen Baustein zum Verständnis dieser Immundysfunktion stellt die Entdeckung des cholinergen antiinflammatorischen Signalweges (CAIP) dar. Über diesen ist das Zentralnervensystem via den *Nervus vagus* in der Lage, immunmodulatorisch einzuwirken. Ziel der Arbeit war es, aufgrund dessen unter anderem den systemischen Einfluss des CAIP auf die postoperative Immundysfunktion zu untersuchen. Dafür wurden einige Versuchstiere sechs Tage vor SID einer Vagotomie unterzogen. Die Analysen erfolgten nach sechs Stunden und drei Tagen.

Zusammenfassend konnte sechs Stunden nach SID eine Akut-Phase-Reaktion beobachtet werden, die durch eine Neutrophilie, Lymphopenie, erhöhte IL-6-Konzentrationen und komplett aktivierte T-Lymphozyten gekennzeichnet war. Gleichzeitig zeigten sich aber auch eine erhöhteIDO-Aktivität und eine reduzierte LPS-Stimulierbarkeit von Blut- und Milzzellen. Diese gedämpfte Immunreaktion auf den *in-vitro second hit* schlug bemerkenswerterweise nach drei Tagen in eine Hyperreagibilität und damit in einen hyperinflammatorischen Phänotyp um. Gleichzeitig reduzierte sich die Anzahl von T_{eff}^- und B-Lymphozyten, während zeitgleich eine relative T_{reg}^- -Expansion mit gesteigerter CTLA-4-Expression nachweisbar war. Diese Steigerung immunsuppressiver Mechanismen und dergleichenzeitige Verlust an Effektorzellen könnte im Falle eines nachfolgenden *second hit* zu der beobachteten gesteigerten Mortalität postoperativer Patienten beitragen. Wurde vor der SID eine Vagotomie durchgeführt, fiel die Inflammation sechs Stunden später noch intensiver aus: Die Neutrophilie war stärker ausgeprägt

und die Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen im Plasma war erhöht. Die reduzierte LPS-Stimulierbarkeit von Blut- und Immunzellen wurde im Wesentlichen aufgehoben. Nach drei Tagen verstärkte eine Vagotomie die bereits nach SID beobachtete Hyperreagibilität auf den LPS-Stimulus noch weiter.

Somit lassen diese Ergebnisse auf einen wichtigen immunsuppressiv wirkenden vagalen Einfluss auf die postoperative Immundysfunktion schließen und zeigen einen vielschichtigen zeitlichen Verlauf von Anti- und Hyperinflammation nach operativem Trauma auf. Eine nähere Erforschung dieses multiphasischen Verlaufs kann Implikationen für die klinische Praxis, insbesondere im Bezug auf Re-Operationen geben. Auch eröffnet es die spannende Frage, ob das Immunsystem auf einen postoperativen septischen Fokus in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur Operation unterschiedlich reagiert. Nicht zuletzt wird durch die Ergebnisse auch ein wichtiges Schlaglicht auf die Bedeutung von traumareduzierenden Operationsverfahren wie der minimal-invasiven laparoskopischen Chirurgie für das postoperative Outcome geworfen.

7 Literatur

- [1] Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 991–1045. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.005015
- [2] Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 359–365. doi:10.1016/j.coi.2005.06.002
- [3] Hirsiger S, Simmen H-P, Werner CML, et al. Danger signals activating the immune response after trauma. *Mediators Inflamm* 2012; 2012: 315941. doi:10.1155/2012/315941
- [4] Sido B, Teklote J-R, Hartel M, et al. Inflammatory response after abdominal surgery. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2004; 18: 439–454
- [5] Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, et al. Immunosuppression following surgical and traumatic injury. *Surg Today* 2010; 40: 793–808. doi:10.1007/s00595-010-4323-z
- [6] Islam MN, Bradley BA, Ceredig R. Sterile post-traumatic immunosuppression. *Clin Transl Immunology* 2016; 5: e77. doi:10.1038/cti.2016.13
- [7] Menges P, Kessler W, Kloecker C, et al. Surgical trauma and postoperative immune dysfunction. *Eur Surg Res* 2012; 48: 180–186. doi:10.1159/000338196
- [8] Koerner P, Westerholt A, Kessler W, et al. Operatives Trauma und postoperative Immunsuppression. *Chirurg* 2008; 79: 290–294. doi:10.1007/s00104-008-1465-2
- [9] NasirKhan MU. Anastomotic disruption after large bowel resection. *WJG* 2006; 12: 2497. doi:10.3748/wjg.v12.i16.2497
- [10] Choudhuri AH, Uppal R. Predictors of septic shock following anastomotic leak after major gastrointestinal surgery: An audit from a tertiary care institute. *Indian J Crit Care Med* 2013; 17: 298–303. doi:10.4103/0972-5229.120322
- [11] Angele MK, Chaudry IH. Surgical trauma and immunosuppression: Pathophysiology and potential immunomodulatory approaches. *Langenbecks Arch Surg* 2005; 390: 333–341. doi:10.1007/s00423-005-0557-4
- [12] Koerner P, Busemann A, Traeger T, et al. Postoperative immune suppression in visceral surgery: Characterisation of an intestinal mouse model. *Eur Surg Res* 2011; 47: 260–266. doi:10.1159/000333391
- [13] Kalff JC, Schraut WH, Simmons RL, et al. Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Ann Surg* 1998; 228: 652–663

- [14] Wehner S, Behrendt FF, Lyutenski BN, et al. Inhibition of macrophage function prevents intestinal inflammation and postoperative ileus in rodents. *Gut* 2007; 56: 176–185. doi:10.1136/gut.2005.089615
- [15] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458–462. doi:10.1038/35013070
- [16] Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, et al. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 11008–11013. doi:10.1073/pnas.0803237105
- [17] Jonge WJ de, Ulloa L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 915–929. doi:10.1038/sj.bjp.0707264
- [18] Baez-Pagan CA, Delgado-Velez M, Lasalde-Dominicci JA. Activation of the Macrophage alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor and Control of Inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol* 2015; 10: 468–476. doi:10.1007/s11481-015-9601-5
- [19] Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421: 384–388. doi:10.1038/nature01339
- [20] Kessler W, Diedrich S, Menges P, et al. The role of the vagus nerve: Modulation of the inflammatory reaction in murine polymicrobial sepsis. *Mediators Inflamm* 2012; 2012: 467620. doi:10.1155/2012/467620
- [21] van Westerloo DJ, Giebelen IAJ, Florquin S, et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *J Infect Dis* 2005; 191: 2138–2148. doi:10.1086/430323
- [22] Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 2006; 203: 1623–1628. doi:10.1084/jem.20052362
- [23] Kessler W, Traeger T, Westerholt A, et al. The vagal nerve as a link between the nervous and immune system in the instance of polymicrobial sepsis. *Langenbecks Arch Surg* 2006; 391: 83–87. doi:10.1007/s00423-006-0031-y

