

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie,  
Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. S. Kersting)  
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald



# Modulation der Immunantwort durch Vagotomie im Mausmodell der postoperativen Immundysfunktion

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

der Universitätsmedizin  
der  
Universität Greifswald  
2023

vorgelegt von  
Johannes Czerny  
geboren am 21. Januar 1993  
in Berlin-Mitte

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich  
1. Gutachterin: PD Dr. med. Pia Menges  
2. Gutachterin: Prof. Dr. med. Brigitte Gansera

Ort, Raum: Universitätsmedizin Greifswald, Hauptgebäude, Seminarraum J04.33/34  
Tag der Disputation: 19.04.2024

*Man merkt nie, was schon getan wurde,  
man sieht immer nur, was noch getan werden muss.*

Marie Curie (1867 – 1934)

Die vorliegende Arbeit wurde durch das Gerhard-Domagk-Promotionsstipendium sowie durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) unter der Projektnummer ME 4164/2-1 (Antragsstellerin: Frau PD Dr. med. Pia Menges) und dem Titel „*Analyse des Einflusses des Nervus vagus auf die postoperative Immunsuppression*“ finanziell unterstützt.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
1.1	Operatives Trauma .....	5
1.2	Postoperative Immunsuppression.....	5
1.2.1	Modell der „surgically-induced immune dysfunction“ (SID) .....	6
1.3	Cholinerg antiinflammatorischer Signalweg (CAP) .....	7
1.3.1	Signalkaskade auf zellulärer Ebene .....	7
1.3.2	Signalkaskade auf molekularer Ebene .....	8
1.4	N. vagus und Vagotomie.....	8
1.5	Lokale Faktoren .....	10
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>12</b>
3.1	Materialienliste .....	12
3.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	12
3.1.2	Laborgeräte .....	12
3.1.3	Lösungen .....	13
3.1.4	Reagenzien und Chemikalien.....	14
3.1.5	Kits .....	14
3.1.6	Software.....	15
3.1.7	Tiere und Tierhaltung .....	15
3.2	Methoden .....	16
3.2.1	Zeitlicher Ablauf und Versuchsgruppen .....	16
3.2.2	Tierexperimentelle Methoden .....	16
3.2.2.1	Genehmigung .....	16
3.2.2.2	Tierzucht und Haltung .....	16
3.2.2.3	Narkose .....	18
3.2.2.4	Vagotomie (VGX, nach Kessler et al.) .....	18
3.2.2.5	Surgically-induced immune dysfunction (SID; nach Koerner et al.) .....	19
3.2.2.6	Euthanasie und Organentnahme.....	20
3.2.3	Zellbiologische Methoden.....	20
3.2.3.1	Splenozytenisolation.....	20
3.2.3.2	Zellzählung.....	21
3.2.3.3	LPS-Stimulation .....	21
3.2.3.4	Weiterverarbeitung der Serum- und Plasmaproben.....	22

3.2.3.5	Cotinine-ELISA .....	22
3.2.3.6	Cytometric Bead Array (CBA).....	23
3.2.3.7	Analyse des Blutbildes.....	24
3.2.3.8	Durchflusszytometrische Untersuchungen.....	25
3.2.4	<i>Statistische Auswertung</i> .....	27
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>28</b>
4.1	Vorbemerkungen .....	28
4.2	Veränderungen der Serumzytokine nach SID .....	28
4.3	Basale Zytokinsekretion von isolierten Splenozyten.....	32
4.4	Zytokinsekretion von isolierten Splenozyten nach Stimulation mit LPS .....	36
4.5	Veränderungen der Zellpopulationen nach SID .....	41
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>48</b>
5.1	Das Immunsystem in der Früh- und Spätphase nach operativem Trauma.....	48
5.2	Vagotomie beeinflusst in der Frühphase der Immunantwort nach operativem Trauma sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem .....	51
5.3	Vagotomie verstärkt die Immunsuppression in der Spätphase der Immunantwort nach operativem Trauma.....	52
5.4	Gesamtkontext und modellhafter Verlauf des Immunstatus.....	54
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>9</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>10</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....	<b>XV</b>
<b>12</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>XVI</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>XVII</b>

## Abkürzungverzeichnis

A.	lat. arteria
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
APC	Allophycocyanin
CARS	engl. Compensatory anti-inflammatory response syndrome
CBA	engl. Cytometric Bead Array
CD	engl. cluster of differentiation
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
CLP	engl. Cecal ligation and puncture
DAMP	engl. Danger associated molecular pattern
DC	engl. Dendritic cell
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay
FACS®	engl. fluorescence-activated cell sorting
Fc	engl. Fragment chrystallisable
FCS	engl. fetal calf serum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	engl gravity entsprechend $1g = 9,81m/s^2$
gMFI	engl. geometric mean fluorescence intensity
HMGB1	engl. high mobility group box 1 protein
HRP	engl. horseradish peroxidase
i.d.R.	in der Regel
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMM	intestinales Manipulationsmodell
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
LPS	Lipopolysaccharid

Ly6C	engl. Lymphocyte antigen 6 complex, locus C
Ly6G	engl. Lymphocyte antigen 6 complex, locus G
M.	lat. musculus
MHC II	engl. Major histocompatibility complex II
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid
N.	lat. nervus
NaCl	Natriumchlorid
NK	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte
PAMP	engl. pathogen associated molecular pattern
PBS	engl. phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP/ Cy5.5	Peridin-Chlorophyll/ Cyanin5.5
s	siehe
SID	engl. surgically-induced immune dysfunction
SIRS	engl. Systemic inflammatory response syndrome
Syx	engl. standard error of the estimate
Tab.	Tabelle
TLR	engl. Toll like Receptor
TMB	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
VGX	Vagotomie
VNS	Vagus-Nerv-Stimulation
z.B.	zum Beispiel



# 1 Einleitung

## 1.1 Operatives Trauma

Im Jahr 2016 wurden in Deutschland 16 755 574 Operationen durchgeführt, davon ca. 2,5 Mio. am Verdauungstrakt [1]. Dabei weisen europaweit die Operationen am oberen Gastrointestinaltrakt die höchste Mortalität auf (6,9 %), gefolgt von Operationen am Gefäßsystem und den Operationen am unteren Gastrointestinaltrakt [2]. Die häufigsten Komplikationen bei abdominalchirurgischen Operationen (Daten zu Colektomien) sind in absteigender Häufigkeit Pneumonie (5,9 %), fehlgeschlagene Beatmungsentwöhnung (5,8 %), Harnwegsinfektionen (4,8 %), oberflächliche Wundinfektionen (4,7 %) und an fünfter Stelle Sepsis mit 3,6 %, wobei diese Daten nur in einem 7-Tage-Intervall nach Operationen erhoben wurden [3]. Ein weiteres Krankheitsbild, welches im Zusammenhang mit Operationen auftritt, ist der postoperative Ileus [4]. Dieser wird aufgrund seiner Häufigkeit von bis zu 40 % von vielen Autoren nicht zu OP-Komplikationen gezählt, sondern als normaler OP-Verlauf angesehen [5–7]. Dabei ist die Mortalität von Patienten, die einen Ileus entwickeln, bis zu viermal höher im Vergleich zu Patienten, die keinen Ileus entwickeln [8]. Diese Komplikationen gehen zudem mit einer verringerten weiteren Lebenserwartung einher, so führt z. B. Sepsis zu einer Reduktion der weiteren Lebenszeit um 42 % [3]. Zudem stellt dies auch ein bedeutendes volkswirtschaftliches Problem dar; bei etwa 79 000 Fällen pro Jahr in Deutschland verursacht allein die Sepsis als mögliche Komplikation nach operativem Trauma Kosten von 4,7 Mrd. Euro (durchschnittliche Kosten pro Patient von 59 118 €) [9][10].

## 1.2 Postoperative Immunsuppression

Anders als die Sepsis, wo es aufgrund von Reaktionen des Organismus auf Bakterien zu Organdysfunktionen kommt, spielt sich die postoperative Immunsuppression in der Theorie aseptisch ab. Vielmehr handelt es sich um eine Reaktion des Organismus, die im Wesentlichen auf dem durch eine Operation verursachtem Trauma beruht. Dass das Immunsystem nach Operationen geschwächt ist, ist bereits für viele Operationen z.B. am Herzen beobachtet worden [11]. Auch für große abdominalchirurgische Eingriffe konnte dies bereits am Menschen gezeigt werden [12].

Die Immunsuppression lässt sich nicht an einem oder einigen wenigen Parametern fest machen, viel mehr ist sie ein mehrdimensionales Krankheitsbild. Ein Mechanismus der Immunsuppression ist dabei die Aktivierung der Hypothalamus- Hypophysen- Nebennieren-Achse [13]. So führt ein chirurgisches Trauma zu einer Freisetzung von ACTH aus der Hypophyse und nachfolgend zu einer Ausschüttung von Cortisol aus der Nebennierenrinde, welches die zell-vermittelte Immunität unterdrückt [14]. Dies geschieht unter anderem über eine verringerte Ausschüttung von IL-2 als wichtigstem T-Zell-Wachstumsfaktor, welcher autokrin von T-Zellen selber freigesetzt wird [15]. Zudem wird die Apoptose von T-Zellen eingeleitet [16]. Insgesamt werden Lymphozyten Glucocorticoid-abhängig von der Milz und den zentralen Blutgefäßen in periphere Kompartimente umverteilt [17]. Glucocorticoide führen zudem zu einer verringerten Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine aus Leukozyten wie z. B. IL-1, IL-2, IL-6 und TNF- $\alpha$  [18]. Umgekehrt konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Zytokine wie TNF- $\alpha$  die Glucocorticoid-Spiegel modulieren können [19]. Sepsis und Immunsuppression haben durchaus gemeinsame Grundzüge, so konnten ähnliche zeitliche bekannte Phänomene wie SIRS und CARS ebenfalls in Traumamodellen beobachtet werden [20,21]. Trotzdem unterscheiden sich Sepsis und postoperative (nicht-septische) Immunsuppression grundlegend voneinander, bei der Sepsis entsteht ein wahrer Zytokinsturm, was bei der Immunsuppression nicht der Fall ist. Außerdem prädisponiert die Immunsuppression die Entwicklung einer Sepsis [22].

### 1.2.1 Modell der „surgically-induced immune dysfunction“ (SID)

Bislang wurden tierexperimentelle Daten zur postoperativen Immunsuppression meist mithilfe von Verbrennungsmodellen erhoben [23]. Die wenigen abdominalchirurgischen Modelle beschränkten sich meist nur auf einfache Laparotomien [24]. Selbst heute wird oft auf Laparotomien als chirurgisches Traumamodell zurückgegriffen, obwohl dies dem realen Operationsablauf einer großen viszeralchirurgischen Operation nicht wirklich nahe kommt [25]. Aus diesem Grund wurde in unserer Arbeitsgruppe 2012 das Modell der *surgically-induced immune dysfunction* (SID) entworfen und erfolgreich etabliert [26–29]. Eine genaue Beschreibung der einzelnen Operationsschritte findet sich in Kapitel 3.2.2.5 auf Seite 19. Das Modell beruht dabei auf dem *intestinalen Manipulationsmodell* (IMM), welches aber im Unterschied zur SID nur aus einer einzigen Ausstreichung des Darms besteht und ursprünglich als Ileus-Modell entworfen wurde [30]. Bisherige Untersuchungen zum SID-Modell zeigten 6 Stunden postoperativ signifikant erhöhte IL-6-Serumlevel im Vergleich zu einfachen

Laparotomien sowie stark erhöhte HMGB1-Serumkonzentration und kamen damit den Serumkonzentrationen, wie sie in Untersuchungen am Menschen nach kolorektalen Eingriffen nachgewiesen werden, sehr nahe, sodass dieses Trauma-Modell als geeignet erscheint, die postoperative Immunsuppression mindestens auf Ebene der Zytokine nachzustellen [26,31].

### 1.3 Cholinerger antiinflammatorischer Signalweg (CAP)

Das Immunsystem galt früher als autonomes System, welches relativ unabhängig von anderen Organsystemen agiert. Dass dem nicht so ist, wurde 1997 zum ersten Mal postuliert, als die Verbindung von zentralem Nervensystem und Immunsystem als neues „Supersystem“ bezeichnet wurde [32]. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor vom Subtyp alpha7 (nAChR7) findet sich auf sehr vielen verschiedenen Zellen, insbesondere auch auf fast allen Immunzellen [33]. Im Jahr 2000 wurde zum ersten Mal entdeckt, dass Acetylcholin und andere Agonisten wie Nikotin und Muskarin einen Einfluss auf die Freisetzung von wichtigen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-6 oder IL-1 $\beta$  haben; der Rezeptor, welcher dies vermittelt, blieb aber unklar [34]. Erst später wurde herausgefunden, dass der alpha7-Rezeptor den größten Einfluss auf den cholinergen antiinflammatorischen Signalweg besitzt und dieser bei Stimulation für verringerte Zytokinspiegel verantwortlich ist [35]. Weitere Veröffentlichungen mit sowohl unspezifischen Agonisten wie Nikotin oder GTS-21 bestätigten die wichtige Rolle des Rezeptors für diesen zentralen Signalweg [36,37]. Im Tiermodell mit durchgeführter CLP (*cecal ligation puncture*) konnte gezeigt werden, dass die spezifische Stimulation des Rezeptors zu einem verbesserten Überleben in der Sepsis führt [37]. Dass die gezielte (elektrische) Stimulation des N. vagus zu erniedrigten Zytokinspiegeln und verbessertem Outcome nach Ischämie-Reperfusion oder hämorrhagischem Schock führt, konnte ebenfalls bereits nachgewiesen werden [38,39]. Stimulation durch weitere pharmakologische Stoffe zeigten verbessertes Überleben nach Pankreatitis [40].

#### 1.3.1 Signalkaskade auf zellulärer Ebene

Wo und wie die Umschaltung der Efferenzen des N. vagus auf die Effektorzellen des Immunsystems stattfindet, blieb lange unklar. Es wurde eine direkte Umschaltung von vagalen Fasern auf Makrophagen als Hauptproduzent von TNF- $\alpha$  angenommen [41,42]. Die Milz als größtes lymphatisches Organ lag als Umschaltzentrale nahe. So konnte 2006 in Experimenten mit Splenektomien gezeigt werden, dass der CAP damit inaktiviert wurde [43]. Allerdings ist mit dieser doch sehr großen Operation zweifelsfrei ein großer Eingriff in das Immunsystem

verbunden gewesen, sodass erst 2008 mit Versuchen durch selektive Denervierung der Milz gezeigt werden konnte, dass die Umschaltung zwischen N. vagus und Immunsystem vermutlich auf Ebene der Milz stattfindet [44]. Dies war insofern eine bemerkenswerte Arbeit, da zuvor angenommen wurde, dass vagale Efferenzen in Höhe der Ganglienzellen des mesenterialen Plexus enden und nicht die Milz direkt innervieren [45,46]. Die Milz wird stattdessen über katecholaminerge Fasern innerviert, welche ihren Ursprung im Tractus intermediolateralis der thorakalen Wirbelsäule haben, also dem sympathischen Nervensystem zuzurechnen sind [47–49]. Vagale Efferenzen führen über Acetylcholin-Freisetzung in mesenterialen Ganglien zu einer Aktivierung von noradrenergen sympathischen Fasern und so zu einer direkten Erhöhung des sympathischen Botenstoffs Noradrenalin in der Milz [50]. Dort werden Cholin-Acetyltransferase (ChAT)-positive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen  $\beta_2$ -Rezeptor-abhängig zur Bildung von Acetylcholin angeregt [51].

### 1.3.2 Signalkaskade auf molekularer Ebene

Die Aktivierung des  $\alpha_7$ -Rezeptors führt zu einem Einstrom von Calcium in die Zelle mit darauffolgender Inhibition der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und zu einer Aktivierung des JAK2/STAT3-Signalweges [37,52]. Außerdem wird die Aktivierung des Inflammasoms unterbunden [53]. So wird insgesamt die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine in Rote-Pulpa- und Marginalzonen-Makrophagen eingeschränkt, die die Hauptproduzenten (> 90 %) dieser sind [43,44].

## 1.4 N. vagus und Vagotomie

Um den cholinergen anti-inflammatorischen Signalweg besser zu studieren, wird neben pharmakologischer Aktivierung oder Hemmung häufig auch auf chirurgische Interventionen bzw. elektrische Stimulation zurückgegriffen. Die subdiaphragmale Vagotomie ist dafür gut geeignet, da hier sowohl in den afferenten als auch den efferenten Schenkel des Signalweges eingegriffen wird, und so außerdem nur der vagale Einfluss auf die Bauchorgane unterbunden wird, was mit pharmakologischen Interventionen nicht zu erreichen wäre. Zur Aktivierung des Signalweges bietet sich die pharmakologische Stimulation sowohl mit unspezifischen Agonisten wie Nikotin als auch mit spezifischen Agonisten wie GTS-21 (*3-(2,4-dimethoxybenzylidene)-anabaseine*) an. Der Vorteil der Applikation von Nikotin sind die Applizierbarkeit über das Trinkwasser und somit ein geringerer Stress für die Maus.

Für die alleinige Vagotomie konnte beobachtet werden, dass dies keinen Einfluss auf das Überleben hat, erst bei Entwicklung einer Sepsis konnte ein schlechteres Überleben der Mäuse gezeigt werden [54]. Die vagotomierten Mäuse entwickeln regelmäßig eine Pylorusstenose durch die verbliebene sympathische Innervierung des Pylorussphinkters, der Stress für die Mäuse gemessen an Corticosteron-Spiegeln nimmt dabei aber nicht zu [54]. Dies macht die Vagotomie zu einem guten Interventionsinstrument, um den Einfluss des cholinergen antiinflammatorischen Signalweges genauer zu studieren. Es konnte bereits beobachtet werden, dass die vagale Inhibition der Immunantwort einige Zeit braucht, d.h. also nicht sofort stattfindet (wie bei einer neural vermittelten Antwort zu erwarten wäre), vielmehr konnte sie in einer tierexperimentellen Untersuchung erst nach neun Stunden beobachtet werden, noch nicht aber nach drei Stunden [55].

Für den alpha7-Rezeptor konnte bislang gezeigt werden, dass bei gezielter Stimulation mit GTS-21 die Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche in Zellen aus Peritoneallavage zunimmt [56]. In vitro konnte auch die Hochregulierung des alpha7-Rezeptors auf Makrophagen nach LPS-Gabe beobachtet werden [56,57]. Auch wenn die Wirkung von Agonisten häufig nur auf die Stimulation von Makrophagen der Milz bezogen wird, so führt dies in weiteren Geweben zu verschiedenen Wirkungen: So bewirkt die Aktivierung des Rezeptors einen verminderten Einstrom von Neutrophilen und anderen Immunzellen in die Nieren oder die Lunge [58,59]. Interessanterweise gibt es bisher kontroverse Daten dazu, inwiefern der alpha7-Rezeptor auf Immunzellen der Milz überhaupt vorkommt respektive exprimiert wird: So konnte mRNA des CHRNA7 und Proteine von alpha7 mittels Western Blots für die noradrenergen Fasern, die entlang der Blutgefäße in die weiße Pulpa ziehen, nachgewiesen werden, aber ausdrücklich nicht auf den Splenozyten selber [60]. In anderen Untersuchungen wurden Splenozyten von Wildtyp-Mäusen und alpha7-Knockout-Mäusen transplantiert und durch Ausbleiben der Schutzfunktion in den Knockout-Mäusen auf das Vorhandensein des alpha7-Rezeptors in Immunzellen der Milz rückgeschlossen [61].

Obwohl der N. vagus zu ca. 80 % aus afferenten und nur zu ca. 20 % aus efferenten Fasern besteht, wird häufig nur über den efferenten Schenkel des CAP gesprochen, doch auch der afferente Schenkel hat eine überaus wichtige Funktion für den cholinergen antiinflammatorischen Signalweg [62]. Im Gehirn und auf Nervenzellen selber konnten Rezeptoren für verschiedene Zytokine wie z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 nachgewiesen werden [63–65]. So konnte jüngst gezeigt werden, dass diese Zytokine selber die Fortleitung elektrischer Signale im Nervus vagus beeinflussen können und somit den Signalweg als eine Art Autoregulation

modulieren können [66]. Zytokin-produzierende Immunzellen reagieren auf PAMPs von Bakterien oder DAMPs aus verletztem Gewebe (Trauma) [67] und setzen IL-1 $\beta$  und Prostaglandine frei und sitzen in räumlicher Nähe zu den Fasern des N. vagus, in Lymphknoten oder in der Darmwand [68–70]. Afferente Signale des N. vagus erreichen das zentrale Nervensystem und sind über verschiedene noch unbekannte Wege mit den viszeromotorischen Kernen verbunden und projizieren zusätzlich in den Hypothalamus, wo sie die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse beeinflussen [68,71]. Dass der afferente Schenkel generell eine hohe klinische Bedeutung hat, zeigt die seit 1994 in der Europäischen Union und 1997 durch die FDA in den Vereinigten Staaten von Amerika zugelassene Vagusnervstimulation (VNS) zur Behandlung der pharmakoresistenten Epilepsie [72,73]. Interessanterweise hat die Vagusnervstimulation bereits in klinischen Studien mit kleinen Patientenkollektiven einen positiven Einfluss auf chronisch entzündliche Erkrankungen wie Morbus Crohn gezeigt [74]. Dies alles unterstreicht die wichtigen und vielfältigen Funktionen, die der N. vagus insbesondere im Zusammenhang mit dem Immunsystem hat.

### 1.5 Lokale Faktoren

Neben dem bisher erwähnten cholinergen-antiinflammatorischen Signalweg mit dem N. vagus als Hauptmediator spielen auch lokale Faktoren eine wichtige Rolle, welche hier aber nur kurz wiedergegeben werden sollen, da sie nicht das Hauptaugenmerk der Untersuchungen waren. Ein chirurgisches Trauma führt zu einer Aktivierung von CD11b<sup>+</sup>/CD103<sup>+</sup>-Dendritischen Zellen über DAMPs, welche nach Gewebsverletzung freigesetzt werden [75,76]. Das wichtigste und bekannteste DAMP ist das HMGB1, welches über die Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 (TLR) den Dendritischen Zellen präsentiert wird [77–80]. Die Dendritischen Zellen reagieren darauf überwiegend mit der Produktion von IL-12, können aber auch endogen durch weitere Freisetzung von HMGB1 diesen Mechanismus verstärken [81,82]. IL-12 führt seinerseits zu einer Aktivierung von T<sub>h</sub>1-Zellen, welchen den Transkriptionsfaktor T-bet exprimieren [83]. T<sub>h</sub>2 und T<sub>h</sub>17-Zellen spielen in der *lokalen und akuten* Pathogenese des Ileus und der Immunsuppression eine untergeordnete Rolle, allein weil z. B. T<sub>h</sub>17-Zellen ca. eine Woche Zeit benötigen um sich nach Aktivierung zu differenzieren [81,84]. T<sub>h</sub>1-Zellen schütten IFN- $\gamma$  aus, welches wiederum in Makrophagen in der Muskularis die iNOS exprimiert [81,85,86]. Durch die iNOS wird NO synthetisiert und Darmmyozyten „lahmgelegt“, was entscheidenden Einfluss auf die Darmmotilität hat und somit die Entstehung eines Ileus begünstigt [87].

## 2 Fragestellung der Arbeit

Die postoperative Immunsuppression mit ihren möglichen schwerwiegenden Komplikationen wie z.B. der Sepsis ist sowohl in medizinischer als auch in ökonomischer Hinsicht ein weit verbreitetes Problem. Eine wichtige Rolle spielt dabei der Nervus vagus als wichtige Verbindung zwischen autonomen Nervensystem und Immunsystem. Dabei stellt insbesondere der cholinerge antiinflammatorische Signalweg neben den lokalen Faktoren ein entscheidendes Puzzleteil in der Pathogenese der postoperativen Immunsuppression dar. Trotz der herausragenden Bedeutung des Problems sind viele grundlegende Dinge auch auf zellulärer Ebene noch nicht hinreichend verstanden.

Um dies genauer zu untersuchen, steht in unserer Arbeitsgruppe mit der *surgically-induced immune dysfunction* (SID) einerseits ein geeignetes Traumamodell zur Verfügung und andererseits mit der chirurgischen subdiaphragmalen Vagotomie ein etabliertes Modell zur Untersuchung des Nervus vagus.

Folgende Fragen sollen in Ergänzung zu vorherigen Projekten der Arbeitsgruppe mithilfe des Versuchsprogramms beantwortet werden:

- (1) Welchen Einfluss hat der N. vagus auf die Serumzytokine nach operativem Trauma?
- (2) Wie verändert sich unter Vagotomie die Zellzusammensetzung in der Milz nach operativem Trauma?
- (3) Welche Wirkung hat der N. vagus auf die ex-vivo-Stimulierbarkeit mittels LPS in isolierten Milzzellen im operativen Immunsuppressionsmodell?
- (4) Wie verändern sich bestimmte Oberflächenmarker z.B. MHCII auf B-Zellen oder Makrophagen? Wie wird also das adaptive Immunsystem durch den N. vagus nach Trauma modelliert?
- (5) Welchen Einfluss hat der unspezifische Agonist Nikotin auf die Immunantwort und kann die Wirkung der Vagotomie eventuell sogar rückgängig gemacht werden?

In dieser Arbeit versuchen wir zunächst Effekte v.a. auf zellulärer und humoraler Ebene ausfindig zu machen, um einen wichtigen Beitrag für die Grundlagenforschung zu leisten. Wir erhoffen uns somit neue Ansätze zur Therapie oder Prophylaxe dieses klinisch so schwerwiegenden Problems.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialienliste

#### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Polyester Faden, 4-0 USP, 45 cm, nicht-resorbierbar, weiß, geflochten, unbeschichtet, 3/8-kreisförmig, schneidende Nadel, Bogenlänge 16 mm, steril (Ref.: 17218113)	Catgut GmbH, Markneukirchen
Vicryl® Polyglactin 910 Faden 5-0 USP, 45 cm, resorbierbar, ungefärbt, geflochten, 3/8-kreisförmig, schneidende Nadel, 11 mm Bogenlänge, steril (Ref.: V490H)	Johnson & Johnson Medical NV, Diegem, Belgien
Leukoplast®	BSN medical GmbH, Hamburg
Mullkompressen, 5x5 cm	Fuhrmann GmbH, Much
Injekt-F Tuberkulin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Microlance 3, 20G x 1,5 " Nr. 1	Becton Dickinson S.A., Fraga
Wattestäbchen, steril	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg
1 mL Spritze Plastipak™ Sub-Q, 0,5 mm (26G) x 12,7 mm	BD Medical - Diabetes Care, Holdrege, USA
Petrischalen klein, Falcon	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes
Petrischalen groß	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes
Spritze 5 mL Injekt® steril	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Falcon® Cell Strainer 70 µm, Nylon, steril	Corning Inc., Corning, USA
Röhre 15 mL, 120x17 mm, PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäß Falcon® 50 mL, konisch, PP	Corning Science México S.A. de C.V., Reynosa, Mexiko
Reaktionsgefäß Rotilabo® schwarz, 1,5 mL, PP	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eppendorf Tubes® amber, 5.0 mL, PP	Eppendorf AG, Hamburg
1 mL Spritze Luer-Lok™	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
FACS-Röhrchen 5 mL Falcon Polystyrene U-Bottom Tube 12 x 75 mm	Corning Science México S.A. de C.V., Reynosa, Mexiko
Pipettenspitze epT.I.P.S.® 0,1-10 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitze epT.I.P.S.® 2-200 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitze epT.I.P.S.® 50-1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitze epT.I.P.S.® 0,5-10 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Blutentnahme Kapillare End-to-End Kapillare 20 µL K2E	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

#### 3.1.2 Laborgeräte

Pinzette	ASANUS Medizintechnik GmbH, Neuhausen ob Eck
----------	--



Schere	ASANUS Medizintechnik GmbH, Neuhausen ob Eck
Nadelhalter, Aesculap	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Mikroskop M651	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Ultraschallbad Sonorex	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Wärmeplatte ThermoLux	Witte + Sutor GmbH, Murrhardt
Leber-und Wundhaken inkl. Zubehör	Braintree Scientific Inc., Braintree, USA
Kaltlichtquelle KL1500	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
VetScan, HM5	Abaxis Inc., Union City, USA
Durchflusszytometer, BD LSR II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Microzentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Mikroplatten-Reader, Infinite 200 PRO Series	TECAN Trading AG, Männedorf, Schweiz
Reagenzschüttler, Vortex VF2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau
96-well-Platte, steril, U-Boden, klar (Ref.: 650161)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Einbettchälchen Cryomold® 15x15x5 mm	Sakura Finetek USA Inc., Torrance, USA
Einbettmedium Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Infrarot-Wärmestrahler 250 W	Albert Kerbl GmbH, Felizenzell
Microplatten-Reader, TECAN Infinite 200 PRO	TECAN Group AG, Männedorf, Schweiz

### 3.1.3 Lösungen

Narkose	0,5 ml 2% Xylazin 1 ml 10% Ketamin 8,5 ml 0,9% NaCl
FACS-Puffer	500 mL PBS 10 mL FCS 2 nM EDTA
Medium für Splenozytenstimulation	500 mL RPMI 1640 + GlutaMAX 50 mL FCS 10% 5 mL Pen/Strep 500 µL 2-Mercaptoethanol 55mM
Zombie-Mix	10 µL Zombie-NIR + 9990 µL PBS

### 3.1.4 Reagenzien und Chemikalien

Xylasel® (Wirkstoff: Xylazin) 20 mg/mL	Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn/Holzolling
Ketamin 100 mg/mL	Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn/Holzolling
Isotone Natriumchlorid-Lösung 0,9 %	Berlin-Chemie AG, Berlin
Tramadol Tramal® 100 mg/mL (1 Hub = 12,5 mg)	Grünenthal GmbH, Aachen
Fetales bovines (calf) Serum ( <b>FCS</b> ) 10 %	Biochrom GmbH, Berlin
Ethylendiamintetraessigsäure ( <b>EDTA</b> ) 0,2 mol/L (0,2 N)	neolab Migge GmbH, Heidelberg
Red Blood Cell (RBC) Lysis Buffer	BioLegend Inc., San Diego, USA
Phosphate buffered saline ( <b>PBS</b> )	Gibco by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
RPMI 1640 (1X) + GlutaMAX	Gibco® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
<b>Pen/Strep</b> (10.000 U/mL Penicillin; 10.000 µg/mL Streptomycin)	Gibco® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
2-Mercaptoethanol 55mM	Gibco® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Lipopolysaccharid ( <b>LPS</b> ) for Salmonella enterica serotype abortus equi	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
(-)-Nikotin ≥99,0% (Ref.: 72290)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
TruCount Tubes (Ref.: 340334)	Becton, Dickinson and Company, San Jose, USA

### 3.1.5 Kits

Cotinine ELISA (SE120039)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
HMGB1 ELISA (ST51011)	IBL International GmbH, Hamburg
Cytometric Bead Array (CBA) Flex Set	BD Biosciences, San Jose, USA
CBA Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit (558267)	BD Biosciences, San Jose, USA
CBA Mouse IL-2 Flex Set (Ref: 558297, Lot: 6005701)	BD Biosciences, San Jose, USA
CBA Mouse IL-1β Flex Set (Ref: 560232, Lot: 5194674)	BD Biosciences, San Jose, USA
CBA Mouse IL-17A Flex Set (Ref: 560283, Lot: 5204614)	BD Biosciences, San Jose, USA
CBA Mouse IL-12p70 Flex Set (Ref: 558303, Lot: 5208991)	BD Biosciences, San Jose, USA
CBA Mouse IL-10 Flex Set (Ref: 558300, Lot: 5100570)	BD Biosciences, San Jose, USA
CBA Mouse TNF-α Flex Set (Ref: 558299, Lot: 4294816-1)	BD Biosciences, San Jose, USA
CBA Mouse IFN-γ Flex Set (Ref: 558296, Lot: 5107690)	BD Biosciences, San Jose, USA

CBA Mouse IL-6 Flex Set (Ref: 558301, Lot: 5194668)	BD Biosciences, San Jose, USA
Anti-rat/Anti-hamster Ig $\times$ Compensation Beads/ Negative Control (Ref.: 552845)	BD Biosciences, San Jose, USA
Anti-mouse Ig $\times$ Compensation Beads/ Negative Control (Ref.: 552843)	BD Biosciences, San Jose, USA
Zombie-NIR Fixable Viability Kit (Ref.: 423105)	BioLegend Inc., San Diego, USA

### 3.1.6 Software

FlowJo X v10.0.7r2 für Windows	FlowJo LLC, Ashland, USA
GraphPad Prism v6.0c für Mac	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
BD FACSDiva v8.0.1 für Windows	BD Biosciences, San Jose, USA
FCAP Array v3.0.1 für Windows	Softflow Hungary Ltd., Pécs, Ungarn
Tecan i-control v1.10.4.0 für Windows	TECAN Trading AG, Männedorf, Schweiz
Microsoft® Excel v16.13.1 für Mac	Microsoft Corporation, Redmont, USA

### 3.1.7 Tiere und Tierhaltung

C57Bl/6N ♀ Mäuse	Charles River Germany GmbH & Co. KG, Sulzfeld
Makrolonkäfig Typ II L, Bodenfläche 530cm <sup>2</sup> , BxHxT 207x140x365mm	EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co. KG, Emmendingen
Edelstahldeckel Typ II L mit Fallbügelverschluß und Gitterabstand 7mm	EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co. KG, Emmendingen
Trennblöcke aus Edelstahl TB 2 -BS	EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co. KG, Emmendingen
Tränkflaschen FK-90 Ø84mm x 220mm mit Tränkkappe TK-40	EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co. KG, Emmendingen
Einstreu LIGNOCEL® Naturholzfaserstoff	J. RETTENMAIER + SÖHNE GmbH + Co KG, Rosenberg
Tierfutter ssniff® Maus-Zucht Extrudat (Ref.: 1126)	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zeitlicher Ablauf und Versuchsgruppen

An Tag 0 wurde zunächst die Vagotomie (s.S. 18) bzw. Sham-Vagotomie durchgeführt. Wie bereits bei uns etabliert [28], folgte an Tag 6 die *surgically-induced immune dysfunction* (s.S. 19), wohingegen in einigen früheren Projekten unserer Forschungsgruppe dies auch simultan durchgeführt wurde (d.h. Vagotomie und SID-OP an einem Tag) [27]. Es sollte nun dem Organismus genug Zeit gegeben werden, sich an die Vagotomie zu adaptieren. Nach weiteren sechs bzw. 72 Stunden erfolgte die Euthanasie und Organentnahme.

Es wurden im 2x2-Design die Gruppen *Sham-Vagotomie* und *Vagotomie* mit den Gruppen *Nikotin* und *kein Nikotin* kombiniert. Diese vier Gruppen erhielten alle die SID-OP. Zusätzlich wurde zur Kontrolle eine Gruppe gebildet, die keinerlei Operationen erhielt und eine Gruppe, die ohne die Operationen noch Nikotin über das Trinkwasser (10 µg/ml Trinkwasser) erhielt, die Nikotinkonzentration orientierte sich hierbei an vergleichbaren Studien [88]. Somit ergeben sich sechs Versuchsgruppen mit jeweils zwei Zeitpunkten (6 und 72 Stunden post-SID). Als Gruppengröße wurde jeweils  $n = 12$  gewählt.

Insgesamt umfasste der Versuch  $6 \times 2 \times 12 = 144$  Versuchstiere, von denen 120 genehmigungspflichtig waren (bei den gänzlich unbehandelten Mäusen handelt es sich nicht um Versuchstiere im engeren Sinne).

### 3.2.2 Tierexperimentelle Methoden

#### 3.2.2.1 Genehmigung

Gemäß Tierschutzgesetz wurden alle tierexperimentellen Arbeiten vor der Durchführung durch das *Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern* (LALLF) unter dem Aktenzeichen 7221.3-1.1-045/12 genehmigt.

#### 3.2.2.2 Tierzucht und Haltung

Die Tierversuche wurden in der *Zentralen Service- und Forschungseinrichtung für Versuchstiere* (ZSFV; Leiter: Dr. rer. nat. Jens van den Brandt) im BioTechnikum, Walter-Rathenau-Straße 49a, 17489 Greifswald, unter Aufsicht von Frau Dipl.-Humanbiologin Christine Hackbarth durchgeführt.

Die weiblichen Versuchstiere vom Typ *C57BL/6N* wurden über Charles River Germany GmbH, Sulzfeld, mindestens zwei Wochen vor Versuchsbeginn bezogen und eingestallt. Gemäß EU-Richtlinie 2010/63/EU wurden maximal sechs Tiere pro Käfig gehalten.

Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen Typ IIL gehalten mit Einstreu aus Lignocel-Naturholzfaser und erhielten Wasser ad libitum. Als Futter wurde Maus-Zucht-Futter Extrudat verwendet, welches die Mäuse ebenfalls ad libitum erhielten.

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz (TierSchG) durchgeführt.

Die Mäuse wurden über den gesamten Versuchszeitraum gemäß Tabelle 1 überwacht mit der Maßgabe, bei Punktwerten von  $\geq 7$  die Maus zu euthanasieren, was während des gesamten Projektes bei keiner Maus der Fall war.

<b>Parameter</b>	<b>Untersuchung</b>	<b>Bewertung</b>	<b>Punkte</b>
Erscheinungs- bild	Inspektion	Normal, sauber gepflegtes Fell	0
		Gesträubtes Fell	1
		Nasses Fell	2
		Schleimige Augen	3
Atmung	Inspektion	Normal	0
		Beschleunigt	1
		Schwer	2
		schwach	3
Gewichtsverlust	Waage	< 5 %	0
		< 15 %	1
		< 20 %	2
		> 20 %	3
Spontan- verhalten	Beobachtung	Normal, lebhaft, neugierig	0
		Verlangsamt, sitzende Haltung	1
		Träge, buckelige Haltung, schwankender Gang	2
		Seitenlage	3
Provoziertes Verhalten	Beobachtung	Maus flieht bei Käfigöffnung	0
		Fieht bei Annäherung der Hand	1
		Fieht erst bei Berührung	2

		Flieht gar nicht	3
Palpation des Abdomens	Palpation	Weich, kein Druckschmerz	0
		Weich, geringe Schmerzreaktion	1
		Resistenz, deutliche Reaktion	2
		Hart, deutliche Schmerzreaktion	3
Kot-beschaffenheit	Inspektion	Viel Kot im Käfig, koten während der Untersuchung	0
		Viel blutiger, schleimiger Kot	1
		Wenig Kot im Käfig	2
		Kein frischer Kot im Käfig	3

Tabelle 1: Belastungsscore für Versuchstiere nach SID und Vagotomie

### 3.2.2.3 Narkose

Für die Narkose wurde ein Gemisch bestehend aus 8,5 mL 0,9 % NaCl-Lösung, 1 mL 10 % Ketamin und 0,5 mL 2 % Xylazin unter keimarmen Bedingungen im S1-Labor für jeden Versuchstag neu hergestellt. Von diesem Gemisch wurden mit einer sterilen 1 mL-Einmalspritze pro Gramm Körpergewicht 10  $\mu$ L des Narkosegemisches intraperitoneal appliziert. Dies entsprach für Ketamin 100 mg/kg Körpergewicht und für Xylazin 10 mg/kg Körpergewicht.

Anschließend wurde die Maus in einen separaten Käfig gesetzt, bis sie deutlich sichtbar narkotisiert war, d.h. keine Reaktion auf das Setzen eines lokalen Schmerzreizes sichtbar war.

### 3.2.2.4 Vagotomie (VGX, nach Kessler et al.)

Die Methode der subdiaphragmalen Vagotomie wurde zuerst von Kessler et al. beschrieben [89]. Nach Narkotisieren der Maus wurde die Haut zunächst mit 70 % Ethanol desinfiziert und die Haut für mindestens 30 Sekunden feucht gehalten, um eine suffiziente Desinfektion zu gewährleisten. Die Maus wurde für die Operation auf dem Rücken auf einer Wärmeplatte mit Leukoplast-Pflasterstreifen an den vier Pfoten fixiert. Anschließend wurde zunächst die Haut mit einer Schere median durchtrennt und das kaudale Sternum mit Ansatz des *M. rectus abdominis* freipräpariert. Das Gebiet zwischen den Muskelbäuchen des *M. rectus abdominis* (Linea alba) ist i.d.R. frei von großen, Blut führenden Gefäßen. Im nächsten Schritt wurde die *Linea alba* durchtrennt. Dabei wird zwangsläufig auch das Peritoneum parietale durchtrennt. Die Muskelbäuche wurden jeweils links und rechts mit zwei Haken vorsichtig im ca. 30°-Winkel nach oben auseinandergezogen. Nun stellte sich der linke Leberlappen und der Magen dar. Der

linke Leberlappen wurde vorsichtig mit geringem Druck mit einem Leberhaken nach oben rechts mobilisiert, um freie Sicht auf den proximalen Magen- und distalen Ösophagusabschnitt zu gewährleisten. Dabei wurde darauf geachtet, die Leberoberfläche immer feucht zu halten, um ein Austrocknen zu verhindern.

Die folgenden Operationsschritte fanden unter dem Operationsmikroskop statt. Durch moderaten Zug am Magen nach distal mit einem Wattetupfer konnte i.d.R. der vordere Ast des *N. vagus* (*Truncus vagalis anterior*) dargestellt werden. Dieser wurde nun mit einer Pinzette auf einer Länge von ca. 3 mm reseziert. Für die Präparation des hinteren Astes des *N. vagus* (*Truncus vagalis posterior*) wurde der Ösophagus mit einer Pinzette vorsichtig vorne gegriffen und dieser dabei nach links oder rechts gerollt. Da der hintere Vagusast selten genau mittig hinter dem Ösophagus verläuft, gelang so in allen Fällen die Darstellung des *Truncus vagalis posterior*. Danach wurde dieser ebenfalls auf einer Länge von ca. 3 mm mit einer Pinzette durchtrennt. Nun wurde zunächst der Leberhaken wieder entfernt und als Ausgleich für Flüssigkeitsverluste 0,5 mL 0,9 % NaCl-Lösung i.p. substituiert. Anschließend wurden die beiden seitlichen Haken entfernt und das Peritoneum, sowie die Muskel- und Faszienschicht mit einem 5-0 (nach USP) resorbierbaren Vicryl-Faden fortlaufend verschlossen. Die Hautschicht wurde dann mit einem 4-0 (nach USP) nicht-resorbierbaren Polyester-Faden fortlaufend verschlossen. Nach einer Schlussdesinfektion mit 70 % Ethanol wurde die Maus zum Aufwachen in den Käfig umgelagert und unter einer Rotlicht-Wärmelampe bei einer Temperatur von 35°C- 37°C bis zum Aufwachen überwacht. Zur postoperativen Analgesie erhielten die Mäuse bis drei Tage nach der Operation Tramadol über das Trinkwasser (50 mg/L Trinkwasser) ad libitum.

#### 3.2.2.5 Surgically-induced immune dysfunction (SID; nach Koerner et al.)

Die Erstbeschreibung des OP-Modells der SID erfolgte 2011 durch Koerner et al. [26] und stellt eine Weiterentwicklung der intestinalen Manipulation nach Kalff et al. dar [30]. Für die SID-Operation wurden die Mäuse narkotisiert und anschließend auf der Wärmeplatte auf dem Rücken mit Leukoplast-Pflasterstreifen fixiert und die Haut auf dem Abdomen mit 70 % Ethanol desinfiziert und für mindestens 30 Sekunden feucht gehalten. Anschließend wurde die Haut des Abdomens median mit einer Schere auf einer Länge von ca. 1,5 cm eröffnet und der *M. rectus abdominis* freipräpariert. Nach Durchtrennung der *Linea alba* auf einer Länge von ca. 1,5 cm kam der Dünndarm zur Darstellung. Dieser wurde zusammen mit dem Caecum mit

zwei Wattestäbchen vorsichtig mit geringem Druck auf einem Lochtuch auf seiner gesamten Länge ausgebreitet.

Anschließend wurde der Dünndarm ab dem Duodenum mit zwei sterilen und mit 0,9 %-igen NaCl-Lösung befeuchteten Wattestäbchen antegrad in Richtung des Caecums mit leichtem Druck ausgestrichen. Dabei wurde der Druck so gewählt, dass der Stuhl in Richtung Caecum massiert wurde, allerdings auch so gering, dass makroskopisch keine Einblutungen in die Darmwand sichtbar waren. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt, sodass der Dünndarm insgesamt dreimal ausgestrichen wurde. Nach dem letzten Durchgang wurde der Dünndarm mit Caecum mit den zwei Wattestäbchen wieder in das Abdomen entsprechend der ursprünglichen anatomischen Anordnung zurückverlagert. Der Nahtverschluss und das weitere postoperative Vorgehen wurde identisch zu denen der Vagotomie bzw. Sham-Vagotomie durchgeführt.