- [24] Goehler LE, Gaykema RP, Hansen MK, et al. Vagal immune-to-brain communication. A visceral chemosensory pathway. *Autonomic Neuroscience* 2000; 85: 49–59. doi:10.1016/S1566-0702(00)00219-8
- [25] Pavlov VA, Tracey KJ. Neural circuitry and immunity. *Immunol Res* 2015; 63: 38–57. doi:10.1007/s12026-015-8718-1
- [26] Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005; 201: 1355–1359. doi:10.1084/jem.20050640
- [27] Pallas Beneyto LA, Rodriguez Luis O, Saiz Sanchez C, et al. Prognostic value of interleukin 6 for death of patients with sepsis. *Med Clin (Barc)* 2016; 147: 281–286. doi:10.1016/j.medcli.2016.06.001
- [28] Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: Defining a role for IL-6. *J Immunol* 2005; 175: 3463–3468
- [29] Ng THS, Britton GJ, Hill EV, et al. Regulation of Adaptive Immunity; The Role of Interleukin-10. *Front Immunol* 2013; 4. doi:10.3389/fimmu.2013.00129
- [30] Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: Players, rules and the games. *Immunology* 2005; 115: 1–20. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x
- [31] Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, et al. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 4220–4224
- [32] Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 133–146. doi:10.1038/nri1001
- [33] Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, et al. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009; 8: 40–52
- [34] Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467–476. doi:10.1016/j.immuni.2004.08.018
- [35] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 163–189. doi:10.1189/jlb.0603252
- [36] Dunn AJ. Cytokine activation of the HPA axis. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917: 608–617

- [37] Bornstein SR, Ziegler CG, Krug AW, et al. The role of toll-like receptors in the immune-adrenal crosstalk. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1088: 307–318.
doi:10.1196/annals.1366.027
- [38] Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol* 2017; 17: 233–247. doi:10.1038/nri.2017.1
- [39] Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, et al. Role of Transcriptional Activation of IkappaBalpha in Mediation of Immunosuppression by Glucocorticoids. *Science* 1995; 270: 283–286. doi:10.1126/science.270.5234.283
- [40] Munn DH. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 220–225.
doi:10.1016/j.coi.2006.01.002
- [41] Schmidt SV, Schultze JL. New Insights into IDO Biology in Bacterial and Viral Infections. *Front Immunol* 2014; 5: 384. doi:10.3389/fimmu.2014.00384
- [42] Huttunen R, Syrjanen J, Aittoniemi J, et al. High activity of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. *Shock* 2010; 33: 149–154. doi:10.1097/SHK.0b013e3181ad3195
- [43] Tattevin P, Monnier D, Tribut O, et al. Enhanced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 2010; 201: 956–966. doi:10.1086/650996
- [44] Lee GK, Park HJ, Macleod M, et al. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 2002; 107: 452–460
- [45] Mellor AL, Chandler P, Baban B, et al. Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int Immunol* 2004; 16: 1391–1401.
doi:10.1093/intimm/dxh140
- [46] Lee S-M, Lee Y-S, Choi J-H, et al. Tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid selectively induces activated T cell death via intracellular GSH depletion. *Immunol Lett* 2010; 132: 53–60. doi:10.1016/j.imlet.2010.05.008
- [47] Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, et al. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 2002; 196: 459–468
- [48] Terness P, Bauer TM, Röse L, et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 2002; 196: 447–457

- [49] Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1069–1077. doi:10.1038/sj.cdd.4401073
- [50] Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 1999; 11: 153–159
- [51] Utsunomiya T, Kobayashi M, Herndon DN, et al. A relationship between the generation of burn-associated type 2 T cells and their antagonistic cells in thermally injured mice. *Burns* 1997; 23: 281–287
- [52] Fallarino F, Grohmann U, You S, et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 2006; 176: 6752–6761
- [53] Baban B, Chandler PR, Sharma MD, et al. IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. *J Immunol* 2009; 183: 2475–2483. doi:10.4049/jimmunol.0900986
- [54] Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, et al. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol* 2010; 185: 3190–3198. doi:10.4049/jimmunol.0903670
- [55] Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 1206–1212. doi:10.1038/ni1003
- [56] Boasso A, Herbeuval J-P, Hardy AW, et al. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells. *Blood* 2005; 105: 1574–1581. doi:10.1182/blood-2004-06-2089
- [57] Kasten KR, Tschop J, Goetzman HS, et al. T-cell activation differentially mediates the host response to sepsis. *Shock* 2010; 34: 377–383. doi:10.1097/SHK.0b013e3181dc0845
- [58] Lennard TW, Shenton BK, Borzotta A, et al. The influence of surgical operations on components of the human immune system. *Br J Surg* 1985; 72: 771–776
- [59] Ogawa K, Hirai M, Katsube T, et al. Suppression of cellular immunity by surgical stress. *Surgery* 2000; 127: 329–336. doi:10.1067/msy.2000.103498
- [60] Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; 6: 353–360. doi:10.1038/ni1181
- [61] Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol* 2007; 37 Suppl 1: S116-23. doi:10.1002/eji.200737593

- [62] Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, et al. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol* 1999; 162: 5813–5820
- [63] Bour-Jordan H, Blueston JA. CD28 function: A balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol* 2002; 22: 1–7
- [64] Sansom DM, Walker LSK. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunol Rev* 2006; 212: 131–148. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00419.x
- [65] Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 2011; 332: 600–603. doi:10.1126/science.1202947
- [66] Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322: 271–275. doi:10.1126/science.1160062
- [67] Wilson NS, El-Sukkari D, Villadangos JA. Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood* 2004; 103: 2187–2195. doi:10.1182/blood-2003-08-2729
- [68] Guery JC, Adorini L. Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells. *J Immunol* 1995; 154: 536–544
- [69] Sachse C, Wolterink G, Pallua N. Neutrophil intracellular pH and phagocytosis after thermal trauma. *Clin Chim Acta* 2000; 295: 13–26
- [70] Liao Y, Liu P, Guo F, et al. Correction. Oxidative Burst of Circulating Neutrophils Following Traumatic Brain Injury in Human. *PLoS One* 2013; 8. doi:10.1371/annotation/73ce45d3-4478-4c06-a4d2-3274b6222bae
- [71] Menges P, Klöcker C, Diedrich S, et al. Surgical trauma leads to a shorter survival in a murine orthotopic pancreatic cancer model. *Eur Surg Res* 2015; 54: 87–94. doi:10.1159/000368226
- [72] Julia Zeun. Charakterisierung der Immunsuppression nach chirurgischem Trauma im Mausmodell [Masterarbeit]. Greifswald: Universität Greifswald; 2017
- [73] Toft P, Lillevang ST, Tonnesen E, et al. Redistribution of lymphocytes following *E. coli* sepsis. *Scand J Immunol* 1993; 38: 541–545
- [74] Günther T. Der Einfluss des Nervus vagus auf die Zellmigration des adaptiven und angeborenen Immunsystems in der postoperativen Immunsuppression. Doctoralthesis, Universität Greifswald, 2021

- [75] Delogu G. Apoptosis and Surgical Trauma. *Arch Surg* 2000; 135: 1141.
doi:10.1001/archsurg.135.10.1141
- [76] Pellegrini JD, De AK, Kodys K, et al. Relationships between T lymphocyte apoptosis and anergy following trauma. *J Surg Res* 2000; 88: 200–206.
doi:10.1006/jsre.1999.5797
- [77] Teodorczyk-Injeyan JA, Cembrzynska-Nowak M, Lalani S, et al. Immune deficiency following thermal trauma is associated with apoptotic cell death. *J Clin Immunol* 1995; 15: 318–328. doi:10.1007/BF01541322
- [78] Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, et al. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: Findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med* 1997; 25: 1298–1307
- [79] Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, et al. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 325–337.
doi:10.1189/jlb.0105017
- [80] Venet F, Pachot A, Debard A-L, et al. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med* 2004; 32: 2329–2331
- [81] Venet F, Chung C-S, Kherouf H, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)/CD25 (+)/CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2009; 35: 678–686. doi:10.1007/s00134-008-1337-8
- [82] Schmoeckel K, Traffehn S, Eger C, et al. Full activation of CD4+ T cells early during sepsis requires specific antigen. *Shock* 2015; 43: 192–200.
doi:10.1097/SHK.0000000000000267
- [83] Nakanishi K. Innate and acquired activation pathways in T cells. *Nat Immunol* 2001; 2: 140–142. doi:10.1038/84236
- [84] Sprent J, Zhang X, Sun S, et al. T-cell proliferation in vivo and the role of cytokines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000; 355: 317–322.
doi:10.1098/rstb.2000.0568
- [85] Sun S, Sprent J. Role of Type I Interferons in T Cell Activation Induced by CpG DNA. In: Wagner H, Hrsg. *Immunobiology of Bacterial CpG-DNA*. Bd. 247. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 0070-217X. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2000: 107–117. doi:10.1007/978-3-642-59672-8_7