#### *3.2.2.6 Euthanasie und Organentnahme*

Zur Blut- und Organentnahme wurde die Maus narkotisiert. Anschließend wurde mittels einer 20 µL-Kapillare retrobulbär mindestens 1,0 mL Blut abgenommen.

Für die Organentnahme wurde die Maus mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Zur Entnahme der Milz wurde die Maus zunächst erneut median laparotomiert und die Milz in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß in 1,0 mL FACS<sup>®</sup>-Puffer aufgenommen.

#### *3.2.3 Zellbiologische Methoden*

##### *3.2.3.1 Splenozytenisolation*

Zur Isolation der Splenozyten wurden die entnommenen Milzen zunächst mittels eines Stempels einer 5 mL-Spritze durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb, welches auf einem 50 mL-Falcon-Röhrchen aufgesetzt war, gedrückt. Dabei wurde ständig mit FACS-Puffer gespült, bis nur noch die Milzkapsel auf dem Zellsieb sichtbar war. Anschließend wurde das Gemisch bei 300 g, 4°C für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachfolgend wurden die Erythrozyten mit 5 mL Erythrozyten-Lyse-Puffer (bestehend aus 0,5 mL RBC Lysis Buffer und 4,5 mL Aqua dest.) bei Raumtemperatur für fünf Minuten lysiert. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 300 g, 4°C für zehn Minuten. Das Zellpellet wurde anschließend in einem Milliliter FACS-Puffer resuspendiert.



### 3.2.3.2 Zellzählung

Die Zellzählung für die nachfolgenden Experimente wurde mittels BD TruCount-Beads durchgeführt. Dazu wurden mit einem Milliliter FACS-Puffer die TruCount-Kügelchen unter intensivem Vortexen aufgelöst. Anschließend wurde ein Gemisch aus 200  $\mu\text{L}$  Beads und 20  $\mu\text{L}$  Zellen (welche zuvor in 1 mL FACS-Puffer aufgenommen wurden) hergestellt. Daraufhin wurden durchflusszytometrisch (BD LSR II) die Anzahl an Beads und Zellen bestimmt. Da die Anzahl Beads im Gemisch bekannt ist, kann per Dreisatz die Anzahl der Zellen in einem Milliliter Gemisch bestimmt werden.

$$\frac{\text{gemessene Zellzahl} \times \text{Beads gesamt (in 200 } \mu\text{L)}}{\text{gemessene Beads}} \times 50 = \text{Anzahl der Zellen pro mL}$$

Das benötigte Volumen an Zellsuspensionslösung kann dann mit folgender Formel errechnet werden:

$$\frac{1\,000\,000 \text{ Zellen}}{\text{Anzahl der Zellen pro mL}} \times 1000 \mu\text{L} = x \quad \mu\text{L pro 1 Mio. Zellen}$$

### 3.2.3.3 LPS-Stimulation

Nach der Durchführung der Splenozytenisolation (siehe Kap. 3.2.3.1 auf S. 20) und nachfolgender Zellzählung (siehe Kap. 3.2.3.2 auf S. 21) wurden  $7 \times 10^6$  Zellen pro Maus nach o.g. Formel in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß aufgenommen und auf 1 mL mit FACS-Puffer aufgefüllt. Anschließend erfolgte bei  $4^\circ\text{C}$  und 1500 rpm eine fünfminütige Zentrifugation mit der Mikrozentrifuge 5415R. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilbank.

Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen in 0,7 mL RPMI-Medium resuspendiert.

Das Medium wurde jeweils frisch aus 500 mL RPMI 1640, 50 mL FCS 10%-ig, 5 mL Pen. /Strep. und 500  $\mu\text{L}$  2-Mercaptoethanol hergestellt. Für das LPS-stimulierte Medium wurden 9980  $\mu\text{L}$  zuvor hergestelltes Medium und 20  $\mu\text{L}$  LPS-Stocklösung zu einer Konzentration von 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gemischt.

Anschließend wurden jeweils 100  $\mu\text{L}$  Zellen (entsprechend 1 Million Zellen) in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben. Für die Kontrollproben wurde 100  $\mu\text{L}$  Medium hinzugegeben und für die LPS-stimulierten Proben 100  $\mu\text{L}$  des LPS-Mediums mit einer daraus resultierenden Endkonzentration von LPS von 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Es wurde ein Dreifachansatz pro Maus gewählt.

Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach 24 Stunden wurden die Mikrotiterplatten bei 4°C und 1200 rpm (300 g) für zehn Minuten zentrifugiert und jeweils 150 µL des Überstandes abgenommen und in 0,5 mL-Reaktionsgefäßen gepoolt. Bis zur Auswertung der Daten mittels CBA (siehe 3.2.3.6) wurden die Proben bei -70°C eingefroren.

#### *3.2.3.4 Weiterverarbeitung der Serum- und Plasmaproben*

Die Serum- und Plasmaproben wurden jeweils zweimal bei 1500 g bei 4°C für zehn Minuten zentrifugiert und die Überstände jeweils in ein neues 0,5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden für die Plasmaproben mindestens drei Aliquots für die CBA-Untersuchung und HMGB1-ELISA und eine Rückstellprobe bei -70°C für die spätere Analyse eingefroren. Für die Serum-Proben wurden in der Regel zwei Aliquots für den Cotinine-ELISA und eine Rückstellprobe ebenfalls bei -70°C eingefroren.

#### *3.2.3.5 Cotinine-ELISA*

##### Funktionsprinzip:

Für den Cotinine-ELISA wurde ein Kit (Mouse/ Rat Cotinine-ELISA, Ref.: SE120083) der Firma Sigma-Aldrich, St. Louis, USA verwendet. Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven ELISA im Sinne eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (EIA), d.h. je niedriger die optische Dichte der Proben, umso höher ist die Konzentration an Cotinine. Cotinine ist ein Abbauprodukt des Nikotins und wird als Parameter für die Nikotin-Aufnahme verwendet, da Nikotin aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit nicht gemessen werden kann. Das Funktionsprinzip hierhinter ist, dass zunächst Cotinine aus den Proben an die Anti-Cotinine-Antikörper der Platte bindet. Anschließend bindet ein Cotinine-HRP-Enzym-Gemisch an die ungebundenen Cotinine-Antikörper. Diese Menge wird mittels TMB, welches von der HRP umgesetzt wird, später mittels optischer Dichte gemessen.

##### Arbeitsschritte gemäß Herstellerangaben:

Zunächst wurden das Kit und alle Proben auf Raumtemperatur aufgewärmt bzw. aufgetaut. Dann wurden 10 µL der Proben, Standards und Negativ-Kontrollen als Dubletten in die Wells der mit polyklonalem Anti-Cotinine-Antikörper beschichtet 96-well-Platten gegeben. Danach wurden 100 µL einer Cotinine-HRP-Enzym-Konjugates hinzugegeben und die Platte

für 30 Sekunden vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurden die Platten bei Raumtemperatur für 60 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgten sechs Waschschrte mit je 300  $\mu\text{L}$  destilliertem Wasser. Die Platten wurden dann auf der Arbeitsplatte trocken geschlagen, um möglichst alle Konjugat-Rückstände zu entfernen. Danach wurden 100  $\mu\text{L}$  TMB-Substrat in die Wells gegeben und die Platten für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend 100  $\mu\text{L}$  einer Stopplösung hinzugegeben.

Es erfolgte dann die zügige Messung der optischen Dichten (OD's) bei 450 nm Wellenlänge mit dem Mikroplatten-Reader TECAN Infinite 200 PRO mit TECAN i-control.

#### Berechnung der Konzentration:

Um aus den OD's die Konzentrationen von Cotinine zu berechnen, wurden zunächst in Excel die Mittelwerte aus den Dubletten gebildet. Die folgenden Rechenschritte wurden mit GraphPad Prism 6 durchgeführt: Zunächst wurden die Konzentrationen der Standardreihe mittels der Rechenoperation  $X = \log_{10}(X)$  logarithmiert. Anschließend wurde eine *non-linear-Fit-Kurve (4-Parameter Logistics)* aus Standardreihe und OD's erstellt und daraus die Werte der Proben interpoliert. Abschließend wurden diese Werte wieder zurück mittels  $X = 10^X$  in die echten Konzentrationen zurückgerechnet. Die Qualität des Curve-Fittings mit Interpolation war sehr hoch mit  $R^2 \geq 0,95$  und  $S_{yx}$ -Werten  $\leq 0,05$  für alle Platten.

#### 3.2.3.6 Cytometric Bead Array (CBA)

##### Funktionsprinzip:

Beim Cytometric Bead Array werden Antikörper gegen die jeweiligen Proteine mit der zu bestimmenden Lösung inkubiert. Diese werden dann an Kügelchen (Beads) gebunden, die durchflusszytometrisch zunächst für jeden Parameter zusammengefasst werden um anschließend über einen Reporterparameter die Konzentration an Proteinen zu ermitteln. In diesem Fall dienen APC und APC-Cy7 als Clusterparameter und PE als Reporterparameter. Der Vorteil liegt in der Möglichkeit, viele verschiedene Proteine (bis zu 30) gleichzeitig aus wenig Probenvolumen zu bestimmen.

##### Arbeitsschritte gemäß Herstellerangaben (vereinfacht):

Es werden 0,5  $\mu\text{L}$ /Probe und der jeweiligen Zytokin Capture Beads verwendet. Da acht Zytokine (IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A) gemessen wurden, wurde

zunächst ein Mastermix bestehend aus den jeweiligen Capture Beads und einer Verdünnungslösung angesetzt.

Als Standardreihe diente eine Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:256 und ein Leerwert.

Zur Bestimmung wurden 50 µL der Proben bzw. Standardreihe in ein 12 x 75 mm-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 50 µL des Capture Bead Mix gemischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurde 50 µL PE Detection Reagenz pro Röhrchen hinzugegeben und erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 mL Waschpuffer hinzugegeben und anschließend bei 200 g für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150 µL Waschpuffer resuspendiert. Das Durchflusszytometer wurde zuvor nach Herstellerangaben mit Setup Up Beads kalibriert.

Am Durchflusszytometer BD LSR II wurden 300 Events pro Zytokin (d.h. 2400 Events bei acht Zytokinen) für jede Probe bzw. Standard aufgenommen.

#### Berechnung der Konzentration:

Die Auswertung der Proben erfolgte mit dem Programm FCAP Array v3.0.1. Zunächst wurden die Bead-Populationen die einzelnen Zytokine gemäß Herstellerangaben zugeordnet. Als Cluster-Parameter wurden APC und APC-Cy7 verwendet. Als Reporter-Parameter diente PE. Nach Zuordnung der korrekten Standardreihe wurden die Endkonzentrationen durch FCAP berechnet.

#### *3.2.3.7 Analyse des Blutbildes*

50 µL EDTA-Blut wurden im VetScan HM5 analysiert. Das Gerät liefert Daten über die Anzahl und relativen Anteil (%) an Leukozyten (WBC), Lymphozyten (LYM), Monozyten (MON), Neutrophilen (NEU), Eosinophilen (EOS) und Basophilen (BAS). Zusätzlich konnten die Anzahl an Erythrozyten (RBC), der Hämoglobingehalt (HGB), der Hämatokrit (HCT) und das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV), mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) und Erythrozytenverteilungsbreite (RDWc) angegeben werden. Bei den Thrombozyten wurde die Anzahl (PLT), der Thrombozytenhämatokrit (PCT), das mittlere Volumen (MPV) und die Thrombozytenverteilungsbreite (PDWc) analysiert.

### 3.2.3.8 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen fanden am BD LSR II in der Abteilung für Immunologie (Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. B. Bröker) statt. Es wurden zwei Färbungen durchgeführt.

Alle Antikörper wurden zur optimalen Färbung zuvor nach etablierten Protokollen unter Berechnung des Staining Index austitriert [90,91].

Nach Isolation der Splenozyten (siehe 3.2.3.1) und Zellzählung wurden eine Million Zellen in 2 mL PBS aufgenommen und bei 300 g für sechs Minuten und 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Zur Lebend-tot-Determinierung wurde eine Färbung mittels Zombie-Farbstoffs durchgeführt. Dazu wurden 100 µL Zombie-Mix (0,1 µL Zombie-NIR in 100 µL PBS) mit den Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Zentrifugation bei 300 g für sechs Minuten und 4°C wurde der Überstand abgesaugt. Um das unspezifische Fc-Rezeptor-vermittelte Binden von Antikörpern zu verhindern, wurde ein Fc-Block mit 0,5 µL CD16/32-Antikörpern durchgeführt und dieser anschließend für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Um bei kleinen Pipettier-Volumina gleichbleibende Mengen zu gewährleisten, wurden für jede Färbung Master-Mixe erstellt (für Färbung 2 ohne alpha7, anti-goat-IgG-Biotin und Streptavidin-PE).

Folgende Färbungen wurden durchgeführt:

Färbung 1		
Antigen	Farbe	Verdünnung
CD45	BV510	1:40
B220	FITC	1:20
CD4	Alexa647	1:80
CD8	BV650	1:40
CD3	PerCP/ Cy5.5	1:100
MHC II	PE	1:50

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Antikörper für die durchflusszytometrische Färbung 1. Für genaue Angaben zu den einzelnen Antikörpern siehe Tabelle 4 auf Seite 61f

Färbung 2		
Antigen	Farbe	Verdünnung
CD3	PerCP/ Cy5.5	1:100
CD19	PerCP/ Cy5.5	1:400
NK 1.1	PerCP/ Cy5.5	1:200
CD11b	BV650	1:500
CD11c	PE-Dazzle	1:500
Ly6G	V450	1:200
Ly6C	APC	1:100
MHC II	FITC	1:200
Alpha7	<i>Purified</i>	1:100
Anti-goat-IgG	Biotin	1:200
Streptavidin	PE	1:200

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Antikörper für die durchflusszytometrische Färbung 2. Für genaue Angaben zu den einzelnen Antikörpern siehe Tabelle 4 auf Seite 61f

Nach Zugabe von 50  $\mu$ L der jeweiligen Mastermixe in den o.g. Verdünnungen wurden die Zellen für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 2 mL FACS-Puffer aufgefüllt und bei 300 g für sechs Minuten und 4°C zentrifugiert. Bei Färbung 2 wurde anschließend noch 50  $\mu$ L Streptavidin-PE-Mix hinzugegeben und zehn Minuten auf Eis inkubiert und anschließend wie zuvor mit 2 mL FACS-Puffer aufgefüllt und bei 300 g für sechs Minuten und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernen der Überstände wurde das Pellet für beide Färbungen auf in 250  $\mu$ L FACS-Puffer resuspendiert und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Für Färbung 1 wurden dabei mindestens 300 000 Events aufgenommen, für Färbung 2 mindestens 1 000 000 Events.

#### Auswertung und Gating-Strategie:

Die Auswertung der Daten erfolgte mit FlowJo X v10.0.7r2.

Färbung 1 diente der Übersicht über verschiedene Zellpopulationen wie B-Zellen, T-Zellen (T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen) mit MHC II als Aktivierungsmarker.

Färbung 2 diente der genaueren Analyse der Milzmakrophagen mit MHC II als Aktivierungsmarker und alpha7 als Zielmolekül des Nikotins. Grundlage der Gating-Strategie war eine Arbeit von Rose et al. [92]. Dazu wurden zunächst CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, CD19<sup>+</sup>-B-Zellen

und NK 1.1<sup>+</sup>-NK-Zellen herausselektiert. Um Farbstoffe einzusparen, wurden diese mit dem gleichen Farbstoff (PerCP/ Cy5.5) markiert und als eine große positive Population selektiert. Die weitere Selektion erfolgte über CD11c<sup>-</sup>-Zellen, CD11b<sup>+</sup>-Zellen und dann als Auftragung von Ly6G gegenüber Ly6C. Die Aktivierungsmarker MHCII und alpha7 wurden als gMFI ausgewertet. Eine Übersicht der Gating-Strategie ist im Anhang auf Seite 59f aufgeführt.

### *3.2.4 Statistische Auswertung*

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism.

Als Vortest wurde zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft, ob die Daten normalverteilt sind. Wenn dies der Fall war, wurde anschließend parametrisch mittels ungepaartem zweiseitigem t-Test auf statistische Signifikanz getestet. Die Signifikanzniveaus wurde mit \*  $\alpha = 0,05$ ; \*\*  $\alpha = 0,01$ ; \*\*\*  $\alpha = 0,001$  festgelegt. Falls die Daten nicht normalverteilt waren, wurde nicht-parametrisch mittels ungepaartem, zweiseitigem Mann-Whitney-U-Tests getestet. Die Signifikanzniveaus wurden wie beim t-Test festgelegt. Falls nicht-parametrisch getestet wurde, wurde dies unter den Graphen stets angeben, d.h. wenn nicht anders bezeichnet, wurde stets parametrisch getestet. Sofern nicht anders angegeben, zeigen die Graphen das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vorbemerkungen

Bei den Experimenten des 72h-Zeitpunktes überlebte ein Tier nicht in der Gruppe *Sham-VGX + SID + Nikotin*, ein weiteres Tier überlebte nicht in der Gruppe *VGX + SID* und drei Tiere überlebten nicht in der Gruppe *VGX + SID + Nikotin*.

Somit ergaben sich folgende Berechnungsgrundlagen für die Gruppen:

Unbehandelt	Unbehandelt + Nikotin	Sham-VGX + SID	Sham-VGX + SID + Nikotin	VGX + SID	VGX + SID + Nikotin
n = 12	n = 12	n = 12	n = 11	n = 11	n = 9

Für den 6h-Zeitpunkt überlebten alle Tiere, sodass hier die Berechnungsgrundlage mit  $n = 12$  für alle Gruppen gleich bleibt. Allerdings gab es bei einem Versuchstag mit jeweils  $n = 3$  ein technisches Problem mit dem Durchflusszytometer, sodass alle durchflusszytometrischen Ergebnisse auf einer Gruppengröße von  $n = 9$  basieren.

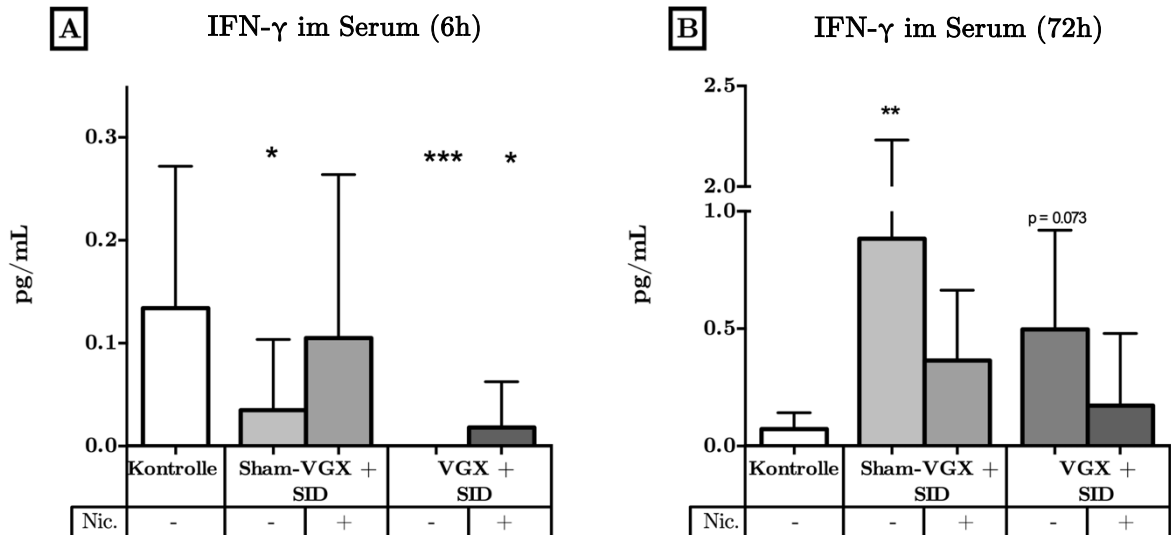
Falls weitere Tiere in Berechnungen nicht miteinbezogen wurden, wurde dies zuvor mittels ROUT-Outlier's-Tests ( $Q = 0.1 \%$ ) berechnet und das Tier aus allen weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Eventuelle ausgeschlossene Tiere finden sich in den Tabellen im Anhang.

### 4.2 Veränderungen der Serumzytokine nach SID

#### 4.2.1 SID führt in der Frühphase zu reduzierten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen, in der späten Phase tendenziell zu höheren IFN- $\gamma$ -Konzentrationen

Nach 6 Stunden (**Abbildung 1A**) nahm die IFN- $\gamma$ -Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Mäusen von  $0.134 \pm 0.137$  pg/mL auf  $0.035 \pm 0.020$  pg/mL in der Sham-VGX + SID-Behandlungsgruppe signifikant ( $p = 0.04$ ) ab. In der Sham-VGX + SID + Nikotin-Behandlungsgruppe nahm sie auf  $0.105 \pm 0.159$  pg/mL ab (ns;  $p > 0.99$ ), in der VGX + SID-Behandlungsgruppe konnte kein IFN- $\gamma$  detektiert werden ( $p < 0.001$ ), und in der VGX + SID





**Abbildung 1: SID führt in der Frühphase zu reduzierten, in der Spätphase zu höheren Interferon- $\gamma$ -Spiegeln** (Angaben sind arithmetisches Mittel und Standardabweichung 6h (A) und 72h (B) nach SID. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post-Test.)

+ Nikotin-Behandlungsgruppe auf  $0.180 \pm 0.044$  pg/mL ab ( $p = 0,019$ ). Die IFN- $\gamma$ -Spiegel scheinen dabei in den Vagotomie-Behandlungsgruppen tendenziell niedriger zu sein als in den Sham-Gruppen. Da die Werte nicht normalverteilt waren, konnte kein 2-way-ANOVA angewendet werden (im Mann-Whitney-Test wurde mit  $p = 0.217$  bzw.  $p = 0.068$  zwischen den normal ernährten bzw. den mit Nikotin ernährten Gruppen das Signifikanzniveau verfehlt). Zwischen den Behandlungsgruppen untereinander gab es keine weiteren signifikanten Unterschiede nach sechs Stunden.