- [86] Jiang J, Lau LL, Shen H. Selective Depletion of Nonspecific T Cells During the Early Stage of Immune Responses to Infection. *J Immunol* 2003; 171: 4352–4358. doi:10.4049/jimmunol.171.8.4352
- [87] Enoh VT, Lin SH, Etogo A, et al. CD4+ T-cell depletion is not associated with alterations in survival, bacterial clearance, and inflammation after cecal ligation and puncture. *Shock* 2008; 29: 56–64. doi:10.1097/shk.0b013e318070c8b9
- [88] Kuhlhorn F, Rath M, Schmoeckel K, et al. Foxp3+ regulatory T cells are required for recovery from severe sepsis. *PLoS One* 2013; 8: e65109. doi:10.1371/journal.pone.0065109
- [89] Zeun J. Einfluss der Indolamin-2,3-Dioxygenase-Inhibition sechs Stunden nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis im murinen Modell [Bachelorarbeit]. Greifswald: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; 2015
- [90] Junginger H. Einfluss des Indolamin-2,3-Dioxygenase-Inhibitors 1-Methyltryptophan auf den frühen Verlauf einer murinen polymikrobiellen Sepsis [Masterarbeit]. Greifswald: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; 2016
- [91] Schmoeckel K. Entzündungs-induzierte Immunsuppression im murinen Modell [Dissertation]. Greifswald: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; 2015
- [92] Hundt LE. Analyse des Zeitverlaufs der postoperativen Immundysfunktion nach viszeralchirurgischen Eingriffen anhand des Mausmodells der surgically-induced immune dysfunction. Greifswald; 2022
- [93] Scumpia PO, Delano MJ, Kelly KM, et al. Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2006; 177: 7943–7949
- [94] Albertsmeier M, Quaiser D, Dossow-Hanfstingl V von, et al. Major surgical trauma differentially affects T-cells and APC. *Innate Immun* 2015; 21: 55–64. doi:10.1177/1753425913516659
- [95] MacConmara MP, Maung AA, Fujimi S, et al. Increased CD4+ CD25+ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity. *Ann Surg* 2006; 244: 514–523. doi:10.1097/01.sla.0000239031.06906.1f
- [96] Valk E, Rudd CE, Schneider H. CTLA-4 trafficking and surface expression. *Trends Immunol* 2008; 29: 272–279. doi:10.1016/j.it.2008.02.011
- [97] Kawasaki T, Hubbard WJ, Choudhry MA, et al. Trauma-Hemorrhage Induces Depressed Splenic Dendritic Cell Functions in Mice. *J Immunol* 2006; 177: 4514–4520. doi:10.4049/jimmunol.177.7.4514

- [98] Flohe SB, Agrawal H, Schmitz D, et al. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 473–481. doi:10.1189/jlb.0705413
- [99] Tinsley KW, Grayson MH, Swanson PE, et al. Sepsis Induces Apoptosis and Profound Depletion of Splenic Interdigitating and Follicular Dendritic Cells. *J Immunol* 2003; 171: 909–914. doi:10.4049/jimmunol.171.2.909
- [100] Hwu P, Du MX, Lapointe R, et al. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Production by Human Dendritic Cells Results in the Inhibition of T Cell Proliferation. *J Immunol* 2000; 164: 3596–3599. doi:10.4049/jimmunol.164.7.3596
- [101] Redmond HP, Watson RW, Houghton T, et al. Immune function in patients undergoing open vs laparoscopic cholecystectomy. *Arch Surg* 1994; 129: 1240–1246
- [102] Tabuchi Y, Shinka S, Ishida H. The effects of anesthesia and surgery on count and function of neutrophils. *J Anesth* 1989; 3: 123–131. doi:10.1007/s0054090030123
- [103] Maes M, van der Planken M, Stevens WJ, et al. Leukocytosis, monocytosis and neutrophilia. Hallmarks of severe depression. *Journal of Psychiatric Research* 1992; 26: 125–134. doi:10.1016/0022-3956(92)90004-8
- [104] Arturson G. Neutrophil granulocyte functions in severely burned patients. *Burns* 1985; 11: 309–319. doi:10.1016/0305-4179(85)90093-2
- [105] Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissieres P, et al. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 2013; 41: 820–832. doi:10.1097/CCM.0b013e318274647d
- [106] Kanyilmaz S, Hepguler S, Atamaz FC, et al. Phagocytic and oxidative burst activity of neutrophils in patients with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2013; 94: 369–374. doi:10.1016/j.apmr.2012.09.015
- [107] Kurihara T, Jones CN, Yu Y-M, et al. Resolvin D2 restores neutrophil directionality and improves survival after burns. *FASEB J* 2013; 27: 2270–2281. doi:10.1096/fj.12-219519
- [108] Moudgil GC, Pandya AR, Ludlow DJ. Influence of anaesthesia and surgery on neutrophil chemotaxis. *Canad. Anaesth. Soc. J.* 1981; 28: 232–238. doi:10.1007/BF03005506

- [109] Gregoire M, Tadie J-M, Uhel F, et al. HMGB1 induces neutrophil dysfunction in experimental sepsis and in patients who survive septic shock. *J Leukoc Biol* 2016. doi:10.1189/jlb.5HI0316-128RR
- [110] Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, et al. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin Sci (Lond)* 1990; 79: 161–165
- [111] Shenkin A, Fraser WD, Series J, et al. The serum interleukin 6 response to elective surgery. *Lymphokine Res* 1989; 8: 123–127
- [112] Menger MD, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch Surg* 2004; 389: 475–484. doi:10.1007/s00423-004-0472-0
- [113] Jawa RS, Anillo S, Huntoon K, et al. Interleukin-6 in surgery, trauma, and critical care part II: clinical implications. *J Intensive Care Med* 2011; 26: 73–87. doi:10.1177/0885066610384188
- [114] Miyaoka K, Iwase M, Suzuki R, et al. Clinical evaluation of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels after surgery-induced inflammation. *J Surg Res* 2005; 125: 144–150. doi:10.1016/j.jss.2004.12.001
- [115] Neunhoeffer F, Plinke S, Renk H, et al. Serum Concentrations of Interleukin-6, Procalcitonin, and C-Reactive Protein: Discrimination of Septical Complications and Systemic Inflammatory Response Syndrome after Pediatric Surgery. *Eur J Pediatr Surg* 2016; 26: 180–185. doi:10.1055/s-0034-1544047
- [116] Mokart D, Merlin M, Sannini A, et al. Procalcitonin, interleukin 6 and systemic inflammatory response syndrome (SIRS): early markers of postoperative sepsis after major surgery. *Br J Anaesth* 2005; 94: 767–773. doi:10.1093/bja/aei143
- [117] Lyons A, Goebel A, Mannick JA, et al. Protective effects of early interleukin 10 antagonism on injury-induced immune dysfunction. *Arch Surg* 1999; 134: 1317-23; discussion 1324
- [118] Neidhardt R, Keel M, Steckholzer U, et al. Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients. *J Trauma* 1997; 42: 863-70; discussion 870-1
- [119] Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 2000; 127: 117–126. doi:10.1067/msy.2000.101584

- [120] Angele MK, Faist E. Clinical review: Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 2002; 6: 298.
doi:10.1186/cc1514
- [121] Delgado S, Lacy AM, Filella X, et al. Acute phase response in laparoscopic and open colectomy in colon cancer: randomized study. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 638–646
- [122] Faries PL, Simon RJ, Martella AT, et al. Intestinal Permeability Correlates with Severity of Injury in Trauma Patients. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 1998; 44
- [123] Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281: 1191–1193
- [124] Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, et al. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 465–477.
doi:10.1038/nrn3257
- [125] Hansen MK, Daniels S, Goehler LE, et al. Subdiaphragmatic vagotomy does not block intraperitoneal lipopolysaccharide-induced fever. *Autonomic Neuroscience* 2000; 85: 83–87. doi:10.1016/S1566-0702(00)00224-1
- [126] Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 60–72. doi:10.1007/s00018-005-5390-y
- [127] Szatmari I, Nagy L. Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function. *EMBO J* 2008; 27: 2353–2362.
doi:10.1038/emboj.2008.160
- [128] Liberman AC, Refojo D, Druker J, et al. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. *FASEB J* 2007; 21: 1177–1188. doi:10.1096/fj.06-7452com
- [129] Drude S, Geissler A, Olfe J, et al. Side effects of control treatment can conceal experimental data when studying stress responses to injection and psychological stress in mice. *Lab Anim (NY)* 2011; 40: 119–128.
doi:10.1038/labani0411-119
- [130] Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1425–1433. doi:10.1016/j.jaci.2004.07.014

- [131] Paterson HM, Murphy TJ, Purcell EJ, et al. Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity. *J Immunol* 2003; 171: 1473–1483
- [132] Li CH, Wang JH, Redmond HP. Bacterial lipoprotein-induced self-tolerance and cross-tolerance to LPS are associated with reduced IRAK-1 expression and MyD88-IRAK complex formation. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 867–875. doi:10.1189/jlb.0905505
- [133] Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, et al. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 2001; 166: 5161–5167
- [134] Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 2000; 164: 5564–5574
- [135] Wang JH, Doyle M, Manning BJ, et al. Induction of bacterial lipoprotein tolerance is associated with suppression of toll-like receptor 2 expression. *J Biol Chem* 2002; 277: 36068–36075. doi:10.1074/jbc.M205584200
- [136] Gunther J, Petzl W, Zerbe H, et al. Lipopolysaccharide priming enhances expression of effectors of immune defence while decreasing expression of pro-inflammatory cytokines in mammary epithelia cells from cows. *BMC Genomics* 2012; 13: 17. doi:10.1186/1471-2164-13-17
- [137] Aneja R, Odoms K, Dunsmore K, et al. Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. *J Immunol* 2006; 177: 7184–7192
- [138] Aneja RK, Tsung A, Sjodin H, et al. Preconditioning with high mobility group box 1 (HMGB1) induces lipopolysaccharide (LPS) tolerance. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 1326–1334. doi:10.1189/jlb.0108030
- [139] Murphy TJ, Ni Choileain N, Zang Y, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control innate immune reactivity after injury. *J Immunol* 2005; 174: 2957–2963
- [140] Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212: 28–50. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x
- [141] Cavillon JM, Adib-Conquy M, Cloez-Tayarani I, et al. 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

- [142] Antonakos N, Tsaganos T, Oberle V, et al. Decreased cytokine production by mononuclear cells after severe gram-negative infections: early clinical signs and association with final outcome. *Crit Care* 2017; 21: 48. doi:10.1186/s13054-017-1625-1
- [143] Heagy W, Nieman K, Hansen C, et al. Lower levels of whole blood LPS-stimulated cytokine release are associated with poorer clinical outcomes in surgical ICU patients. *Surg Infect (Larchmt)* 2003; 4: 171–180. doi:10.1089/109629603766956960
- [144] Munoz C, Carlet J, Fitting C, et al. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1747–1754. doi:10.1172/JCI115493
- [145] Ploder M, Pelinka L, Schmuckenschlager C, et al. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production and not monocyte human leukocyte antigen-DR expression is correlated with survival in septic trauma patients. *Shock* 2006; 25: 129–134. doi:10.1097/01.shk.0000191379.62897.1d
- [146] Schwacha MG. Macrophages and post-burn immune dysfunction. *Burns* 2003; 29: 1–14
- [147] Wu JZ, Ogle CK, Mao JX, et al. The increased potential for the production of inflammatory cytokines by Kupffer cells and splenic macrophages eight days after thermal injury. *Inflammation* 1995; 19: 529–541
- [148] Zallen G, Moore EE, Johnson JL, et al. Circulating postinjury neutrophils are primed for the release of proinflammatory cytokines. *J Trauma* 1999; 46: 42–48
- [149] Murphy TJ, Paterson HM, Mannick JA, et al. Injury, sepsis, and the regulation of Toll-like receptor responses. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 400–407. doi:10.1189/jlb.0503233
- [150] Moss NM, Gough DB, Jordan AL, et al. Temporal correlation of impaired immune response after thermal injury with susceptibility to infection in a murine model. *Surgery* 1988; 104: 882–887
- [151] Shelley O, Murphy T, Paterson H, et al. Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury. *Shock* 2003; 20: 123–129. doi:10.1097/01.shk.0000079426.52617.00

- [152] Maung AA, Fujimi S, MacConmara MP, et al. Injury enhances resistance to *Escherichia coli* infection by boosting innate immune system function. *J Immunol* 2008; 180: 2450–2458
- [153] Feuerherd M. Evaluierung eines Modells der chirurgischen intestinalen Manipulation zur Darstellung der postoperativen Immunsuppression [Dissertation]. Greifswald: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; 2012
- [154] Ordemann J, Jacobi CA, Schwenk W, et al. Cellular and humoral inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections. *Surg Endosc* 2001; 15: 600–608. doi:10.1007/s004640090032
- [155] Shi L, Guo H, Zheng Z, et al. Laparoscopic Surgery Versus Open Surgery for Colorectal Cancer: Impacts on Natural Killer Cells. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 2020; 27: 1073274820906811. doi:10.1177/1073274820906811
- [156] Tylicka M, Matuszczak E, Kamińska J, et al. Intraoperative Peritoneal Interleukin-6 Concentration Changes in Relation to the High-Mobility Group Protein B1 and Heat Shock Protein 70 Levels in Children Undergoing Cholecystectomy. *Mediators Inflamm* 2020; 2020: 9613105. doi:10.1155/2020/9613105
- [157] Faiz O, Warusavitarne J, Bottle A, et al. Laparoscopically assisted vs. open elective colonic and rectal resection: a comparison of outcomes in English National Health Service Trusts between 1996 and 2006. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 1695–1704. doi:10.1007/DCR.0b013e3181b55254
- [158] Delaney CP, Kiran RP, Senagore AJ, et al. Case-matched comparison of clinical and financial outcome after laparoscopic or open colorectal surgery. *Ann Surg* 2003; 238: 67–72. doi:10.1097/01.sla.0000074967.53451.22
- [159] Huston JM, Rosas-Ballina M, Xue X, et al. Cholinergic neural signals to the spleen down-regulate leukocyte trafficking via CD11b. *J Immunol* 2009; 183: 552–559. doi:10.4049/jimmunol.0802684
- [160] Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420: 853–859. doi:10.1038/nature01321