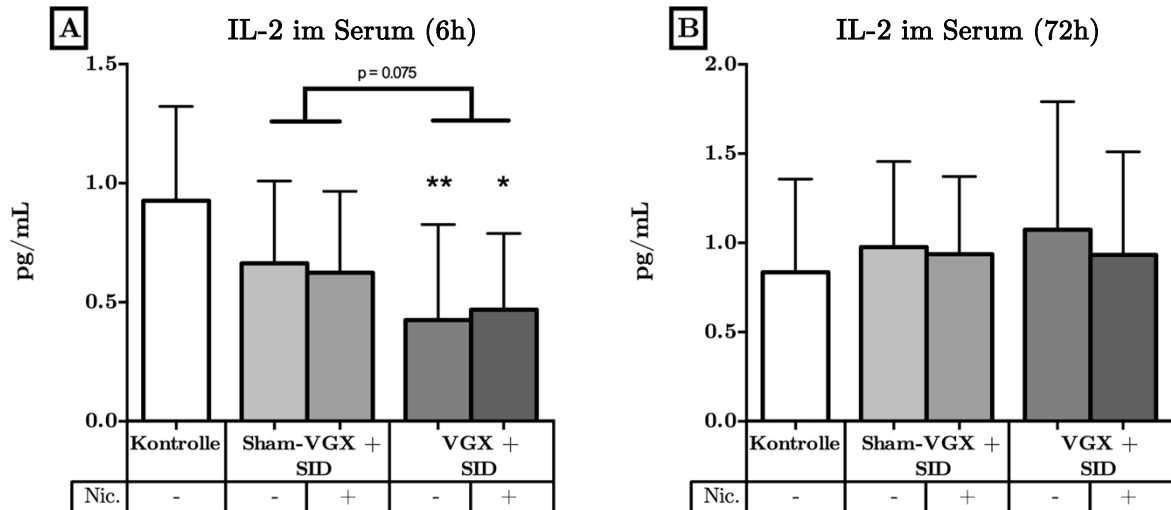
Nach 72 Stunden (**Abbildung 1B**) gab es für IFN- $\gamma$  nur zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und der Sham-VGX + SID-Behandlungsgruppe signifikante Unterschiede ( $p = 0.024$ ). Hier stieg die IFN- $\gamma$ -Konzentration von  $0.073 \pm 0.070$  pg/mL in der Kontrollgruppe auf  $0.884 \pm 1.350$  pg/mL in der Behandlungsgruppe an. Zudem liegen die Werte in den Nikotin-Behandlungsgruppen tendenziell niedriger als in den nicht mit Nikotin behandelten Gruppen, aufgrund der nicht normalverteilten Werte und großen Standardabweichungen sind diese nicht signifikant.

#### 4.2.2 Vagotomie führt in der Frühphase nach SID zu niedrigeren IL-2-Konzentrationen im Serum

Bei IL-2 lag die Konzentration nach sechs Stunden (**Abbildung 2A**) in der Kontrollgruppe bei  $0.927 \pm 0.396$  pg/mL und war damit signifikant höher als in der VGX + SID-Gruppe

( $0.425 \pm 0.401$  pg/mL;  $p = 0.009$ ) und der VGX + SID + Nikotin-Behandlungsgruppe ( $0.469 \pm 0.320$  pg/mL und  $p = 0.030$ ).

Zwischen den anderen Behandlungsgruppen und nach 72 Stunden (**Abbildung 2B**) gab es keine signifikanten Unterschiede.

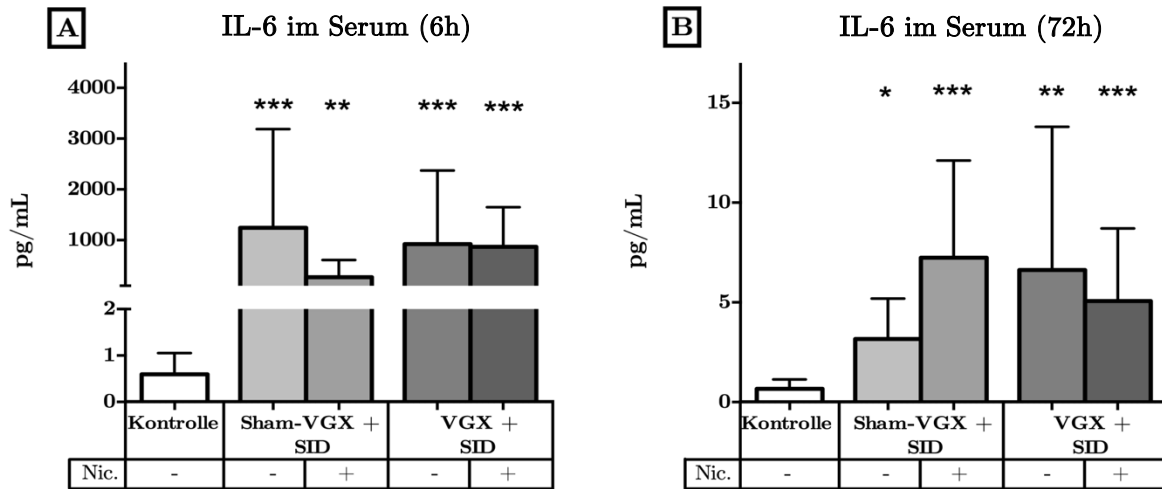


**Abbildung 2: Vagotomie führt in der Frühphase nach SID zu niedrigeren IL-2-Konzentrationen im Serum.** Angegeben sind arithmetisches Mittel und Standardabweichung 6h (A) und 72h (B) nach SID. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post-Test. Gruppenvergleich mit Ordinary 2-way-ANOVA.

Die Vagotomie scheint zum frühen Zeitpunkt nach Trauma (**Abbildung 2A**) zu niedrigeren IL-2-Konzentrationen im Serum zu führen, das Signifikanzniveau wurde mit  $p = 0.068$  in der 2-way-ANOVA allerdings knapp verfehlt. Nach 72 Stunden sind die Effekte des N. vagus nicht mehr sichtbar.

#### 4.2.3 In der Frühphase nach SID zeigen sich massiv erhöhte IL-6-Serumkonzentrationen

Die IL-6-Konzentration lagen nach sechs Stunden (**Abbildung 3A**) in der Kontrollgruppe bei  $0.593 \pm 0.458$  pg/mL. Sie stiegen in allen Behandlungsgruppen stark auf sehr hohe Werte von  $825 \pm 1\,311$  pg/mL. Die Anstiege waren in allen Behandlungsgruppe hochsignifikant mit  $p < 0.001$ .



**Abbildung 3:** In der Frühphase nach operativem Trauma zeigen sich massiv erhöhte Interleukin-6-Konzentrationen, welche auch nach 72h weiter erhöht sind. (Arithmetisches Mittel und Standardabweichung von IL-6 6h (A) und 72h (B) nach SID. Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post-Test.)

Nach 72 Stunden (**Abbildung 3B**) konnte bei den unbehandelten Kontrolltieren ein IL-6-Spiegel von durchschnittlich  $0.672 \pm 0.468$  pg/mL gemessen werden. In allen Behandlungsgruppen waren die IL-6-Spiegel wie zum 6-Stunden-Zeitpunkt signifikant erhöht ( $3.164 \pm 2.030$  pg/mL für Sham-VGX + SID,  $p = 0.011$ ;  $7.245 \pm 4.865$  pg/mL für Sham-VGX + SID + Nikotin,  $p < 0.001$  ;  $6.627 \pm 7.178$  pg/mL für VGX + SID,  $p = 0.001$ ;  $5.071 \pm 3.638$  pg/mL für VGX + SID + Nikotin,  $p < 0.001$ ), auch wenn nach 72 Stunden die Konzentrationen ca. zwei Zehnerpotenzen kleiner waren als nach sechs Stunden. Zwischen den Behandlungsgruppen gab es weder nach sechs noch nach 72 Stunden signifikante Unterschiede.

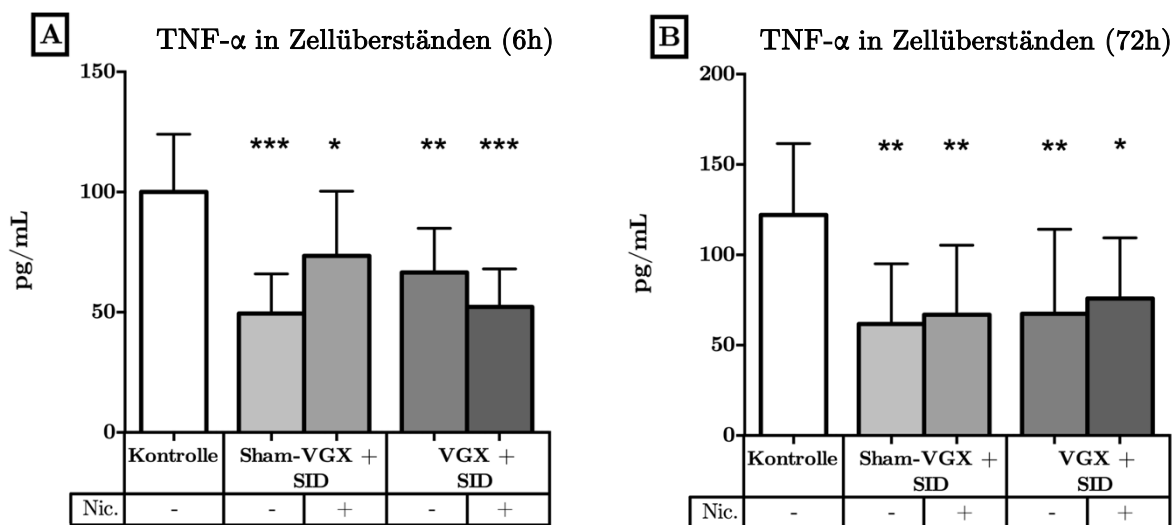
Für TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70 gab es weder zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen noch zwischen den Behandlungsgruppen untereinander signifikante Unterschiede zu den jeweiligen Zeitpunkten (Daten daher nicht dargestellt).

### 4.3 Basale Zytokinsekretion von isolierten Splenozyten

#### 4.3.1 Basale TNF- $\alpha$ -Sekretion ist nach SID vermindert

Die TNF- $\alpha$ -Spiegel in den Überständen der Splenozytenkulturen über 24 Stunden waren zum 6h-Zeitpunkt (**Abbildung 4A**) in allen Behandlungsgruppen signifikant niedriger im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $100.0 \pm 24.09$  pg/mL). So lag der Spiegel in der Sham-VGX + SID-Gruppe bei  $49.43 \pm 16.50$  pg/mL ( $p < 0.001$ ), in der Sham-VGX + SID + Nikotin-Gruppe bei  $73.46 \pm 26.91$  pg/mL ( $p = 0.03$ ), in der VGX + SID-Gruppe bei  $66.60 \pm 18.33$  pg/mL ( $p = 0.008$ ) und in der VGX + SID + Nikotin-Gruppe bei  $52.24 \pm 15.76$  pg/mL ( $p < 0.001$ ). Die VGX + SID-Gruppe hatte im Vergleich zur Sham-VGX + SID-Gruppe im Durchschnitt  $17.17$  pg/mL  $[-35.96; 1.626]$  höhere TNF- $\alpha$ -Spiegel, mit  $p = 0.07$  wurde das Signifikanzniveau knapp verfehlt (Ordinary 2-way-ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test). Unter Nikotineinfluss zeigten sich hingegen um  $21.21$  pg/mL  $[2.422; 40.01]$  höhere TNF- $\alpha$ -Spiegel ( $p = 0.024$ ). Zudem führt Nikotin in den Sham-VGX-Gruppen, d.h. mit intaktem N. vagus zu signifikant erhöhten TNF- $\alpha$ -Spiegeln ( $p = 0.009$ ), nicht jedoch in den Vagotomie-Behandlungsgruppen ( $p = 0.1607$ ).

Zum 72-Stunden-Zeitpunkt (**Abbildung 4B**) zeigte sich ein ähnliches Bild: Hier waren die TNF- $\alpha$ -Spiegel in jeweils allen Behandlungsgruppen signifikant niedriger im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe mit durchschnittlich  $122.1 \pm 39.41$  pg/mL. In der Sham-VGX + SID-Gruppe lag er bei  $61.71 \pm 33.29$  pg/mL ( $p = 0.002$ ), in der Sham-VGX + SID +



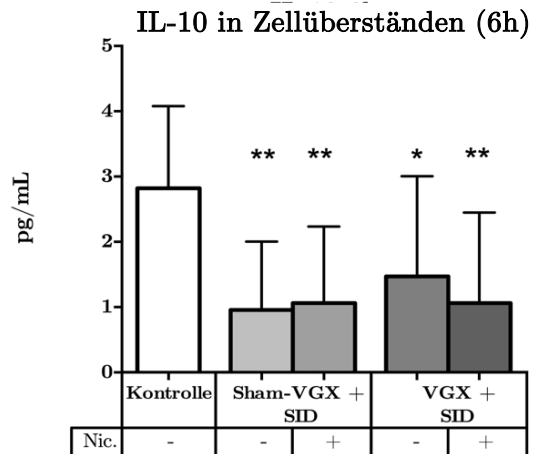
**Abbildung 4: Basale TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den (unstimulierten) Splenozytenkulturen sind nach operativem Trauma vermindert.**

(Angegeben sind arithmetisches Mittel und Standardabweichung von TNF- $\alpha$  in isolierten Splenozyten ohne LPS 6h (A) und 72h (B) nach SID. Ordinary one-way-ANOVA mit Sidak's-post-Test.)

Nikotin-Gruppe bei  $66.85 \pm 38.50$  pg/mL ( $p = 0.006$ ), in der VGX + SID-Gruppe bei  $67.43 \pm 46.69$  pg/mL ( $p = 0.006$ ) und in der VGX + SID + Nikotin-Gruppe bei  $75.80 \pm 33.58$  pg/mL ( $p = 0.021$ ). Innerhalb der Behandlungsgruppe gab es nach 72 Stunden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des TNF- $\alpha$ -Spiegels.

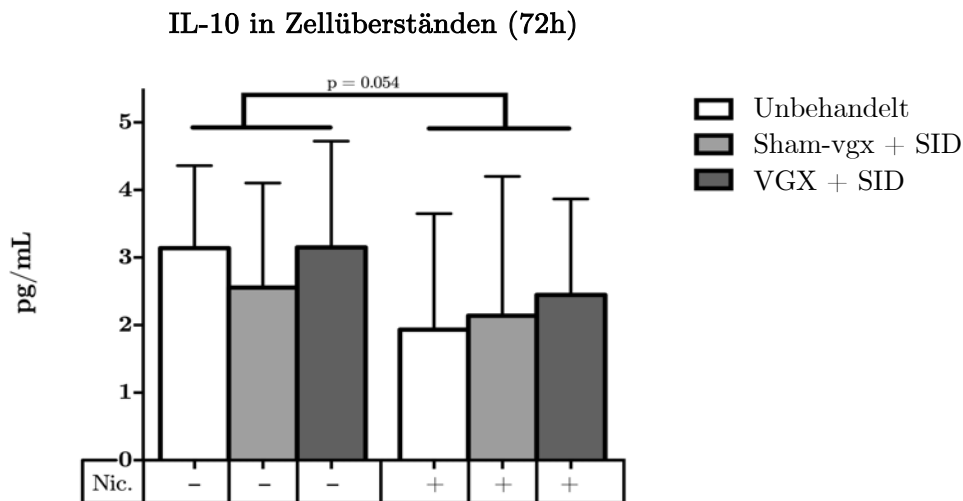
#### 4.3.2 Basale IL-10-Sekretion ist in der frühen Phase nach SID vermindert

Zum Zeitpunkt 6 Stunden nach SID (Abbildung 5) liegen in allen Behandlungsgruppen signifikant niedrigere IL-10-Konzentrationen in den Zellüberständen vor: So sinkt der IL-10-Spiegel von  $2.82 \pm 1.26$  pg/mL in der unbehandelten Kontrollgruppe auf  $0.958 \pm 1.046$  pg/mL in der Sham-VGX + SID-Gruppe ( $p = 0.003$ ), auf  $1.063 \pm 1.171$  pg/mL in der Sham-VGX + SID + Nikotin-Gruppe ( $p = 0.004$ ), auf  $1.470 \pm 1.537$  pg/mL in der VGX + SID-Gruppe ( $p = 0.011$ ) und auf  $1.062 \pm 1.387$  pg/mL in der VGX + SID + Nikotin-Gruppe ( $p = 0.04$ ). Interessanterweise lag der IL-10-Spiegel in der unbehandelten Gruppe, die auch Nikotin erhielt, ebenfalls signifikant niedriger als in der gänzlich unbehandelten Kontrollgruppe ( $1.306 \pm 1.092$  pg/mL;  $p = 0.009$ ; Werte nicht graphisch dargestellt).



**Abbildung 5: Basale Interleukin-10-Konzentration in unstimulierten Zellüberständen ist in der Frühphase vermindert.** (Ordinary one-way-ANOVA mit Sidak's-post-Test.)

#### 4.3.3 Nikotin führt tendenziell zu niedrigeren basalen IL-10-Konzentrationen in der späten Phase nach SID



**Abbildung 6: Nikotin führt zu tendenziell niedrigeren IL-10-Spiegeln in der Spätphase im SID-Modell.** Arythmetisches Mittel und Standardabweichung. Gruppenvergleich mit Ordinary 2-way-ANOVA.

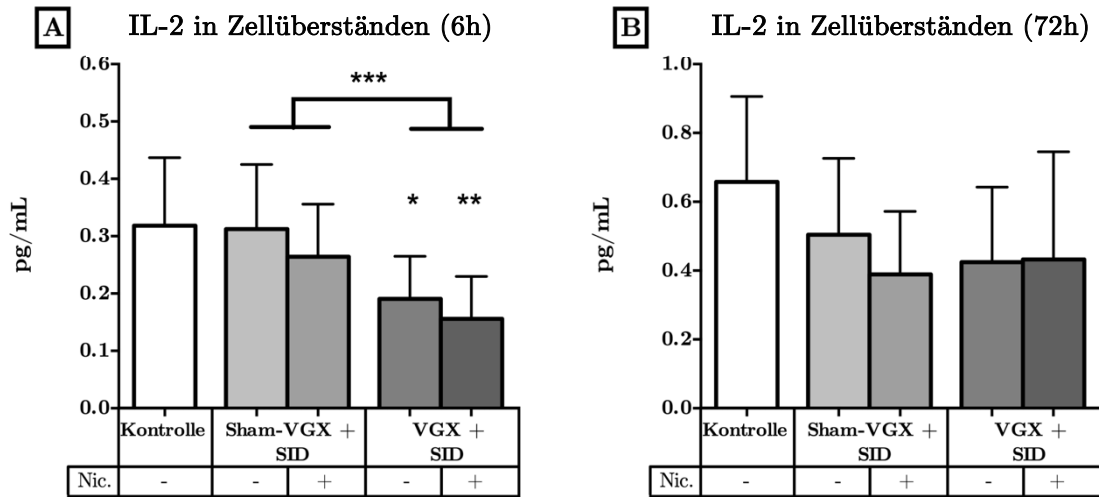
Nach 72 Stunden (**Abbildung 6**) gab es hingegen keine unterschiedlichen Spiegel von IL-10 im Vergleich zur Kontrollgruppe, allerdings deuteten sich hier Effekte des Nikotins an hin zu verringerten IL-10-Spiegeln. Um Nikotineffekte über alle Behandlungsgruppen zu messen, wurde im Folgenden eine 2-way-ANOVA durchgeführt, hier wurde das Signifikanz-Niveau mit  $p = 0.054$  knapp verfehlt.

#### 4.3.4 Basale IL-2-Sekretion ist zum frühen Zeitpunkt nach Trauma unter Vagotomie vermindert

Für IL-2 wurden in der unbehandelten Kontrollgruppe  $0.318 \pm 0.118$  pg/mL gemessen. Dieser Wert sank nach 6 Stunden (**Abbildung 7A**) in beiden Vagotomie-Behandlungsgruppen (VGX + SID bzw. VGX + SID + Nikotin) signifikant auf  $0.191 \pm 0.074$  pg/mL ( $p = 0.015$ ) bzw.  $0.156 \pm 0.074$  pg/mL ab ( $p = 0.002$ ).

In der 2-way-ANOVA-Analyse zeigte sich ein signifikanter Effekt der Vagotomie (mit erniedrigten Werten) gegenüber Sham-vagotomierten Mäusen ( $p < 0.001$ ) für beide Subgruppen: Die Vagotomie reduzierte den IL-2-Spiegel in den mit normalem Wasser ernährten Gruppen um  $0.1217$  pg/mL [0.0370; 0.2063], in den mit Nikotin behandelten Gruppen um  $0.1083$  pg/mL [0.0237; 0.1930] Hinsichtlich des Nikotin-Effekts wurde mit  $p = 0.11$  das Signifikanzniveau verfehlt (2-way-ANOVA).

Nach 72 Stunden (**Abbildung 7B**) scheint SID ebenfalls zu niedrigeren IL-2-Spiegeln im Zellüberstand zu führen, aufgrund der großen Varianzen waren die Unterschiede allerdings nicht signifikant (respektive  $p = 0.580$ ,  $p = 0.085$ ;  $p = 0.178$ ;  $p = 0.256$  für die jeweiligen Behandlungsgruppen von links nach rechts).



**Abbildung 7: IL-2-Freisetzung aus unstimulierten Splenozyten ist bei vagotomierten Mäusen zum frühen Zeitpunkt nach SID supprimiert.** Arithmetisches Mittel und Standardabweichung 6h (A) und 72h (B) nach SID. Ordinary one-way-ANOVA mit Sidak's-post-Test. Gruppenunterschiede mit Ordinary 2-way-ANOVA.