8 Anhang

8.1 Antikörperfärbungen

Tabelle 2: Antikörper-Panel zur Analyse der Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen in der Milz

Färbung 1		Färbung 2	
CD4	FITC	CD4	FITC
CD11b	V450	CD11b	V450
Foxp3 ¹	APC	Foxp3 ¹	APC
CD69	PE	CD69-Iso	PE
CD25	PE-Cy7	CD25-Iso	PE-Cy7
Färbung 3		Färbung 4	
CD4	FITC	CD4	FITC
CD11b	V450	CD11b	V450
Foxp3 ¹	APC	Foxp3 ¹	APC
CTLA4 ^{1,2}	PE	CTLA4-Iso ^{1,2}	PE

Tabelle 3: Antikörper zur Analyse der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen

Spezifität	Konjugat	Host	Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller	Verdünnung
CD4	FITC	rat	IgG2b, κ	L3T4	0,5 mg/ml	BD 553729, L. 68488	1:50
CD11b	V450	rat	IgG2b, κ	M1/70	0,2 mg/ml	BD 560455, L. 85417	1:200
Foxp3	APC	mouse	IgG1	3G3		Miltenyi 130-093-013, L. 5110616121	1:12,5
CD25	PE-Cy7	rat	IgG1, λ	PC61.5	0,2 mg/ml	eBioscience 25-0251-82, L. E07536-1630	1:50
	PE-Cy7	rat	IgG1, λ	EBRG 1	0,2 mg/ml	eBioscience 25-4301	1:50
CD69	PE	Arm. Hamster	IgG1, λ3	H1.2F3	0,2 mg/ml	BD 553237, L. 28310	1:50
	PE	Arm. Hamster	IgG1, λ3	G235-2356	0,2 mg/ml	BD 553954	1:50
CTLA-4	pure	Hamster	IgG1, κ	UC10-4F10-11	0,5 mg/ml	BD 553719, L. 0000064169	1:50
	pure	Hamster	IgG1, κ	A19-3	0,5 mg/ml	BD 553969, L.3074739	1:50

Tabelle 4: Sekundär- und Tertiärreagenzien zur Analyse der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen

Spezifität	Konjugat	Konzentration	Hersteller	Verdünnung
Anti-Arm. & Syrian Hamster IG	Biotin	0,5 mg/ml	BD 554010	1:200

Streptavidin	PE	0,2 mg/ml	eBioscience 12-4317	1:200
--------------	----	-----------	---------------------	-------

Tabelle 5: Durchflusszytometrische Färbung zur Analyse von CD11b und MHC-II auf Splenozyten (1: Sekundärreagenz Streptavidin-PE-Cy7)

Färbung 5		Färbung 6	
CD11c	FITC	CD11c	FITC
CD4	PE	CD4	PE
MHC-II ¹	PE-Cy7	MHC-II-Iso ¹	PE-Cy7
CD19	A647	CD19	A647
Ly6G	V450	Ly6G	V450
B220	V500	B220	V500
CD11b	APC-A780	CD11b	APC-A780

Tabelle 6: Antikörper zur Analyse von CD11b und MHC-II auf Splenozyten

Spezifität	Konjugat	Host	Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller	Verdünnung
CD11c	FITC	Arm. Hamster	IgG1, λ2	HL3	0,5 mg/ml	BD 557400, L. 78595	1:50
CD4	PE	rat	IgG2a, κ	RM4-5	0,2 mg/ml	BD 553049, L. 42069	1:500
MHC-II	Biotin	rat	IgG2b, κ	M5/114.1 5.2	0,5 mg/ml	eBioscience 13-5321-82, L. E02876-280	1:200
CD19	A647	rat	IgG2a, κ	eBio1D3 (1D3)	0,2 mg/ml	eBioscience 51-0193-82, L. E08560-1630	1:100
Ly6G	V450	rat	IgG2a, κ	1A8	0,2 mg/ml	BD 560603, L. 75483	1:200
B220	V500	rat	IgG2a, κ	RA3-6B2	0,2 mg/ml	BD 561226, L. 04335	1:50
CD11b	APC-A780	rat	IgG2b, κ	M1/70	0,2 mg/ml	eBioscience 47-0112-82, L. E10339-1637	1:50

Tabelle 7: Durchflusszytometrische Färbung zur Analyse der NK- und T-Zellpopulationen in der Milz

Färbung 7	
CD49b	FITC
NK1.1	PE
CD8a	PE-Cy7
CD4	A700
Ly6G	V450
CD3e	V500
CD11b	APC-A780

Tabelle 8: Antikörper zur Analyse der NK- und T-Zellpopulationen in der Milz

Spezifität	Konjugat	Host	Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller	Verdünnung
CD49b	FITC	rat	IgM, κ	DX5	0,5 mg/ml	Pharmingen 09944D, L. M026781	1:50
NK1.1	PE	rat	IgG2a, κ	PK136	0,2 mg/ml	eBioscience 12- 5941-82, L. E034025	1:50
CD8a	Biotin	rat	IgG2a,κ	53-6.7	0,5 mg/ml	Biolegend 100704, L. B144948	1:50
CD4	A700	rat	IgG2a,κ	GK1.5	0,5 mg/ml	Biolegend 100536, L. B155549	1:50
Ly6G	V450	rat	IgG2a, κ	1A8	0,2 mg/ml	BD 560603, L. 75483	1:200
CD3e	V500	Hamster	500A2	500A2	0,2 mg/ml	BD 560771, L. 80245	1:50
CD11b	APC-A780	rat	IgG2b, κ	M1/70	0,2 mg/ml	eBioscience 47- 0112-82, L. E10339-1637	1:50

Tabelle 9: Sekundärreagenzien zur Analyse von MHC-II und T-Zellpopulationen in der Milz

	Konjugat	Konzentration	Hersteller	Verdünnung
Streptavidin	PE-Cy7	0,2 mg/ml	eBioscience 25-4317- 82, L. E07615-1597	1:500

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Tryptophan-Katabolismus	15
Abbildung 2: Zeitstrahl des Versuches zur Untersuchung der immunologischen Dysfunktion nach operativem Trauma unter Einfluss des <i>N. vagus</i>	28
Abbildung 3: Absolute Zellzahl der Leukozytenpopulationen im Blut 6 h nach SID..	39
Abbildung 4: Relative Verteilung der Zellpopulationen 6 h nach SID.....	40
Abbildung 5: Relative Verteilung der Zellpopulationen im Blut 72 h nach SID.....	41
Abbildung 6: Zytokinprofil 6 h nach SID	42
Abbildung 7: Zytokinprofil 72 h nach SID.....	43
Abbildung 8: Zytokinsekretion nach LPS-Stimulation von Vollblut 6 h und 72 h nach SID	44
Abbildung 9: Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten im Blut 6 h nach SID	46