## 4.4 Zytokinsekretion von isolierten Splenozyten nach Stimulation mit LPS

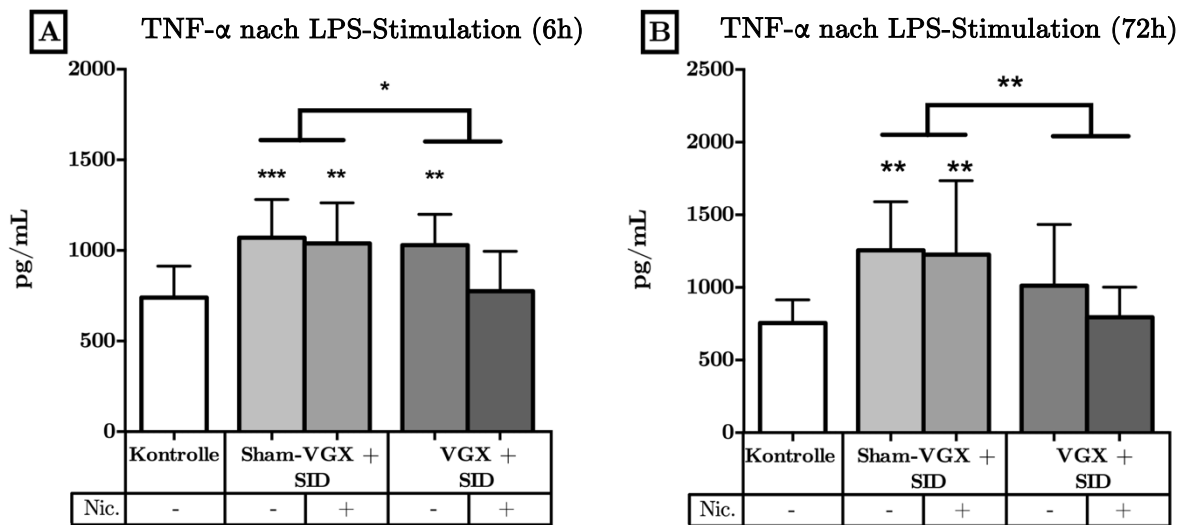
### 4.4.1 OP-Trauma führt bei ex-vivo-LPS-Stimulation zu frühem Zeitpunkt zu erhöhter TNF- $\alpha$ -Ausschüttung

Für TNF- $\alpha$  ergibt sich zum 6h-Zeitpunkt (**Abbildung 8A**) folgendes Bild: Der TNF- $\alpha$ -Spiegel steigt von  $739.8 \pm 174.3$  pg/mL in der unbehandelten Kontrollgruppe auf  $1071 \pm 209.8$  pg/mL in der Sham-VGX + SID-Gruppe ( $p = 0.001$ ), auf  $1039 \pm 224.3$  pg/mL in der Sham-VGX + SID + Nikotin-Gruppe ( $p = 0.002$ ), auf  $1030 \pm 170.2$  pg/mL in der VGX + SID-Gruppe ( $p = 0.003$ ) und  $776.0 \pm 219.9$  pg/mL in der VGX + SID + Nikotin-Gruppe (ns,  $p > 0.99$ ). Dabei zeigt die letztgenannte Gruppe signifikant niedrigere TNF- $\alpha$ -Spiegel als die anderen drei Behandlungsgruppen ( $p = 0.006$ ;  $p = 0.019$ ;  $p = 0.026$ ).

### 4.4.2 OP-Trauma führt bei Sham-vagotomierten Mäusen in der Spätphase zu erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen nach LPS-Stimulation

Nach 72 Stunden (**Abbildung 8B**) zeigt sich ein ähnliches Bild: So zeigen sich nach Sham-VGX + SID und Sham-VGX + SID + Nikotin signifikant erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Zellüberstand ( $1256 \pm 333.6$  pg/mL,  $p = 0.002$  bzw.  $1227 \pm 508.5$  pg/mL,  $p = 0.004$ ). Zu den Vagotomie-Behandlungsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0.181$  bzw.  $p = 0.950$ ). Zusätzlich gab es einen signifikanten Unterschied zwischen Sham-VGX + SID + Nikotin und VGX + SID + Nikotin mit  $p = 0.046$ .





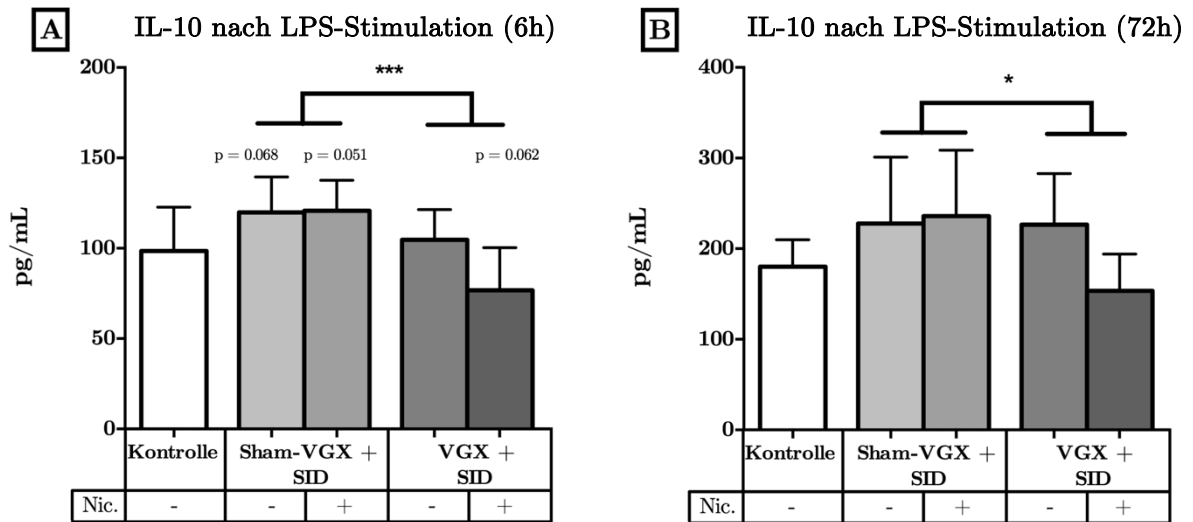
**Abbildung 8: Präoperative Vagotomie führt nach OP-Trauma zu geringerer TNF- $\alpha$ -Ausschüttung aus stimulierten Milzzellen im Vergleich zur Sham-Gruppe.** Arithmetisches Mittel und Standardabweichung 6h (A) und 72h (B) nach SID. Ordinary one-way-ANOVA mit Sidak's-post-Test. Gruppenvergleich mit Ordinary 2-way-ANOVA.

#### 4.4.3 Vagotomie führt im Vergleich zur Sham-Vagotomie zu niedrigeren TNF- $\alpha$ -Spiegeln auf Grundlage der ex-vivo-LPS-Stimulation

In der 2-way-ANOVA zeigen sich in der frühen Phase nach SID (**Abbildung 8A**) Unterschiede in Bezug auf die Variable der Vagotomie, so haben vagotomierte Tiere signifikant niedrigere TNF- $\alpha$ -Spiegel als ihre Sham-vagotomierten Artgenossen ( $p = 0.015$ ). Auch in der späten Phase nach SID (**Abbildung 8B**) führt die Vagotomie zu niedrigeren TNF- $\alpha$ -Ausschüttungen im Vergleich zu Sham-vagotomierten Artgenossen ( $p = 0.007$ ). Nikotin hatte hierauf keinen signifikanten Einfluss.

#### 4.4.4 Vagotomie führt im Vergleich zur Sham-Vagotomie zu niedrigeren IL-10-Konzentration bei ex-vivo-LPS-Stimulation

Für IL-10 gab es nach 6 Stunden (**Abbildung 9A**) hinsichtlich der Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen (Signifikanzniveau wurde mit  $p = 0.052$  für VGX + SID + Nikotin knapp verfehlt). Allerdings zeigte sich in der 2-way-ANOVA ein Einfluss der Vagotomie auf die IL-10-Spiegel ( $p < 0.001$ ). Nach 72 Stunden (**Abbildung 9B**) zeigten sich ebenso keine signifikanten Unterschiede zwischen Behandlungsgruppen und Kontrollgruppe. Unter Einbeziehung der mit Nikotin behandelten Kontrollgruppe konnte ein Einfluss des Nikotins ( $p = 0.017$ ) festgestellt werden, ebenso ein Einfluss der Vagotomie ( $p = 0.0378$ ).



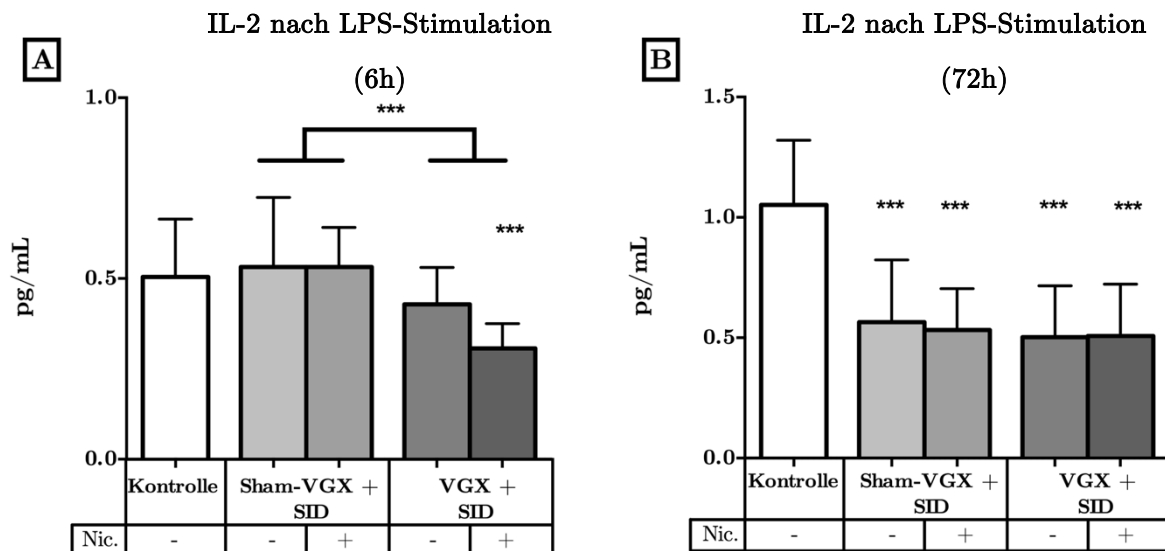
**Abbildung 9: Vagotomie führt auch bei IL-10 zu niedrigerer Ausschüttung nach OP aus stimulierten Splenozytenkulturen sowohl in der Früh- als auch Spätphase.** Arithmetisches Mittel und Standardabweichung 6h (A) und 72h (B) nach SID. Ordinary one-way-ANOVA mit Sidak's-post-Test. Gruppenvergleich mit Ordinary 2-way-ANOVA.

#### 4.4.5 Vagotomie führt in der frühen Phase nach SID zu niedrigeren IL-2-Konzentrationen nach LPS-Stimulation

Für IL-2 lagen in den LPS-stimulierten Zellüberständen bei den unbehandelten Kontrolltieren nach 6 Stunden (**Abbildung 10A**) Konzentrationen von  $0.504 \pm 0.161$  pg/mL vor. In der VGX + SID + Nikotin-Gruppe wurden signifikant niedrigere Zytokin-Spiegel von  $0.307 \pm 0.069$  pg/mL gemessen ( $p = 0.009$ ). Auch lagen die Werte dieser Gruppe signifikant unter denen der anderen Sham-VGX-Behandlungsgruppen ( $0.532 \pm 0.192$  pg/mL für Sham-VGX + SID,  $p = 0.002$ ;  $0.532 \pm 0.109$  pg/mL für Sham-VGX + SID + Nikotin,  $p = 0.003$ ). Insgesamt ergibt sich somit nach 6 Stunden in der 2-way-ANOVA-Analyse ein Vagotomie-Effekt mit signifikant niedrigeren IL-2-Konzentrationen in den Vagotomie-Behandlungsgruppen ( $p < 0.001$ ).

#### 4.4.6 In der späten Phase nach SID wird bei ex-vivo-LPS-Stimulation weniger IL-2 freigesetzt

Nach 72 Stunden (**Abbildung 10B**) wurden in allen Behandlungsgruppen signifikant niedrigere IL-2-Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $1.052 \pm 0.269$  pg/mL) gemessen: so lag sie in der Sham-VGX + SID-Behandlungsgruppe bei  $0.565 \pm 0.258$  pg/mL ( $p < 0.001$ ), in der Sham-VGX + SID + Nikotin-Gruppe bei  $0.532 \pm 0.173$  pg/mL ( $p < 0.001$ ), in der VGX + SID-Gruppe bei  $0.503 \pm 0.213$  pg/mL ( $p < 0.001$ ) und in der VGX + SID + Nikotin-Gruppe bei  $0.508 \pm 0.215$  pg/mL ( $p < 0.001$ ).



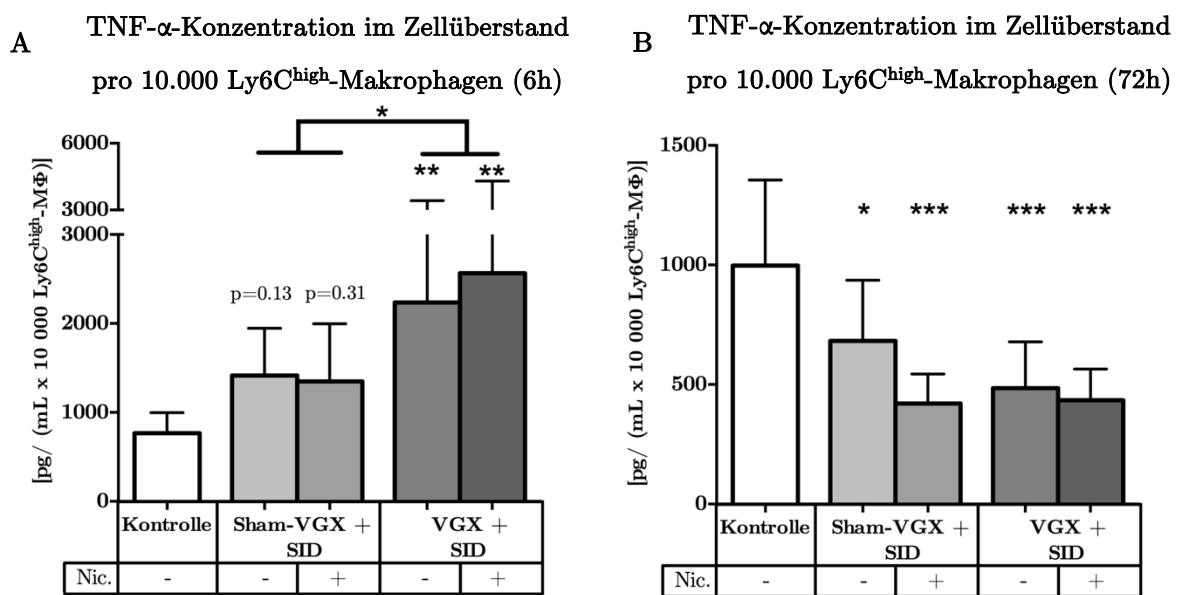
**Abbildung 10:** In der Spätphase nach SID wird bei LPS-stimulierten Splenozyten weniger IL-2 freigesetzt, in der Frühphase in der Vagotomie-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe. Arithmetisches Mittel und Standardabweichung 6h (A) und 72h (B) nach SID. Ordinary one-way-ANOVA mit Sidak's-post-Test. Gruppenvergleich mit Ordinary 2-way-ANOVA.

#### 4.4.7 Die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung von Makrophagen nach Stimulation mit LPS ist in der Frühphase nach SID insbesondere bei Vagotomie erhöht und in der Spätphase vermindert

Wenn die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung in der LPS-Stimulation nun normiert wird auf Ly6C<sup>high</sup>-Makrophagen (dem Hauptproduzenten von TNF- $\alpha$ ), ergibt sich wiederum ein interessantes Bild. Da in der Frühphase nach SID (6 Stunden) der Anteil der Makrophagen in der Milz abnimmt (die absolute Anzahl ist hier weniger entscheidend, da ja eine Million Zellen insgesamt eingesät wurden), erhält man eine noch deutlichere Steigerung der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung (**Abbildung 11A**). Sie verdoppelt sich fast in Sham-Gruppen von  $766.0 \pm 231.8$  pg/mL (Kontrollgruppe) auf  $1415 \pm 532.0$  pg/mL ( $p = 0.13$ ) bzw.  $1349 \pm 648.9$  pg/mL ( $p = 0.31$ ) jeweils auf 10 000 Ly6C<sup>high</sup>-Makrophagen adjustiert. Noch eindrücklicher ist die Steigerung in

den Vagotomie-Behandlungsgruppen: hier verdreifachten sich die adjustierten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den Überständen auf  $2236 \pm 1180$  pg/mL (ohne Nikotin;  $p = 0.004$ ) bzw.  $2565 \pm 1735$  pg/mL (mit Nikotin,  $p = 0.001$ ). In der 2-way-ANOVA zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Faktors der Vagotomie mit  $p = 0.011$ .

Nach 72 Stunden (**Abbildung 11B**) kehrte sich dieses Bild um. Die LPS-stimulierte TNF- $\alpha$ -Sekretion war zwar nach 72 Stunden ebenfalls im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, allerdings erhöhte sich auch der Makrophagen-Anteil in der Milz. In der Kontrollgruppe wurden so adjustierte  $998.0 \pm 357.2$  pg/mL gemessen. Dieser Wert sank in der Sham-VGX + SID-Gruppe auf  $682.5 \pm 254.0$  pg/mL TNF- $\alpha$  ab ( $p = 0.022$ ). In den anderen drei Gruppen halbierten sich die adjustierten Werte auf  $420.1 \pm 123.7$  pg/mL für Sham-VGX + SID + Nikotin ( $p < 0.001$ ),  $484.3 \pm 193.8$  pg/mL für VGX + SID ( $p < 0.001$ ) und auf  $434.5 \pm 130.2$  pg/mL für VGX + SID + Nikotin ( $p < 0.001$ ).



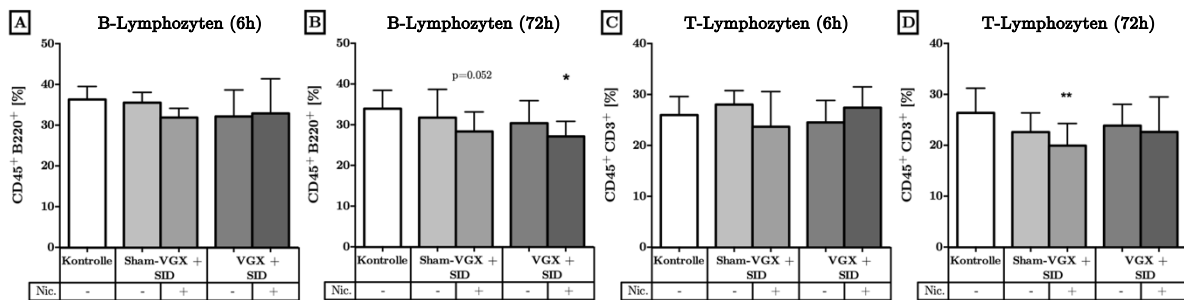
**Abbildung 11:** In der frühen postoperativen Phase zeigen sich insbesondere bei vagotomierten Mäusen erhöhte, adjustierte TNF- $\alpha$ -Konzentration im Zellüberstand nach LPS-Stimulation. Arithmetisches Mittel und Standardabweichung 6h (A) und 72h (B) nach SID. Ordinary one-way-ANOVA mit Sidak's-post-Test. Gruppenvergleich mit Ordinary 2-way-ANOVA.

## 4.5 Veränderungen der Zellpopulationen nach SID

### 4.5.1 Kaum Veränderungen im Anteil an B- und T-Lymphozyten in der Milz

Die Gesamtzellzahlen in den jeweiligen Milzen wurden von der SID weder nach sechs Stunden noch nach 72 Stunden signifikant beeinflusst. Der Anteil an B- und T-Lymphozyten blieb sechs Stunden nach SID ebenfalls unbeeinflusst (**Abbildung 12 A;C**). Er lag für die B-Lymphozyten bei  $36.30 \pm 3.214 \%$  in der Kontrollgruppe und bei durchschnittlich  $33.10 \pm 5.570 \%$  über alle vier OP-Gruppen ( $p = 0.46$ ) und für die T-Lymphozyten bei  $25.96 \pm 3.640 \%$  (Kontrollgruppe) bzw.  $27.42 \pm 4.076 \%$  über alle vier Versuchsgruppen ( $p > 0.99$ ).

Allerdings konnte nach drei Tagen ein Abfall der B-Lymphozyten von  $33.94 \pm 4.523 \%$  in der Kontrollgruppe auf  $28.35 \pm 4.820 \%$  in der Sham-VGX + SID + Nikotin-Behandlungsgruppe ( $p = 0.052$ ) bzw. auf  $27.11 \pm 3.726 \%$  in der VGX + SID + Nikotin-Gruppe ( $p = 0.017$ ) festgestellt werden (**Abbildung 12B**). Der Anteil der T-Lymphozyten sank nach 72 Stunden (**Abbildung 12D**) von  $26.37 \pm 4.834 \%$  in der Kontrollgruppe auf  $19.95 \pm 4.346 \%$  in der Sham-VGX + SID + Nikotin-Gruppe ( $p = 0.007$ ). Zu anderen Behandlungsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede, auch wenn der durchschnittliche Anteil der B- und T-Lymphozyten durchweg kleiner war als in der Kontrollgruppe.



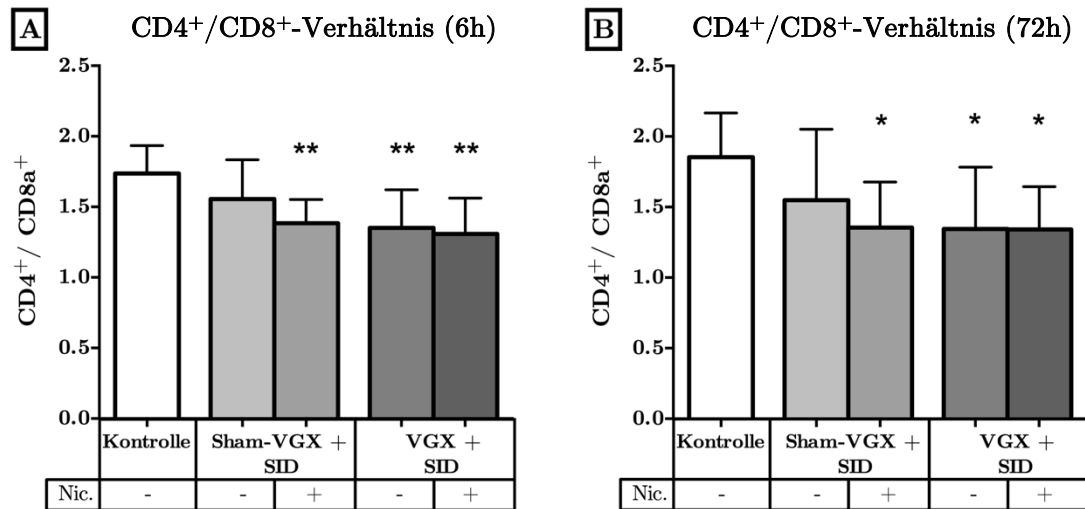
**Abbildung 12: B- und T-Lymphozytenanteile der Milz ändern sich kaum nach operativem Trauma.**

Arithmetisches Mittel und Standardabweichung. Ordinary-One-way-ANOVA mit Sidak's post-Test.