Abbildung 10: Konzentration und Ratio der Edukte und Produkte des Tryptophan-Katabolismus 6 h nach SID	47
Abbildung 11: Plasmakonzentration von Corticosteron 6 h und 72 h nach SID	49
Abbildung 12: Absolute Anzahl der Splenozyten nach SID	50
Abbildung 13: Anzahl und Verteilung der B- und T-Lymphozyten in der Milz 72 h nach SID	51
Abbildung 14: Anzahl der CD4- und CD8-T-Lymphozyten in der Milz 72 h nach SID	53
Abbildung 15: Anzahl und Verteilung der T _{reg} - und T _{eff} -Lymphozyten in der Milz 72 h nach SID	54
Abbildung 16: Expression von CD69 und CD25 auf T _{eff} und T _{reg} in der Milz 6 h nach SID	56
Abbildung 17: Expression von CTLA-4 auf T _{eff} und T _{reg} in der Milz 6 h und 72 h nach SID	58
Abbildung 18: Anzahl und Verteilung der neutrophilen Granulozyten 6 h nach SID .	60
Abbildung 19: Anzahl und Verteilung der neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen 72 h nach SID	61
Abbildung 20: Die Expression von MHC-II, Anzahl und Verteilung der dendritischen Zellen 72 h nach SID in der Milz	62
Abbildung 21: Zytokinlevel im Überstand LPS-stimulierter Splenozyten 6 h und 72 h nach SID	63
Abbildung 22: Gatingstrategie des Phagozytose-Assays	102
Abbildung 23: Gatingstrategie der CD4+ T-Zellen in der Milz	103
Abbildung 24: Gatingstrategie zur Analyse von MHC-II auf dendritischen Zellen und Quantifizierung von neutrophilen Ganulozyten und B-Lymphozyten in der Milz	104
Abbildung 25: Gatingstrategie zur Analyse der NK- und T-Zellpopulationen in der Milz	105
Abbildung 26: Absolute Zellzahl der Leukozytenpopulationen im Blut 72 h nach SID	106

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppenaufbau zur Untersuchung der immunologischen Dysfunktion nach operativen Trauma unter Einfluss des <i>N. vagus</i>	28
---	----

Tabelle 2: Antikörper-Panel zur Analyse der Aktivierung der CD4 ⁺ T-Zellen in der Milz	97
Tabelle 3: Antikörper zur Analyse der Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen.....	97
Tabelle 4: Sekundär- und Tertiärreagenzien zur Analyse der Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen.....	97
Tabelle 5: Durchflusszytometrische Färbung zur Analyse von CD11b und MHC-II auf Splenozyten (1: Sekundärreagenz Streptavidin-PE-Cy7)	98
Tabelle 6: Antikörper zur Analyse von CD11b und MHC-II auf Splenozyten	98
Tabelle 7: Durchflusszytometrische Färbung zur Analyse der NK- und T-Zellpopulationen in der Milz	98
Tabelle 8: Antikörper zur Analyse der NK- und T-Zellpopulationen in der Milz.....	99
Tabelle 9: Sekundärreagenzien zur Analyse von MHC-II und T-Zellpopulationen in der Milz.....	99

8.4 Gatingstrategien

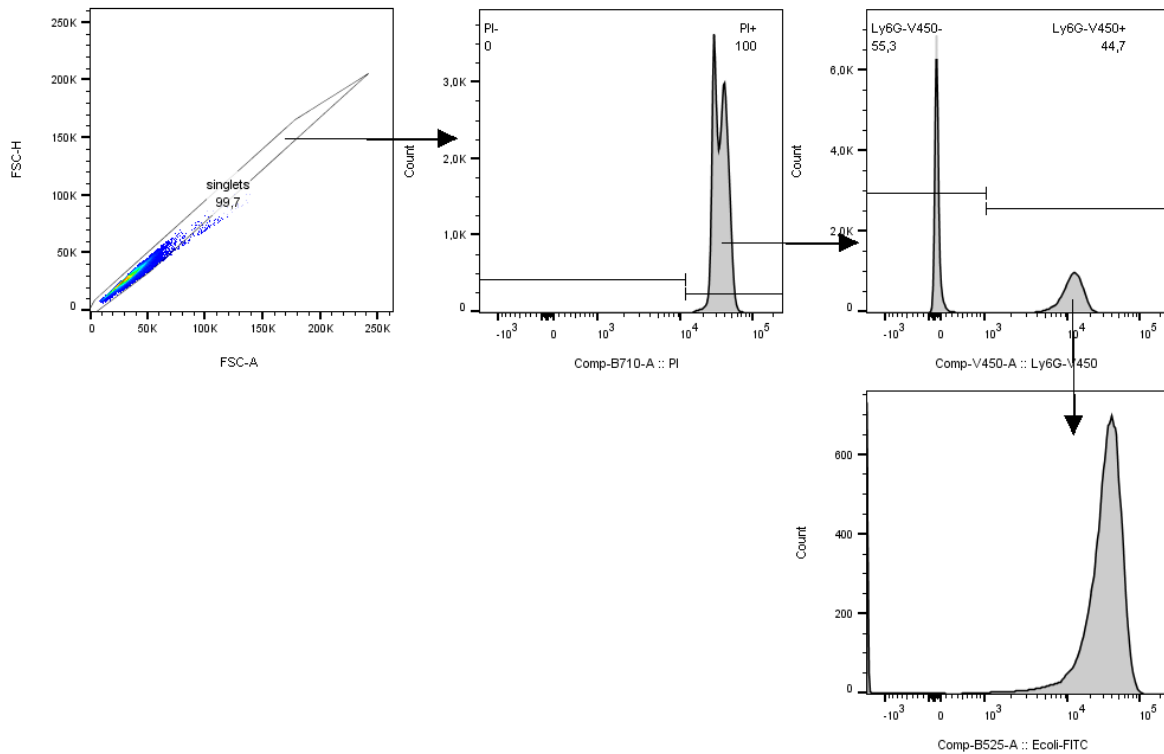


Abbildung 22: Gatingstrategie des Phagozytose-Assays

Zur Quantifizierung der Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten wurde Vollblut zu 6 h und 72 h nach SID durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden lebende Zellen mit PI markiert. Die neutrophilen Granulozyten wurden über einen Ly6G-Antikörper identifiziert und mit markierten *E. coli* inkubiert. Dargestellt ist die Gatingstrategie.