### 4.5.2 Das $CD4^+/CD8^+$ -Verhältnis sinkt in der frühen und späten Phase nach SID ab.

Um eine Aussage über die Leistungsfähigkeit des Immunsystems treffen zu können, wurde der  $CD4/CD8$ -Quotient in der Milz bestimmt. Das Verhältnis von  $CD4^+$ -T-Zellen zu  $CD8^+$ -T-Zellen sinkt bereits nach sechs Stunden (**Abbildung 13A**) von  $1,736 \pm 0.1981$  in der Kontrollgruppe im Vergleich zu fast allen Interventionsgruppen ab. So wurde in der Sham-

VGX + SID-Behandlungsgruppe ein Verhältnis von  $1.556 \pm 0.2768$  (ns) gemessen, in der Sham-VGX + SID + Nic.-Gruppe ein Wert von  $1.384 \pm 0.1684$  ( $p = 0.009$ ), in der VGX + SID-Gruppe ein Wert von  $1.351 \pm 0.2714$  ( $p = 0.005$ ) und in der VGX + SID + Nic.-Gruppe ein Wert von  $1.308 \pm 0.2541$  ( $p = 0.002$ ).



**Abbildung 13: CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>a+</sup>-Verhältnis in der Milz sinkt nach operativem Trauma ab.**

Arithmetisches Mittel und Standardabweichung 6h (A) und 72h (B) nach SID. Ordinary-One-way-ANOVA mit Sidak's post-Test.

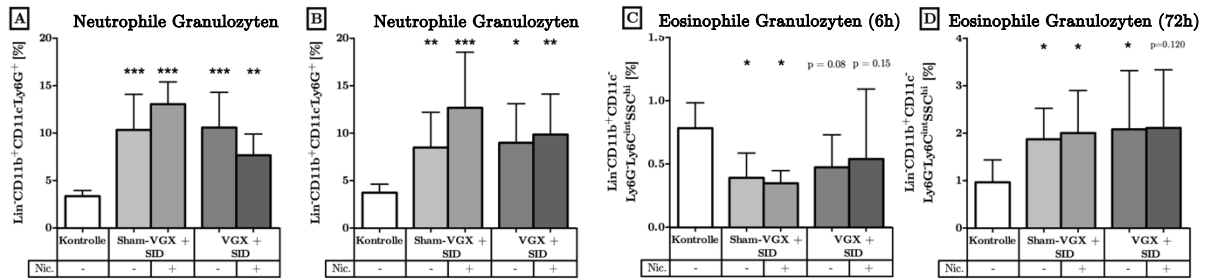
Nach 72 Stunden (**Abbildung 13B**) zeigt sich ein ähnliches Bild: das CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>a+</sup>-Verhältnis sinkt von  $1,853 \pm 0.3136$  in der Kontrollgruppe auf  $1.404 \pm 0.4026$  (Durchschnitt aller Behandlungsgruppen) ab. Auch hier ist die Sham-VGX + SID mit einem Wert von  $1.549 \pm 0.5013$  die einzige Gruppe, deren Wert nicht signifikant niedriger ist als der der Kontrollgruppe ( $p = 0.138$ ).

#### 4.5.3 Deutlich erhöhte Level der neutrophilen Granulozyten in der Milz nach SID

Der Anteil der neutrophilen Granulozyten (Lineage-CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>) verdreifachte sich nach sechs Stunden von  $3.352 \pm 0.5953$  % (Kontrollgruppe) auf durchschnittlich  $10.41 \pm 3.540$  % über alle vier OP-Gruppen. Dabei lag der Anteil in der Sham-VGX + SID + Nic.-Gruppe signifikant höher ( $13.05 \pm 2.348$  %) als in der VGX + SID + Nic.-Gruppe ( $7.662 \pm 2.244$  %;  $p = 0.006$ ).

Nach drei Tagen zeigte sich ein ähnliches Bild: Der Anteil der Neutrophilen war in allen OP-Gruppen signifikant erhöht bei durchschnittlich  $9.980 \pm 4.700$  % (Kontrollgruppe:  $3.736 \pm 0.8977$  %) und damit auf ähnlichem Niveau wie in der frühen Phase nach sechs Stunden. Zwischen den jeweiligen OP-Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

4.5.4 In der Frühphase nach SID verringerter Eosinophilen-Anteil, in der Spätphase erhöht



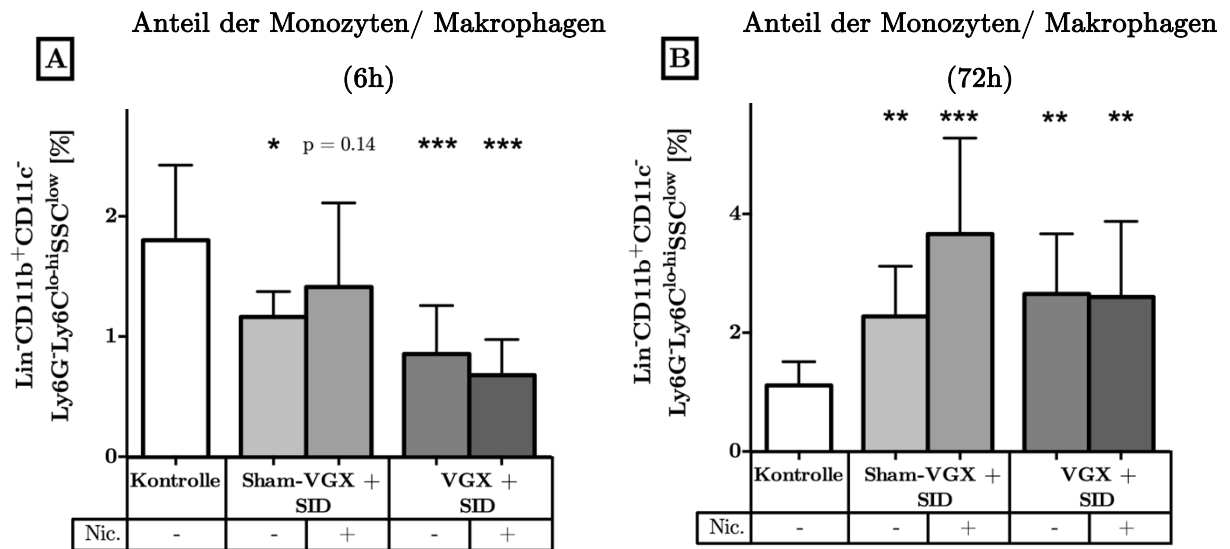
**Abbildung 14: Insbesondere eosinophile Granulozyten der Milz sind initial vermindert, später dann erhöht.** Arithmetisches Mittel und Standardabweichung 6h (A) und 72h (B) nach SID. Ordinary-One-way-ANOVA mit Sidak's post-Test.

Der Anteil der Eosinophilen halbierte sich von  $0.7833 \pm 0.2002$  % (Kontrollgruppe) auf  $0.3911 \pm 0.1950$  % bzw.  $0.3478 \pm 0.0092$  % in den Sham-VGX + SID-Behandlungsgruppen (ohne Nikotin bzw. mit Nikotin;  $p = 0.025$  bzw.  $p = 0.013$ ). In den VGX + SID-Behandlungsgruppen lagen sie mit  $0.4733 \pm 0.2575$  % für die Gruppe ohne Nikotin ( $p = 0.084$ ) und  $0.5389 \pm 0.5538$  % für die Gruppe mit Nikotin ( $p = 0.157$ ) etwas höher als in den Sham-operierten Gruppen.

Nach drei Tagen zeigte sich hingegen ein komplett anderes Bild: Der Anteil der eosinophilen Granulozyten verdoppelte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe auf durchschnittlich  $2.010 \pm 0.9813$  % über alle OP-Gruppen. Allerdings war der Unterschied in der VGX + SID + Nikotin-Behandlungsgruppe aufgrund der großen Varianzen mit  $p = 0.120$  nicht signifikant, alle anderen Gruppen erreichten das Signifikanzniveau.

4.5.5 Anteil der Makrophagen in der Milz nimmt in der Frühphase nach SID ab, in der Spätphase zu

Der Anteil an Monozyten/ Makrophagen (Lineage<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>low-high</sup>SSC<sup>low</sup>) sank sechs Stunden nach SID (**Abbildung 15A**) von  $1.802 \pm 0.6232$  % in der Kontrollgruppe auf durchschnittlich  $1.027 \pm 0.5103$  % über alle vier OP-Gruppen ab. Lediglich



**Abbildung 15: Anteil der Monozyten/Makrophagen nimmt in Frühphase nach Trauma ab, in der Spätphase zu.** Arithmetisches Mittel und Standardabweichung 6h (A) und 72h (B) nach SID. Ordinary-One-way-ANOVA mit Sidak's post-Test.

in der Sham-VGX + SID + Nikotin-Behandlungsgruppe war der Unterschied mit  $p = 0.14$  nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrollgruppe.

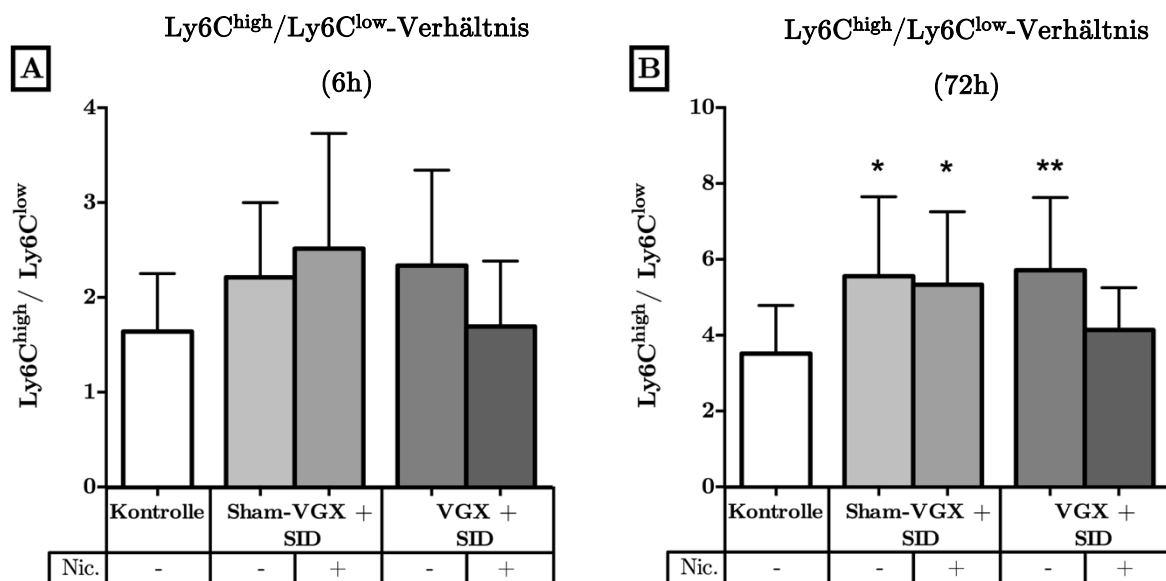
Nach 72 Stunden (**Abbildung 15B**) hat sich der Anteil der Monozyten/ Makrophagen hingegen in allen Gruppen mehr als verdoppelt auf durchschnittliche  $2.795 \pm 1.283$  %. Die Unterschiede waren in allen vier OP-Gruppen signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.



#### 4.5.6 SID führt zu veränderten Verhältnissen von Ly6C<sup>high</sup> zu Ly6C<sup>low</sup>-Makrophagen

Als Maß für die proinflammatorische Differenzierung diente uns das Verhältnis von Ly6C<sup>high</sup> zu Ly6C<sup>low</sup> (d.h. je höher, desto mehr ist das Gleichgewicht in Richtung Proinflammation verschoben). Bei genauerer Betrachtung der Makrophagen-Subpopulationen ließ sich feststellen, dass nach sechs Stunden (**Abbildung 16A**) der Anteil an Ly6C<sup>low</sup>-Makrophagen (Lineage<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>SSC<sup>low</sup>Ly6C<sup>low</sup>) stärker abfiel als der der Ly6C<sup>high</sup>-Makrophagen (Lineage<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>SSC<sup>low</sup>Ly6C<sup>high</sup>), was zu insgesamt erhöhtem Ly6C<sup>high</sup>/Ly6C<sup>low</sup>-Verhältnis nach SID führt. Allerdings waren die Unterschiede zur Kontrollgruppe nicht signifikant.

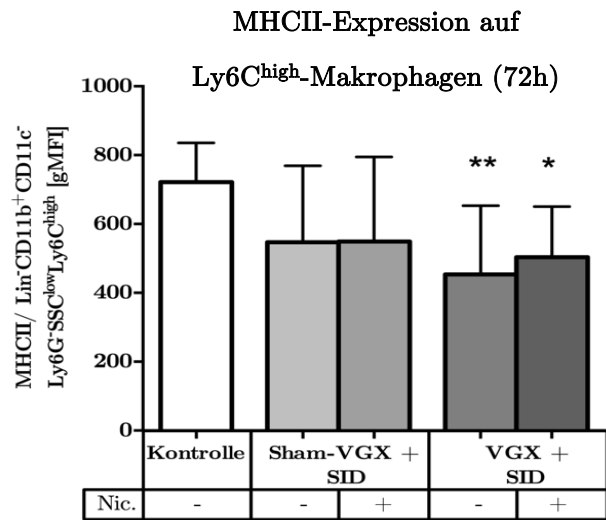
Nach drei Tagen (**Abbildung 16B**) konnte ein stärkerer Anstieg der Ly6C<sup>high</sup>-Makrophagen im Vergleich zu den Ly6C<sup>low</sup>-Makrophagen festgestellt werden, was in drei der vier OP-Gruppen (außer VGX + SID + Nikotin-Behandlungsgruppe) zu signifikant erhöhten Ly6C<sup>high</sup>/Ly6C<sup>low</sup>-Verhältnis geführt hat.



**Abbildung 16: Insbesondere in der späteren Phase nach Trauma nimmt der Anteil Ly6C<sup>high</sup>- gegenüber Ly6C<sup>low</sup>-Makrophagen in der Milz zu.** Arithmetisches Mittel und Standardabweichung 6h (A) und 72h (B) nach SID. Ordinary-One-way-ANOVA mit Sidak's post-Test.

#### 4.5.7 Vagotomie führt in der Spätphase nach SID zu verringerter MHCII-Expression auf Ly6C<sup>high</sup>-Makrophagen

Es konnte ein signifikanter Abfall der MHCII-Expression auf Ly6C<sup>high</sup>-Makrophagen in den beiden Vagotomie-Behandlungsgruppen zum 72h-Zeitpunkt (**Abbildung 17**) gemessen werden. So sank die mittlere Fluoreszenzintensität (gMFI) von  $721.5 \pm 113.9$  in der Kontrollgruppe auf  $453.3 \pm 199.9$  in der VGX + SID-Gruppe ( $p = 0.005$ ) bzw. auf  $503.3 \pm 147.4$  in der VGX + SID + Nikotin-Gruppe ( $p = 0.048$ ). In den Sham-VGX-Gruppen konnte ebenfalls eine verringerte MHCII-Expression gemessen werden, allerdings war diese nicht so ausgeprägt wie in den Vagotomie-Behandlungsgruppen und so wurde das Signifikanzniveau mit  $p = 0.12$  bzw.  $p = 0.14$  verfehlt. Zwischen Vagotomie und Sham-Vagotomie wurde in der 2-way-ANOVA ebenfalls mit  $p = 0.28$  das Signifikanzniveau verfehlt. In der Frühphase zum 6-Stunden-Zeitpunkt waren noch keine signifikanten Unterschiede messbar (Daten nicht dargestellt).

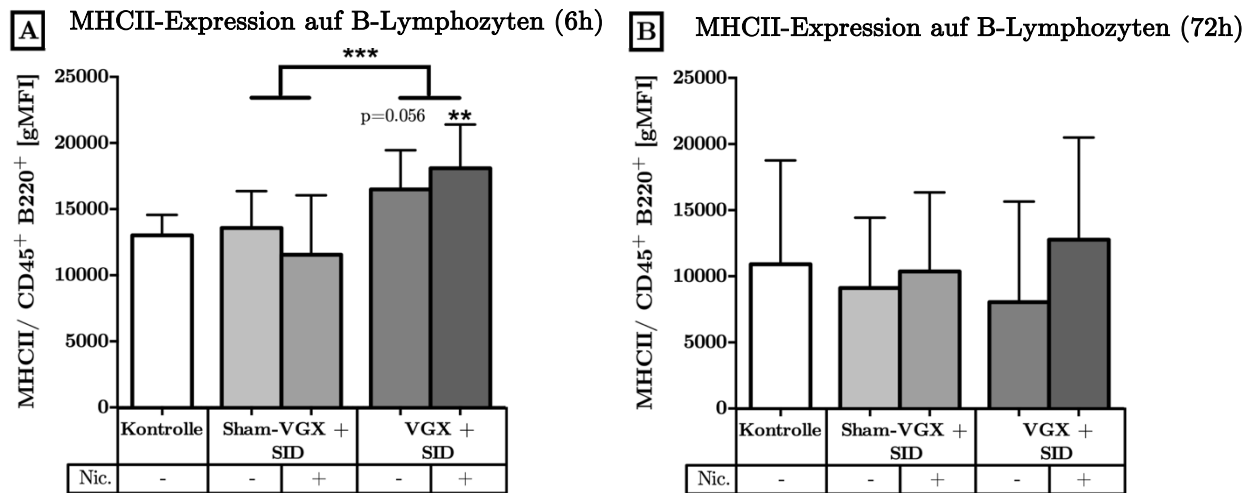


**Abbildung 17:** Vagotomierte Mäuse zeigen spät nach Operation eine verringerte MHCII-Expression auf Ly6C<sup>high</sup>-Makrophagen. Arithmetisches Mittel und Standardabweichung. Ordinary-One-way-ANOVA mit Sidak's post-Test.

#### 4.5.8 B-Lymphozyten zeigen unter Vagotomie in der Frühphase nach SID eine erhöhte MHCII-Expression

Zum 6h-Zeitpunkt (**Abbildung 18A**) konnte ein Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität von MHCII auf B-Lymphozyten in den Vagotomie-Behandlungsgruppen gemessen werden. Sie stieg von  $13011 \pm 1548$  in der Kontrollgruppe auf  $16498 \pm 2960$  ( $p = 0.056$ ) bzw.  $18097 \pm 3300$  ( $p = 0.003$ ) in den beiden Vagotomie-Behandlungsgruppen. In den Sham-operierten Gruppen blieb sie dagegen auf dem Niveau der Kontrollgruppe mit  $13581 \pm 2781$  bzw.  $11545 \pm 4499$ . In der 2-way-ANOVA ergab sich ein signifikanter Unterschied von  $p < 0.001$  in Bezug auf die Vagotomie-Intervention.

Nach 72 Stunden (**Abbildung 18B**) waren hingegen keine Unterschiede bezüglich der MHCII-Expression auf B-Lymphozyten messbar.



**Abbildung 18: Kurz nach Operation zeigen vagotomierte Mäuse erhöhte MHCII-Expressionen auf B-Lymphozyten.** Arithmetisches Mittel und Standardabweichung der gMFI 6h (A) und 72h (B) nach SID. Ordinary one-way-ANOVA mit Sidak's-post-Test. Gruppenvergleich mit Ordinary 2-way-ANOVA.

## 5 Diskussion

Dem Immunsystem kommt in der postoperativen Phase eine immense Bedeutung zu und in der vulnerablen Phase nach einer Operation laufen komplexe und bis heute nicht vollständig verstandene Mechanismen ab. Dabei kommt den Zytokinen als Botenstoffen eine herausragende Bedeutung zu. Auch wenn es nach heutigem Stand der Wissenschaft keine reinen pro- und antiinflammatorischen Zytokine gibt, so hat es sich aus historischer Betrachtung her ergeben, Zytokine dennoch nach ihrer *vorwiegenden* Wirkung als eher pro- oder antiinflammatorisch einzustufen. Auch wird zur Vereinfachung bis heute vom angeborenen und adaptiven Immunsystem gesprochen, mit dem Wissen, dass dies natürlich nicht zwei nebeneinander existente Immunsysteme sind, sondern viel mehr lernen wir gerade heute viel genauer die Interaktionen zwischen dem „älteren“ angeborenen und „neuerem“ adaptiven Immunsystem zu verstehen.

### *5.1 Das Immunsystem in der Früh- und Spätphase nach operativem Trauma*

In der Frühphase nach operativem Trauma zeigt das Modell der postoperativen Immundysfunktion (SID) eine deutliche Proinflammation. So konnten eindrucksvoll die stark erhöhten Konzentrationen des typischerweise pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-6 nachgewiesen werden. Dass es postoperativ zu signifikant erhöhten Plasmaspiegeln von IL-6 kommt, konnte bereits in unserer Arbeitsgruppe, aber auch von anderen Gruppen gezeigt werden und wird somit durch diese Arbeit bestätigt [26,93]. IL-6 wird dabei in der Frühphase von Zellen des Immunsystems, vornehmlich Makrophagen, aber auch Endothelzellen und Fibroblasten produziert, unabhängig vom cholinergen antiinflammatorischen Signalweg [94,95]. Allerdings sei angemerkt, dass die IL-6-Plasmaspiegel durch ihre kurze Halbwertszeit von nur wenigen Minuten und die pulsatile Freisetzung sehr variabel ausgestaltet sein können [94,96]. Es ist eines der Leitzytokine des angeborenen, unspezifischen Immunsystems und deshalb für die frühe Pathogenabwehr von entscheidender Bedeutung [97,98]. Besonders ist sicherlich, dass IL-6 neben Zellen des Immunsystems auch von Nicht-Immunzellen wie normalen Stromazellen produziert wird, welche auf einen Reiz wie einem operativen Trauma dann mit der IL-6-Produktion beginnen [97]. Auffällig war der Abfall um ca. 99% in den Behandlungsgruppen nach 72h im Vergleich zu 6h nach Trauma, trotz der geringen Halbwertszeit von nur wenigen Minuten waren die IL-6-Konzentration noch um das 5-10-fache im Vergleich zur unbehandelten

Kontrollgruppe erhöht, womöglich weil sich die Reaktion in gewisser Weise selbst unterhält, da der Schaden im Gewebe ja entstanden ist und die Zellen weiterhin IL-6 produzieren. Es konnten a.e. aufgrund der geringen Halbwertszeit und der damit verbundenen Schwankungsbreite innerhalb der Behandlungsgruppen zu keinem der Zeitpunkte signifikante Unterschiede aufgezeigt werden.