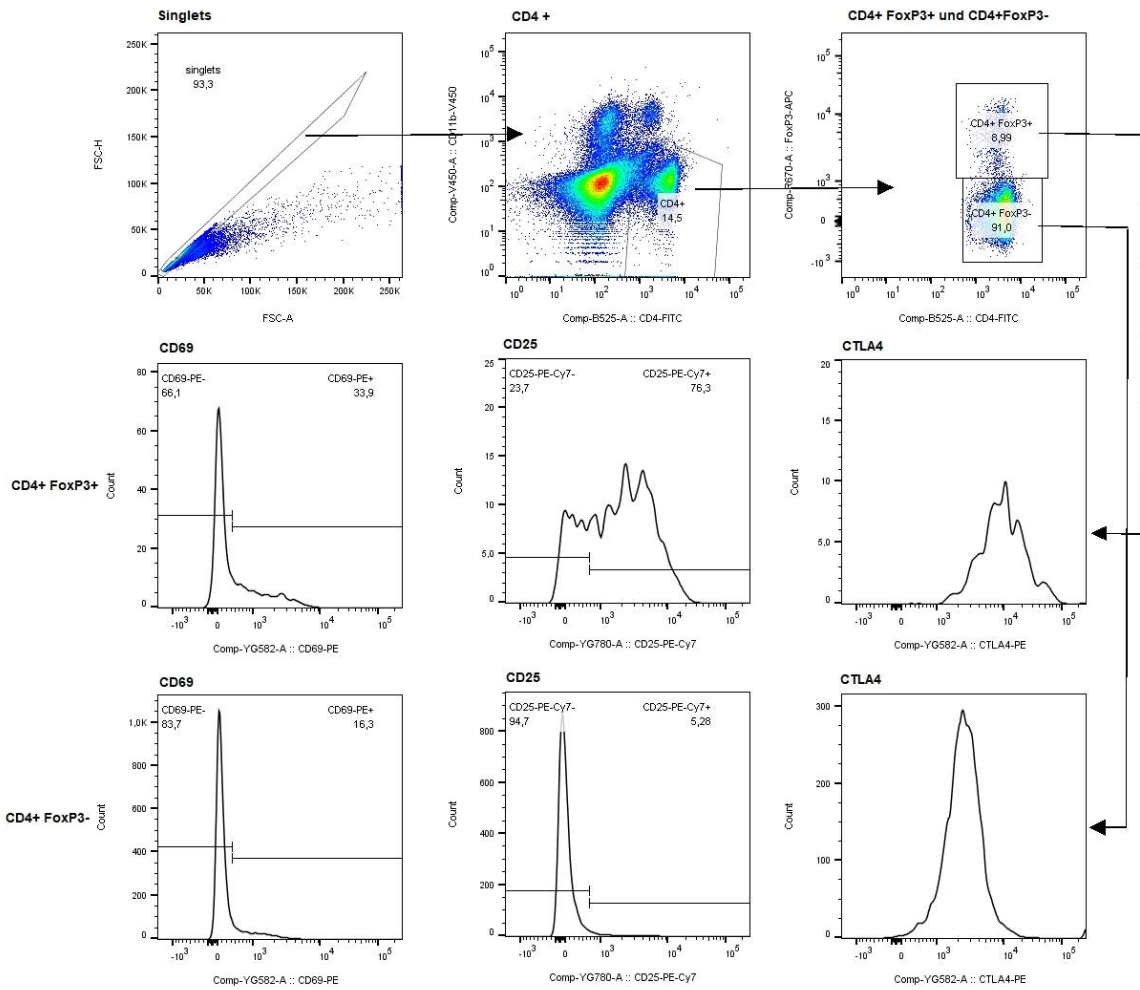


Abbildung 23: Gatingstrategie der CD4+ T-Zellen in der Milz

Für die Quantifizierung der CD4+ T-Zellen und die Analyse des Aktivierungsstatus in der Milz wurde zu 6 h und 72 h nach SID eine durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten durchgeführt. Dafür wurden die isolierten Zellen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD4, Foxp3, CD69, CD25 und CTLA-4 gefärbt. Dargestellt ist die Gatingstrategie für die Analyse von CD4+ Foxp3+ regulatorischer T-Zellen und CD4+ Foxp3- T-Effektorzellen sowie die Expression von CD69, CD25 und CTLA-4 auf diesen Zellen.

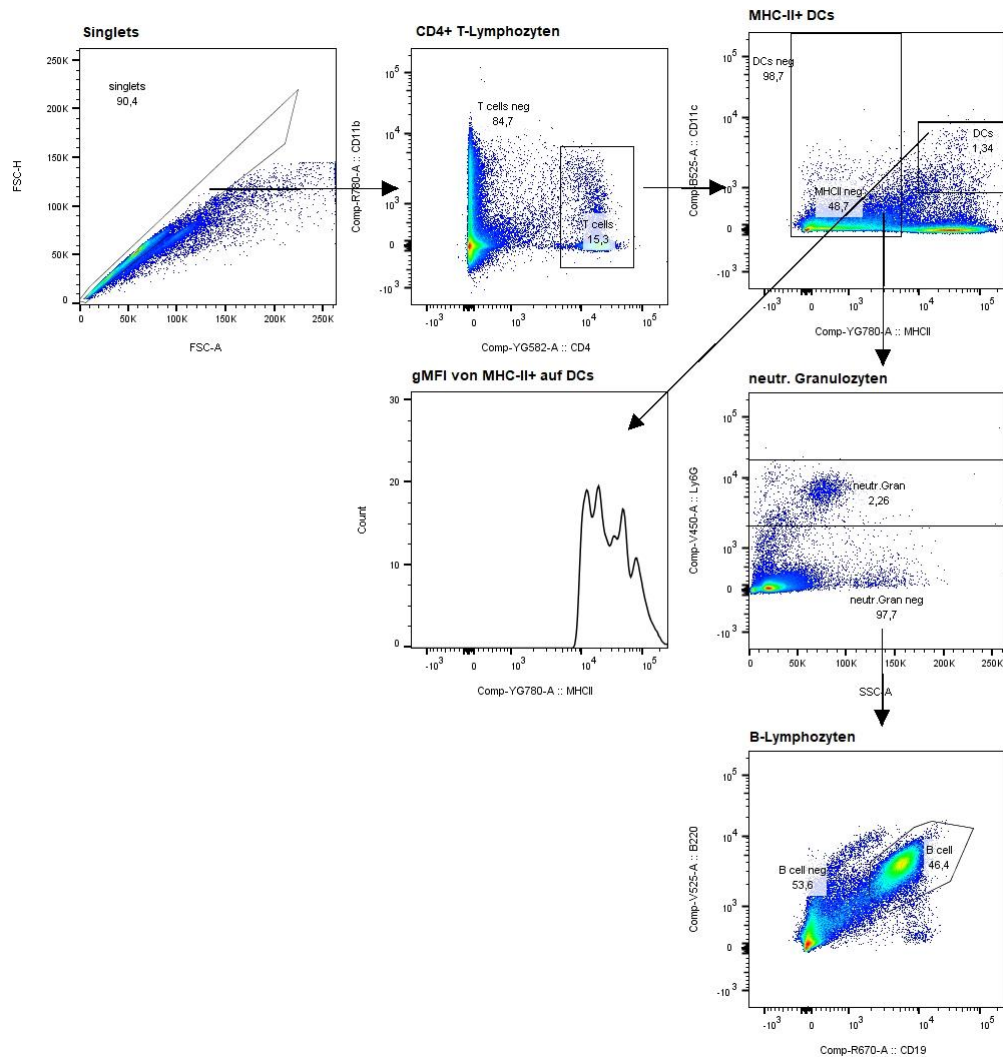


Abbildung 24: Gatingstrategie zur Analyse von MHC-II auf dendritischen Zellen und Quantifizierung von neutrophilen Granulozyten und B-Lymphozyten in der Milz

Für die Quantifizierung verschiedener Zellpopulationen sowie der Expression von MHC-II auf dendritischen Zellen in der Milz wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Dafür wurden die isolierten Zellen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD19, B220, CD4, Ly6G, MHCII, CD11b und CD11c gefärbt. Dargestellt ist die Gatingstrategie für die Analyse von CD4+ T-Zellen, CD19+ B220+ B-Lymphozyten, MHCII+ CD11^{chi} DCs und Ly6G+ neutrophiler Granulozyten.