Korrelierend dazu wurden in der Frühphase niedrigere Konzentrationen des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin-10 in den Zellüberständen gemessen. IL-10 wird von einer Reihe von Zellen produziert, so zum Beispiel vom Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen oder CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, was dann aktivierte Makrophagen inhibiert [99]. In Zellkulturstudien konnte eindeutig gezeigt werden, dass IL-10 alleine zu einer über 10-fach erhöhten mRNA-Transkription des alpha7-Rezeptors führt [100]. IL-10 wirkte in der von *Li et al.* durchgeführten Studie sogar als stärkerer Stimulus als LPS [100]. In den Vagotomie-Gruppen fanden sich zu beiden Zeitpunkten nach operativem Trauma signifikant erniedrigte IL-10-Spiegel. Die Ergebnisse korrelieren mit denen, die *Kornegae et al.* in ihren Studien beschrieben haben: dort fanden sich nach in-vivo-LPS-Gaben (allerdings nach 90min und im Blutplasma) in vagotomierten Tieren signifikant erniedrigte IL-10-Spiegel [101]. Allerdings muss relativierend ergänzt werden, dass durch Vagotomie die IL-10-Spiegel lediglich wieder auf ihr Ausgangsniveau (so wie in der gänzlich unbehandelten Kontroll-Gruppe) zurückfallen. Die Gabe von Nikotin führt in der Spätphase nach operativem Trauma in allen Behandlungsgruppen zu tendenziell geringeren IL-10-Spiegeln in den Zellüberständen der Splenozyten. An dieser Stelle sei bereits darauf verwiesen, dass sich insgesamt wenig Effekte des Nikotins gezeigt haben, mögliche Gründe werden im Folgenden diskutiert. Möglich sind die pleiotropen Effekte des unspezifischen Agonisten, der ja neben den  $\alpha_7$ -Rezeptor noch alle anderen nikotinischen Rezeptoren besetzt und somit aktiviert oder inhibiert. Auch wenn bereits dargelegt wurde, dass die anderen (nicht alpha7) Rezeptoren eine eher untergeordnete Rolle im cholinergen antiinflammatorischen Signalweg spielen, so wäre es nichtsdestotrotz interessant, in Folgeversuchen spezifische Agonisten wie AR-17779 oder GTS-21 zu verwenden wie es auch andere Arbeitsgruppen bereits erfolgreich tun [40,58,102].

In der Frühphase deutet sich bereits eine nachhaltige Beeinträchtigung des adaptiven Immunsystems an: so wurde tendenziell weniger IL-2 ausgeschüttet. IL-2, auch T-Zell-Growth-Faktor genannt, wird vor allem von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen produziert und ist das Schlüssel-Zytokin

für die T-Zellen und somit besonders wichtig für das adaptive Immunsystem [103]. Womöglich wurde der verringerte IL-2-Spiegel auch dadurch verursacht, dass wir in der Frühphase niedrigere CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Quotienten in der Milz nachweisen konnten, somit also auch niedrigere Level an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen vorlagen.

Als prominentestes Beispiel für das angeborene Immunsystem in der Frühphase konnten wir deutlich erhöhte neutrophile Granulozyten in der Milz messen, was auch Huston et al. in ihren ähnlich gelagerten Versuchen zeigen konnten, auch wenn hier bereits nach 5 Stunden ausgewertet wurde und ein anderes OP-Trauma vorlag [104]. Neutrophile Granulozyten nehmen nach SID ebenfalls hochsignifikant zu, was wenig überraschend ist, da diese unspezifisch als Zellen des angeborenen Immunsystems zum Ort der lokalen Entzündung (dem Darm) wandern. Durch die bei Trauma freigesetzten DAMPs werden hierbei die Neutrophilen angelockt und infiltrieren dann zunächst lokal den Ort des Traumas im Sinne einer sterilen Entzündung, wie dies unter anderem unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen konnte [28,105,106]. Über die Blutbahn erreichen diese dann auch die Milz, wo wir sie messen konnten, auch dies konnte für eine noch spätere Phase von 5 Tagen bereits in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, womit diese Ergebnisse die aus vorherigen Projekten weiter untermauern [28].

Interessante neue Aspekte bietet zudem die Betrachtung der eosinophilen Granulozyten. Eosinophile Granulozyten sind jahrelang in der Forschung primär mit Allergierkrankungen in Verbindung gebracht und deshalb vor allem auf Grundlage dieser Krankheitsbilder untersucht worden. In letzter Zeit deutet sich hier in der Forschungsgemeinschaft ein kleiner Wandel an und es wird langsam die Rolle der Eosinophilen im Rahmen von Infektionserkrankungen oder Immunsuppression untersucht. Eosinophilen kommt hierbei eine besondere Rolle zu, da sie direkt in der Mukosa resident sind und über verschiedene Signalwege direkten Einfluss auf die Durchlässigkeit der Mukosa-Barriere (sozusagen der ersten Hürde des angeborenen Immunsystems) nehmen können, andererseits aber auch durch Beeinflussung der Th1- und Th2-Zellen eine wichtige Rolle für das adaptive Immunsystem spielen [107]. Außerdem wurde gezeigt, dass diese auch entscheidend für die Abwehr von Virus-Erkrankungen sind, in der zitierten Arbeit namentlich Influenza-A-Virus [108]. Wir konnten in unserer Arbeit in der Frühphase nach operativem Trauma eine deutliche Verminderung des Anteils an Eosinophilen nachweisen, was doch für eine entscheidende Beeinflussung des Immunsystems spricht, vor allem im Rahmen der angeborenen Immunabwehr zur Aufrechterhaltung der natürlichen

Mukosa-Barriere. Makrophagen (bzw. in der Milz Monozyten), als ebenso klassische Vertreter des angeborenen Immunsystems, zeigten ebenso reduzierte Anteile in der Frühphase nach SID. Diese Antigen-präsentierenden Zellen sind auch für das adaptive Immunsystem wichtig, wo ihnen dem angeborenen Immunsystem als sofort zur Verfügung stehende Abwehr eine große Bedeutung zu kommen. Insgesamt wird in der Frühphase der „Grundstein“ für eine nachhaltige Beeinflussung des adaptiven Immunsystems gelegt, dem in der Spätphase eine größere Bedeutung zukommen soll.

## *5.2 Vagotomie beeinflusst in der Frühphase der Immunantwort nach operativem Trauma sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem*

IFN- $\gamma$  ist ein wichtiges Zytokin des angeborenen Immunsystems [109], welches Leukozyten anlockt und Wachstum, Reifung und Differenzierung vieler anderer Zellreihen fördert und die NK-Zellaktivität verstärkt und B-Zellen zur Bildung von Immunglobulinen anregt [110–114]. So konnten im Serum in der frühen postoperativen Phase tendenziell niedrigere, später dann eher erhöhte IFN- $\gamma$ -Spiegel gemessen werden, was auf eine initial frühe Immundepression des angeborenen Immunsystems nach OP hindeutet.

IL-2 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches vorwiegend von aktivierten Th1-Zellen (CD4<sup>+</sup>) produziert wird und dabei wiederum andere T-Lymphozyten, vorwiegend regulatorische T-Lymphozyten (Tregs) aktiviert, welche die Autoimmunität limitieren indem sie T-Effektorzellen supprimieren, somit kommt diesem Interleukin in der adaptiven Immunantwort eine herausragende Bedeutung zu [115–117].

Die bereits im ersten Abschnitt beschriebene IL-2-Supprimierung in der Frühphase wurde durch die Vagotomie signifikant verstärkt. Da IL-2 die zentrale Rolle in der T-Zell-Antwort zukommt, spricht dies für eine supprimierende Beeinflussung des Immunsystems durch die Vagotomie. So konnten interessanterweise im Menschen nach Polytrauma signifikant erhöhte Interleukin-Spiegel gemessen werden, wenn diese ein gutes Outcome aufwiesen und überlebten, niedrige Interleukin-Spiegel waren also mit einem schlechten Outcome vergesellschaftet [118]. Der Effekt ließ sich allerdings nicht durch die Gabe von Nikotin rückgängig machen. Beeindruckenderweise zeigte sich der Einfluss der Vagotomie nicht nur im Serum-Interleukin-

2, sondern auch in den Konzentrationen in den Zellüberständen der Splenozyten sowie nach LPS-Stimulation und somit konnte die Beeinflussung der T-Zell-Antwort auf mehreren Ebenen demonstriert werden. Dass sich der Effekt der Vagotomie nicht durch Agonisten wie Nikotin hier rückgängig machen ließ, konnten andere Arbeitsgruppen mit spezifischen Agonisten wie GTS-21 ebenso nachvollziehen und man geht deshalb davon aus, dass der alpha7-Rezeptor im IL-2-Signalweg keine Rolle spielt, sondern dies durch übergeordnete Kaskaden im Signalweg erfolgt [119].

Die Durchführung einer Vagotomie führte in der Frühphase nach Operation in den Zellüberständen zu signifikant niedrigeren Spiegeln an TNF- $\alpha$  im Vergleich zu Sham-Vagotomie, sodass es zwischen gänzlich un behandelter Kontroll-Gruppe und Vagotomie + SID keine signifikanten Unterschiede mehr gab. Diese Daten ergänzen frühere Projekte unserer Arbeitsgruppe, wo sich nach SID (ohne vorhergehende Sham-Vagotomie wohl gemerkt) eine niedrigere TNF- $\alpha$ -Konzentration zeigte [26].

Auf eine definierte Anzahl Makrophagen bezogen, zeigt sich aber eine deutlich *gesteigerte* TNF- $\alpha$ -Ausschüttung in vagotomierten Tieren in der Frühphase nach SID, d.h. eine deutliche Proinflammation, was die von *Borovikova et al* aufgestellte These unterstützt, dass der N. vagus umgekehrt eine dämpfende, d.h. protektive Wirkung auf die systemische inflammatorische Antwort hat und eine Ausschaltung des N. vagus diese rückgängig macht [34]. Da TNF- $\alpha$  als von Makrophagen sezerniertem Zytokin eher dem angeborenen Teil des Immunsystems zugerechnet wird, lässt sich feststellen, dass die Vagotomie in der Frühphase im Bereich des angeborenen Immunsystems zu einer tendenziell überschießenden Antwort (Hyperinflammation) führt.

### *5.3 Vagotomie verstärkt die Immunsuppression in der Spätphase der Immunantwort nach operativem Trauma*

Das CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnis hat sowohl in der Früh- als auch der Spätphase nach Trauma relativ unabhängig von Vagotomie- und Nikotin-Behandlung abgenommen, was insgesamt für eine Immunsuppression durch das OP-Trauma spricht. Des Weiteren ist bereits seit längerem bekannt, dass dem CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Quotienten eine prognostische Bedeutung beikommt. So korrelierten niedrige Quotienten mit einem schlechteren Outcome in Beobachtungsstudien 1993

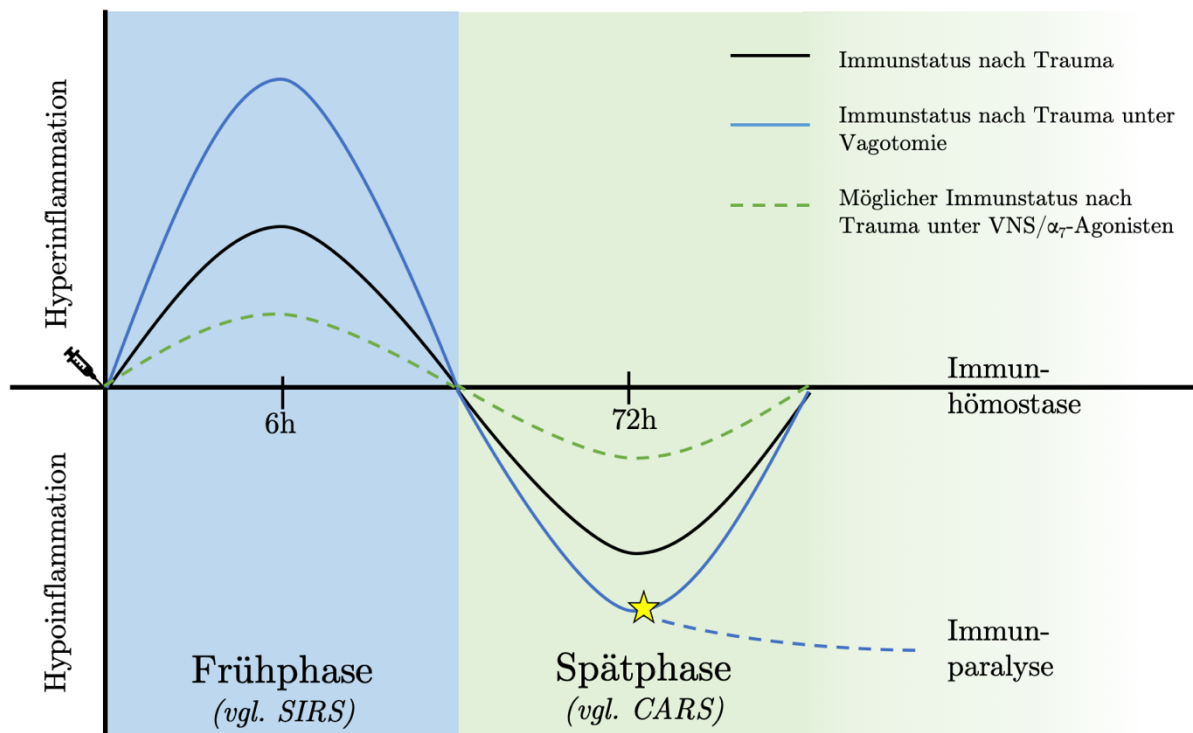


an menschlichen Verbrennungsopfern [120]. Aber auch in einem Ileus-Modell, welchem dem der SID sehr ähnlich ist (dort wurde eine einmalige Manipulation des Intestinums durchgeführt), zeigten sich postoperativ signifikant erniedrigte  $CD4^+/CD8^+$ -Quotienten [121].

Eine verringerte MHCII-Oberflächenexpression auf  $Ly6C^{high}$ -Makrophagen nach Vagotomie, weniger bei Sham-vagotomierten Mäusen, zeigt, dass womöglich weniger Antigene den ohnehin verminderten  $CD4^+$ -Zellen präsentiert werden können, was auch für eine suppressive Beeinflussung des adaptiven Immunsystems spricht. Es konnte bisher auch von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass im Menschen die HLA-DR-Expression (als humanes Korrelat für MHCII) auf im Blut zirkulierenden Monozyten nach (großen) Operation signifikant abnimmt [12,122]. Dies ist insofern relevant, weil es seit langem bekannt ist, dass der HLA-DR-Status ein Prädiktor für das Auftreten von postoperativen Infektionen, Sepsis und Mortalität ist [123–125]. Hier konnte nun zum ersten Mal im Mausmodell gezeigt werden, dass eine Vagotomie die Reduktion der MHCII-Expression nach Trauma womöglich noch verstärkt (mit  $p = 0.12$  bzw.  $p = 0.14$  war die Reduktion in den Sham-Vagotomie-Gruppen nicht signifikant). Auch hier finden sich also Hinweise darauf, dass der N. vagus eine insgesamt anti-inflammatorische (d.h. immunprotektive) Wirkung hat, da wir nach Vagotomie ja eine verringerte MHCII-Expression auf  $Ly6C^{high}$ -Makrophagen zeigen konnten, was wie oben beschrieben mit einem schlechteren Outcome vergesellschaftet ist.

#### 5.4 Gesamtkontext und modellhafter Verlauf des Immunstatus

Im Jahr 1992 und 1996 wurden die Begriffe des *Systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) und des *Compensatory anti-inflammatory response syndrome* (CARS) eingeführt [126,127]. Dies geht modellhaft von einem zweiphasigen Verlauf der *Sepsis* aus: eine hyperinflammatorische Frühphase (Stunden bis wenige Tage) mit einem Zytokinsturm an proinflammatorischen Zytokinen (Leitzytokin: TNF- $\alpha$ ) folgt eine regulatorische antiinflammatorische Gegenreaktion mit einer verminderten (d.h. unter Ausgangsniveau) Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, die die Immunhomöostase wiederherstellen soll [20,128] (siehe Abb. 19). Nun handelt es sich in unserem Modell nicht um ein Sepsis-Modell, sondern um ein aseptisches Traumamodell. Die Daten der adjustierten TNF- $\alpha$ -Ausschüttung



**Abbildung 19: Modell zum Immunstatus nach aseptischem Trauma am Beispiel der SID (schwarze Linie).**

Vagotomie verstärkt diese insbesondere in der Frühphase, aber auch in der Spätphase (blaue Linie) und macht den Organismus vulnerabler für eine Infektion (gelber Stern) mit nachfolgender potenziell tödlicher Immunparalyse. Hypothetischer Verlauf unter Vagus-Nerv-Stimulation oder  $\alpha_7$ -Agonisten, welcher protektiv auf den postoperativen Immunstatus wäre. Angelehnt an das SIRS-CARS-Modell und modifiziert nach Bone et al. [126]

auf die LPS-Stimulation zeigen aber, dass der Ablauf der Immunreaktion nach aseptischem Trauma dem der Sepsis im SIRS-CARS-Modell gleicht. So konnten wir in der Frühphase erhöhte Werte des proinflammatorischen TNF- $\alpha$  messen, nach 72h hingegen die erniedrigten Werte. Zum ersten Mal konnten wir somit zeigen, dass im aseptischen

Immunsuppressionsmodell die Immunantwort anhand des proinflammatorischen Leitzytokins TNF- $\alpha$  ähnlich nach dem SIRS-CARS-Modell abläuft. Nun ist ein Modell ja auch immer eine gewisse vereinfachte Darstellung eines Sachverhaltes. So könnte es als Einschränkung gelten, dass wir diesen modellhaften Verlauf z.B. nicht mit dem anderen wichtigen proinflammatorischen Zytokin IL-6 nachstellen konnten, allerdings ist zu TNF- $\alpha$  die Datenlage am größten und das SIRS-CARS-Modell der Sepsis fußt auf Zytokin-Ebene im Wesentlichen auf Daten zu TNF- $\alpha$ .

Des Weiteren konnte erstmalig demonstriert werden, dass der N. vagus insbesondere auf die Frühphase der Immunantwort (vgl. SIRS-Phase in der Sepsis) eine protektive Wirkung zu haben scheint, die Vagotomie führte nämlich zu einer überschießenden Immunantwort (Hyperinflammation). Auf die Spätphase (vgl. CARS-Phase der Sepsis) scheint der N. vagus eher geringeren Einfluss zu haben, womöglich weil hier bereits die Einflüsse des adaptiven Immunsystems eine größere Rolle spielen. Dass der N. vagus in der *Sepsis* zumindest in der Frühphase einen protektiven Einfluss hat (d.h. eine überschießende Immunantwort verhindert) konnten Borovikova et al. in einer hochrangig publizierten Veröffentlichung anhand von Daten zur TNF- $\alpha$ -Ausschüttung von Makrophagen zeigen [34]. Uns ist es somit gelungen, die Ergebnisse aus Sepsis-Daten mit denen der postoperativen Immunsuppression in Bezug zu setzen. Zudem konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine Vagotomie nicht nur in der Frühphase schädliche Effekte (durch ein Überschießen der Immunantwort) hat, sondern auch in der Spätphase (vgl. CARS in der Sepsis) durch eine überschießende Suppression der kompensatorischen Immunantwort. Unterstützt wird diese Theorie auch durch die gezeigten Daten, dass in der Frühphase eine erhöhte MHCII-Rezeptor-Dichte auf B-Zellen zu finden ist, wohingegen sie in der Spätphase dann wieder abfällt. Die Vagotomie bringt bildhaft gesprochen das Pendel in beide Richtungen verstärkt zum Schwingen, was in einem System, das auf einem steten Gleichgewicht zwischen Pro- und Antiinflammation beruht, dann seine schädlichen Wirkungen entfaltet. Insbesondere die Daten zu Interleukin-2 zeigten in der Frühphase eine deutliche Supprimierung der T-Zell-Antwort, da in der Frühphase nach Trauma allerdings das adaptive Immunsystem eine eher untergeordnete Rolle spielt, ist dennoch von einer deutlichen Proinflammation in der Gesamtbetrachtung der Immunabwehr auszugehen. In der Spätphase persistiert diese supprimierte T-Zell-Antwort weiterhin, wenn auch nicht so stark wie zum frühen Zeitpunkt, was dann die Hypoinflammation weiter verstärkt.

Wir konnten ebenfalls zeigen, dass nach SID-Operation insbesondere in der Spätphase es zu einer Erhöhung des Ly6C<sup>high</sup>/Ly6C<sup>low</sup>-Verhältnisses in der Milz kommt. Die genaue Bedeutung dieser Reaktion ist unklar. Entscheidend für das Verständnis ist zu wissen, dass es sich hierbei nicht um strikt getrennte Populationen handelt, sondern die Ly6C<sup>high</sup> sich zu Ly6C<sup>low</sup>-Makrophagen konvertieren könne, sog. *patrolling macrophages* (engl.) [129]. Diese scheinen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen zu spielen, wo diese Reaktion regelhaft im Blut als auch am Ort der Infektion auftritt [130,131]. Das erhöhte Verhältnis, d.h. es gibt prozentual weniger Ly6C<sup>low</sup> Makrophagen, kann nun als eine Art von Immunsuppression interpretiert werden, da ja, falls es zur Infektion kommt, weniger *patrolling macrophages* zur Verfügung stehen. Allerdings sind hierzu noch weitere Untersuchungen notwendig, da in unserem Fall die Gesamtzahl der Makrophagen (d.h. Ly6C<sup>high</sup> und Ly6C<sup>low</sup>) 72h nach SID zugenommen hat, nur hat die Zahl der Ly6C<sup>high</sup> eben stärker zugenommen als die der Ly6C<sup>low</sup>. Wenn es immunoprotektiv allerdings zu einer verstärkten Konversion zu Ly6C<sup>low</sup> gekommen wäre, hätte ich auch hier eher ein verkleinertes (anstatt ein vergrößertes) Verhältnis erwartet. Die detaillierte Untersuchung dieses Sachverhaltes bietet jedenfalls noch großen Raum für weitere experimentelle Forschung.

Es konnten sehr gut die Effekte des N. Vagus dargestellt werden, allerdings bleibt die genaue Signalkaskade weiter unbekannt. Es könnte sich also nach wie vor um Effekte handeln, die primär durch die Afferenzen (der N. vagus führt zu 90 % afferente Fasern) hervorgerufen werden, als auch durch Effekte primär des Endastes, der zur Milz zieht und dort auf die ChAT<sup>+</sup>-T-Zellen umschaltet. Denkbar sind auch Effekte, die primär durch die (unerwünschten) Nebenwirkungen wie die Pylorusstenose hervorgerufen werden. Somit wären zur genaueren Untersuchung Versuche notwendig, in denen eine möglichst selektive Durchtrennung der Fasern des N. vagus entlang der Milzgefäße durchgeführt wird, um eben die oben genannten unerwünschten Effekte zu vermeiden.