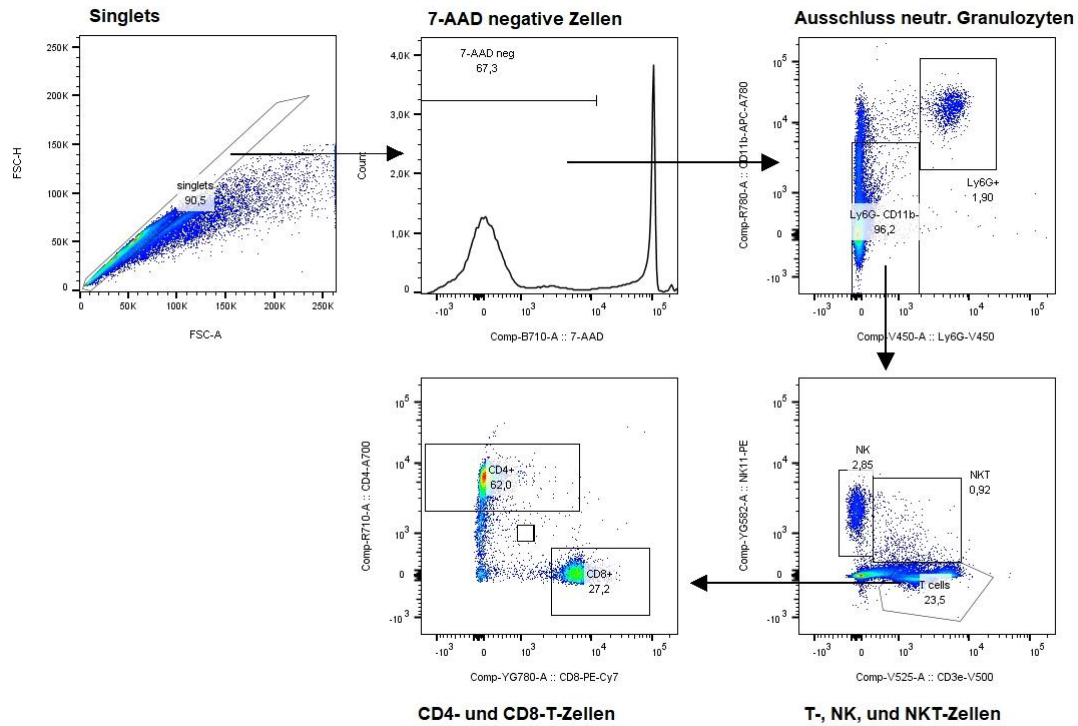


Abbildung 25: Gatingstrategie zur Analyse der NK- und T-Zellpopulationen in der Milz

Für die Quantifizierung von NK-Zellpopulationen in der Milz wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Dafür wurden die isolierten Zellen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD8, CD4, CD3e, Ly6G, CD11b und NK1.1 gefärbt. Lebende Zellen wurden mittels 7-AAD selektiert. Dargestellt ist die Gatingstrategie.

8.5 Ergänzende Daten

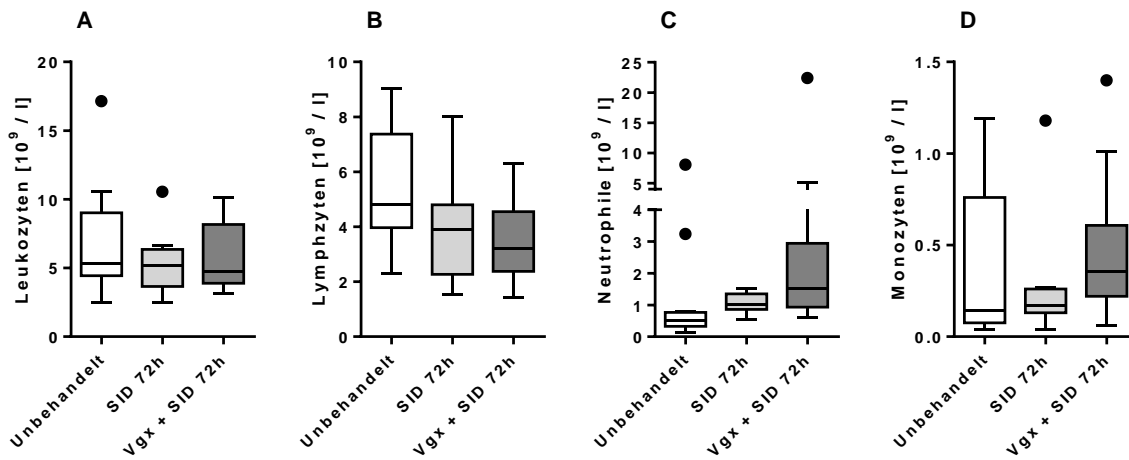


Abbildung 26: Absolute Zellzahl der Leukozytenpopulationen im Blut 72 h nach SID

Von C57BL/6N-Mäusen wurde 72 h nach der SID-Operation ein Blutbild erstellt (n=11). In einer weiteren Gruppe wurde 6 Tage vor SID eine Vagotomie durchgeführt (n=12). Als Kontrollen dienten unbehandelte Tiere (n=13, gepoolt aus 6 Einzelversuchen). Abgebildet sind die Leukozyten (A), Lymphozyten (B), neutrophilen Granulozyten (C) und Monozyten (D). Dargestellt ist die Anzahl in $10^9 / l$ in Form von *Box Plots* nach *Tukey*. Gruppenunterschiede wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und *Dunn's post test for selected pairs* auf Signifikanz geprüft.

9 Danksagung

Diese Arbeit und ihr Abschluss wären nicht ohne die Hilfe vieler Menschen möglich gewesen. Ihnen gilt mein großer Dank.

Besonders und zu allererst möchte ich Frau PD Dr. med. Pia Menges für die Bereitstellung des Themas, die jahrelange hervorragende Betreuung sowie außerordentliche Geduld beim letzten Schliff danken.

Frau Christine Hackbarth, Antje Janetzko und Julia Klauke danke ich für die äußerst engagierte Einarbeitung im chirurgischen Forschungslabor, die immer hilfreichen Hände, egal ob in grauer Morgenstunde oder dunkler Nacht, die zahllosen Stunden im Tierstall sowie die rundherum angenehme gemeinsame Zeit, die diese Jahre so erinnerungswürdig hat werden lassen.

Hervorgehoben gehört auch die Abteilung der Immunologie der Universität Greifswald unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. Barbara Bröker für die Möglichkeit der Benutzung der Laborräume, sowie Gerätschaften und Teilnahme am wissenschaftlichen Austausch. Insbesondere möchte ich Frau Dr. Katrin Schmoeckel für die fachliche Begleitung, die angeregten Diskussionen und Einarbeitung am FACS danken. Frau Susanne Neumeister danke ich für die freundliche Aufnahme im FACS-Labor und Unterstützung bei allen Schwierigkeiten.

Dem Gerhard-Domagk-Nachwuchsförderprogramm danke ich für die Möglichkeit mich 18 Monate ausschließlich der Forschung zu widmen, sowie für die zahlreichen herausragenden Seminare und Fortbildungen, deren Inhalt ich bis heute zu schätzen weiß.

Vielen Dank auch meiner Doktorandenkollegin und guten Freundin Annabel Kleinwort für die vielen Stunden in unserem „Kabuff“ und das gemeinsame Bestehen aller curricularen und extra-curricularen Herausforderungen. Mit ihrer Freundschaft, fachlichen Verlässlichkeit und gesunden Konkurrenz hat sie wesentlich den Weg dieser Arbeit geprägt und zu ihrer Fertigstellung beigetragen.

Nicht zuletzt gebührt auch meinen Eltern und meiner Frau Dank für die jahrelange Unterstützung und Geduld, ohne die ich heute nicht hier stehen würde.