Interessant wäre in zukünftigen Projekten zu untersuchen, welche Auswirkung der N. vagus auf das Überleben nach SID in Kombination mit Sepsis hat, auch um das postulierte Modell mit Mortalitätsdaten zu untermauern. Hierzu verfügen wir mit der CLP (engl. *cecal ligation puncture*), CASP (engl. *colon ascendens stent peritonitis*) oder i.p. E-coli-Injektionen über geeignete Modelle in unserer Arbeitsgruppe. Interessant wäre hierbei, ob selektive Agonisten oder eine Vagus-Nerv-Stimulation zu einem besseren Überleben beim Auftreten einer postoperativen Sepsis führen könnten.

## 6 Zusammenfassung

Die postoperative Immunsuppression ist ein häufiges Problem nach großen abdominalchirurgischen Eingriffen und geht mit einer erhöhten Mortalität insbesondere durch septische Komplikationen einher. Eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Immunsuppression spielt der Nervus vagus, dies ist schon lange als cholinerg antiinflammatorischer Signalweg (engl. *CAP*) bekannt, wobei weder die Signalkaskaden auf zellulärer Ebene noch die Effekte des Nervus vagus hinreichend verstanden sind und kontrovers diskutiert werden.

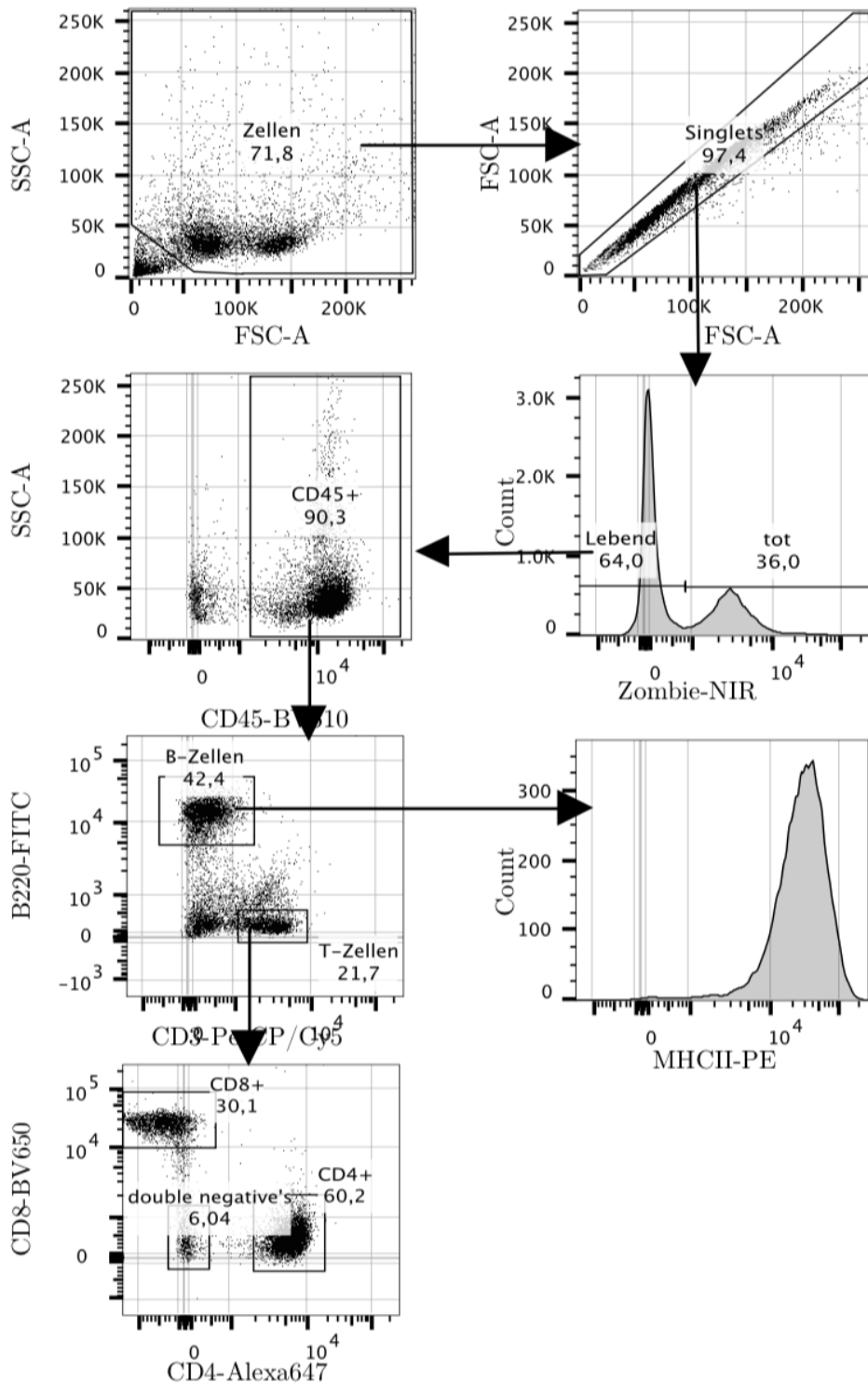
Anhand der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich feststellen, dass das Traumamodell der *surgically-induced immune dysfunction* (SID) weitreichende Auswirkungen auf das Immunsystem hat. So konnten in-vivo signifikant veränderte Serumspiegel von IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-6 gemessen und somit vorherige Ergebnisse anderer Arbeiten unserer Forschungsabteilung bestätigt werden. Außerdem führte die SID zu deutlichen Veränderungen hinsichtlich der Abwehrlage des angeborenen Immunsystems: wir fanden erniedrigte CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Relationen innerhalb der T-Zell-Population sowie insbesondere in der Spätphase ein erhöhtes Ly6C<sup>high</sup>/Ly6C<sup>low</sup>-Verhältnis als Ausdruck einer gestörten angeborenen Immunabwehr durch *patrolling macrophages*, welche sich zusätzlich durch eine Abnahme der MHCII-Expression auf den Makrophagen unter Vagotomie äußerte.

Bei der ex-vivo-Betrachtung des Immunsystems unter Hinzunahme von Funktionstests mit Lipopolysaccharid (LPS) konnten wir beobachten, dass der Ablauf der Immunreaktion anhand der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung von Makrophagen interessante Ähnlichkeiten mit dem bekannten SIRS-CARS-Modell der Sepsis aufweist. Wir konnten zeigen, dass die Vagotomie insbesondere in der Frühphase nach SID die hyperinflammatorische Reaktion der Milzmakrophagen noch weiter verstärkt. In der Spätphase 72 Stunden nach Trauma hat die Vagotomie einen geringeren Einfluss auf die Immunantwort und führt zu einer verstärkten Suppression, die allerdings nicht so stark ausgeprägt ist wie die Hyperinflammation in der Frühphase. Die Ausschaltung des N. vagus führt also in beiden Phasen zu einer Abweichung zu den Extremen hin und bedingt eine nachhaltige Störung des immunologischen Gleichgewichts.

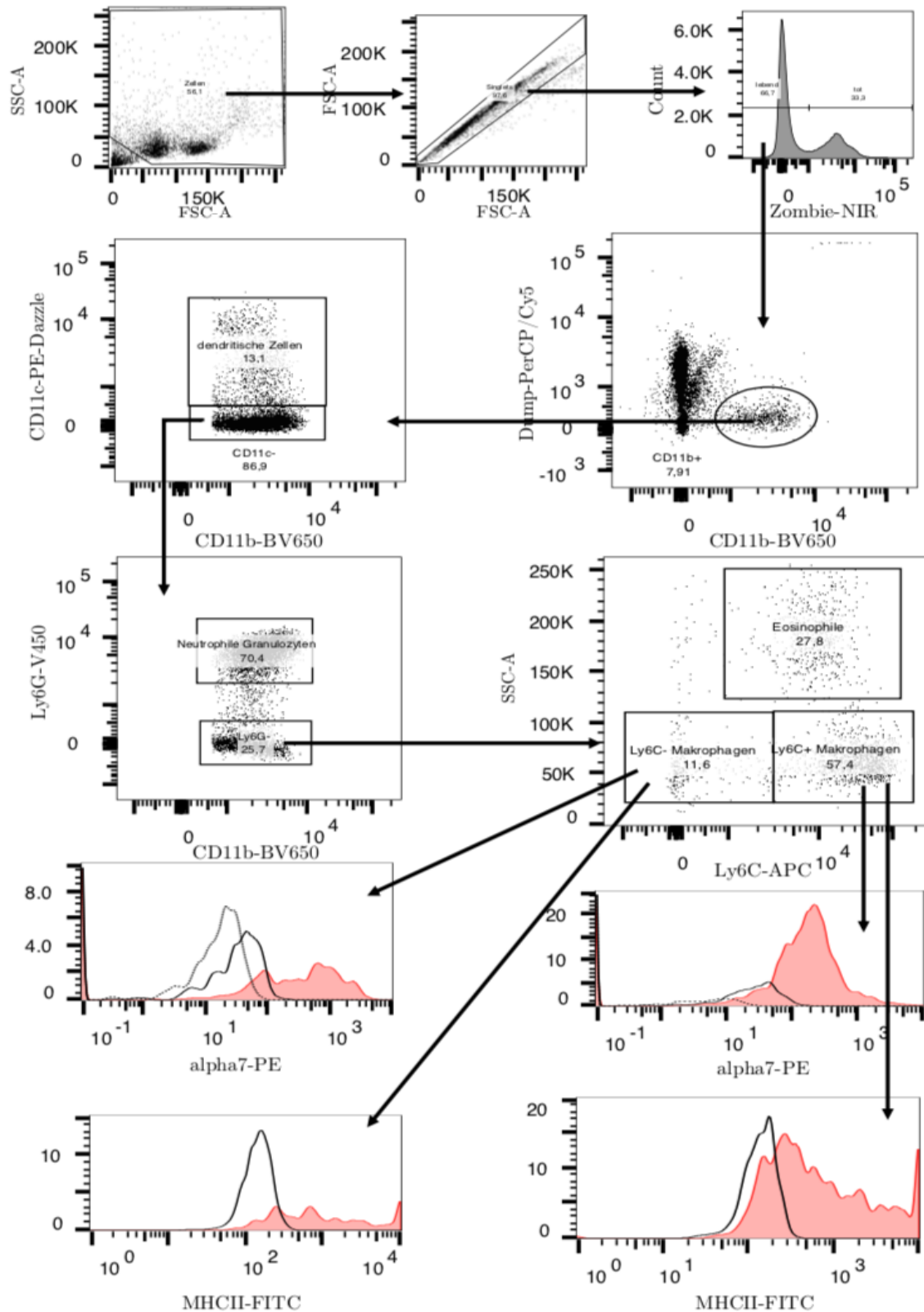
Mit der vorliegenden Arbeit konnte ein wichtiger Beitrag zur Grundlagenforschung dieses klinisch so bedeutsamen Problems geleistet werden. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind notwendig, um in Zukunft nach operativem Trauma z.B. in Form von spezifischen

Agonisten am  $\alpha_7$ -Rezeptor eine wirksame Therapie oder besser eine Prophylaxe zur Vermeidung anbieten zu können.

## 7 Anhang



**Abbildung 20:** Gating-Strategie zu Panel 1. Zunächst über SSC-A/FSC-A Debris-Ausschluss, anschließend Doubletten-Ausschluss über FSC-H/FSC-A. Über Zombie-NIR erfolgte der Lebendeinschluss (Zombie-NIR-). Weiteres Gating über CD45+. Darstellung der B-Lymphozyten über B220-FITC<sup>+</sup>/CD3-PerCP/Cy5.5. Darstellung der T-Lymphozyten über CD3-PerCP/Cy5.5<sup>+</sup>/B220-FITC<sup>-</sup>. Weitere Subklassifizierung in CD4-Zellen (CD3-PerCP/Cy5.5<sup>+</sup>/CD4-Alexa647<sup>+</sup>) und CD8-Zellen (CD3-PerCP/Cy5.5<sup>+</sup>/CD8-BV650<sup>+</sup>). MHCII-Expression auf B-Lymphozyten als B220-FITC<sup>+</sup>/gMFI [MHCII-PE]. Details zu den Antikörpern siehe Seite 61f.



**Abbildung 21:** Gating-Strategie zu Panel 2. Zunächst über SSC-A/FSC-A Debris-Ausschluss, anschließend Doubletten-Ausschluss über FSC-H/FSC-A. Über Zombie-NIR erfolgte der Lebendeinschluss (Zombie-NIR-). Ausschluss von B-/T-/NK-Zellen über einen PerCP/Cy5.5-dump-channel und einschluss CD11b<sup>+</sup>-Zellen. Im nächsten Schritt Ausschluss CD11c<sup>+</sup>-dendritischer Zellen und Ausschluss Ly6G<sup>+</sup>-Neutrophiler Granulozyten. Definition der 3 folgenden Populationen über SSC<sup>low</sup>/Ly6C-APC<sup>high</sup> und SSC<sup>low</sup>/Ly6C-APC<sup>low</sup> sowie der Eosinophilen über SSC<sup>high</sup>/Ly6C-APC<sup>int</sup>. gMFI-Signale von alpha7-PE sowie MHCII-FITC, hinterlegt mit FMO (Fluorescence minus one)-Kontrollen (durchgezogene Linien). Details zu den Antikörpern siehe Seite 61f.



## Antikörper

Antigen-Spezies	Antigen	Farbstoff	Isotyp	Klon	Konzentration	Referenz-No	Antikörper-ID (RRID)*	Hersteller
anti-mouse	CD16/32	purified	rat IgG2a, $\lambda$	92	500 $\mu$ g/mL	101302	AB_312801	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-mouse	CD3	PerCP/Cy5.5	hamster IgG1, $\chi$	145-2C11	200 $\mu$ g/mL	100328	AB_893318	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-mouse	CD19	PerCP/Cy5.5	rat IgG2,a, $\chi$	6D5	200 $\mu$ g/mL	115533	AB_2259869	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-mouse	NK-1.1	PerCP/Cy5.5	mouse IgG2,a, $\chi$	PK136	200 $\mu$ g/mL	108727	AB_2132706	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-mouse/human	CD11b	BV650	rat IgG2b, $\chi$	M1/70	600 $\mu$ g/mL	101239	AB_11125575	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-mouse	CD11c	PE-Dazzle 594	arm. Hamster IgG	N418	200 $\mu$ g/mL	117347	AB_2563654	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-mouse	Ly6G	V450	rat IgG2a, $\chi$	1A8	200 $\mu$ g/mL	560603	AB_1727564	BD Biosciences by Becton, Dickinson & Co., San Jose, USA
anti-mouse	Ly6C	APC	rat IgG2c, $\chi$	HK1.4	200 $\mu$ g/mL	128015	AB_1732087	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-mouse	MHCII (I-A/I-E)	FITC	rat IgG2b, $\chi$	M5/114.15.2	500 $\mu$ g/mL	107605	AB_313320	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-mouse/human	nAChR $\alpha$ 7	purified	rabbit IgG	polyclonal	800 $\mu$ g/mL	ANC-007	AB_10659339	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel

Antigen-Spezies	Antigen	Farbstoff	Isotyp	Klon	Konzentration	Referenz-No	Antikörper-ID (RRID)*	Hersteller
anti-rabbit	IgG	Biotin	goat IgG	polyclonal	1500 µg/mL	31820	AB_228340	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
	Streptavidin	PE			500 µg/mL	55406		BD Biosciences, San Jose, USA
anti-mouse	CD25 <sup>†</sup>	Biotin	rat IgM, $\alpha$	7D4	125 µg/mL	550529	AB_2125455	BD Biosciences, San Jose, USA
anti-mouse	CD45R (B220)	FITC	rat IgG2,a, $\alpha$	RA3-6B2	30 µg/mL	130-091-829	AB_244281	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
anti-mouse	CD4	Alexa 647	rat IgG2a	RM4-5	200 µg/mL	51-0041-82	AB_46977	eBioscience® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
anti-mouse	CD8a	BV650	rat IgG2a, $\alpha$	53-6.7	200 µg/mL	100741	AB_1112434	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-mouse	CD45	BV510	rat IgG2b, $\alpha$	30-F11	200 µg/mL	103137	AB_2561392	BioLegend Inc., San Diego, USA
anti-mouse	MHCII (I-A/I-E)	PE	rat IgG2b, $\alpha$	M5/114.15.2	30 µg/mL	130-091-368	AB_615137	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Tabelle 4: Details zu allen verwendeten Antikörpern

\* Research Resources Identifiers (RRID) sind eine Initiative der *Research Resource Initiative* zur eindeutigen Identifizierung von Materialien in wissenschaftlicher Forschung. RRID können auf [scicrunch.org/resources](https://scicrunch.org/resources) gesucht und weitere Informationen zu diesen Antikörpern erhalten werden.

† CD25-Biotin wurde nur zur Kompensationen des BD LSRII für den alpha7-Antikörper verwendet, nicht aber in der weiteren Analyse der Zellen

Tabelle 5: Durchschnittliche Plasmakonzentrationen (in pg/mL mit Standardabweichung)

		Unbe- handelt	Unbe- handelt + Nikotin	Sham-VGX + SID	Sham-VGX + SID + Nikotin	VGX + SID	VGX + SID + Nikotin
6h		n = 12	n = 11*	n = 12	n = 12	n = 12	n = 10†
	TNF- $\alpha$	3.532 (1.403)	5.620 (4.876)	7.442 (11.21)	3.096 (1.740)	6.237 (7.793)	3.989 (2.017)
	IFN- $\gamma$	0.1342 (0.1378)	0.1718 (0.1211)	0.0350 (0.0687)	0.1050 (0.1588)	0.000 (0.000)	0.0180 (0.0447)
	IL-1 $\beta$	1.220 (0.922)	1.360 (0.770)	1.103 (1.174)	1.783 (1.349)	0.8650 (1.103)	0.3980 (0.4349)
	IL-2	0.9267 (0.396)	0.8973 (0.4382)	0.6633 (0.3459)	0.6242 (0.3418)	0.4250 (0.4012)	0.4690 (0.3199)
	IL-6	0.5933 (0.4581)	0.3682 (0.3769)	1244 (1945)	271.7 (338.0)	923.3 (1449)	870.1 (778.6)
	IL-10	1.163 (0.8457)	0.9091 (0.8593)	23.65 (61.51)	4.422 (6.964)	29.39 (76.62)	16.35 (21.41)
	IL-12p70	0.1550 (0.2345)	0.6282 (2.083)	0.0283 (0.0981)	0.2225 (0.5398)	0.1675 (0.5802)	0.0240 (0.0759)
	IL-17A	0.5633 (0.1542)	0.6064 (0.3025)	0.3908 (0.3080)	0.3108 (0.1895)	0.2417 (0.2854)	0.2670 (0.2627)
72h		n = 12	n = 12	n = 11#	n = 11	n = 11	n = 9
	TNF- $\alpha$	2.044 (0.6543)	2.313 (0.8203)	3.582 (1.337)	3.791 (1.349)	4.296 (3.764)	2.643 (1.429)
	IFN- $\gamma$	0.0725 (0.0698)	0.1367 (0.1373)	0.8836 (1.348)	0.3645 (0.2992)	0.4973 (0.4219)	0.1722 (0.3072)
	IL-1 $\beta$	1.163 (1.109)	0.7500 (0.4225)	1.279 (0.9684)	1.912 (1.544)	2.365 (3.566)	0.7733 (0.7518)
	IL-2	0.8358 (0.5220)	0.8683 (0.3212)	0.9764 (0.4801)	0.9364 (0.4348)	1.074 (0.7169)	0.9322 (0.5776)
	IL-6	0.6717 (0.4680)	0.4783 (0.4272)	3.164 (2.030)	7.245 (4.865)	6.627 (7.178)	5.071 (3.638)
	IL-10	1.764 (1.068)	1.558 (0.7915)	1.213 (0.8604)	1.759 (1.178)	2.095 (2.828)	2.137 (1.455)
	IL-12p70	0.3117 (0.5722)	0.1067 (0.3695)	0.1927 (0.4836)	0.2245 (0.3950)	0.7909 (2.169)	0.1133 (0.34)
	IL-17A	0.3158 (0.2038)	0.3917 (0.1332)	0.6782 (0.3551)	0.9709 (1.153)	0.8400 (0.5655)	0.4422 (0.4473)

\* Ein Tier dieser Gruppe wurde nach ROUT's Outliers Test ( $Q = 0.1\%$ ) aus allen Berechnungen für die Gruppe ausgeschlossen

† Zwei Tiere der Gruppe wurden nach ROUT's Outliers Test ( $Q = 0.1\%$ ) aus allen Berechnungen für die Gruppe ausgeschlossen

# Ein Tier der Gruppe wurden nach ROUT's Outliers Test ( $Q = 0.1\%$ ) aus allen Berechnungen für die Gruppe ausgeschlossen

Tabelle 6: Durchschnittliche Zytokinkonzentrationen im Überstand mit Medium (in pg/mL mit Standardabweichung)

		Unbe- handelt	Unbe- handelt + Nikotin	Sham-VGX + SID	Sham-VGX + SID + Nikotin	VGX + SID	VGX + SID + Nikotin
6h		n = 12	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12
	TNF- $\alpha$	100.0 (24.09)	112.6 (45.37)	49.43 (16.50)	73.46 (26.91)	66.60 (18.33)	52.24 (15.76)
	IFN- $\gamma$	0.0125 (0.0249)	0.1292 (0.2380)	0.0166 (0.0331)	0.0050 (0.0117)	0.0208 (0.0498)	0.0067 (0.0231)
	IL-1 $\beta$	3.144 (1.798)	1.352 (1.548)	3.468 (2.536)	4.236 (2.805)	3.774 (2.720)	1.975 (1.971)
	IL-2	0.3183 (0.1185)	0.3075 (0.1372)	0.3125 (0.1126)	0.2642 (0.0918)	0.1908 (0.0740)	0.1558 (0.0742)
	IL-6	3.735 (0.7976)	3.857 (1.532)	2.878 (0.4074)	3.582 (0.7650)	3.596 (1.548)	2.552 (0.6819)
	IL-10	2.820 (1.259)	1.306 (1.092)	0.9583 (1.046)	1.063 (1.171)	1.470 (1.537)	1.062 (1.387)
	IL-12p70	0.3508 (0.4807)	0.3317 (0.6036)	0.0417 (0.1443)	0.0450 (0.1559)	0.0192 (0.0664)	0.000 (0.000)
	IL-17A	0.0908 (0.1380)	0.0942 (0.1618)	0.1200 (0.1014)	0.0975 (0.1141)	0.0508 (0.0763)	0.0783 (0.1059)
72h		n = 12	n = 12	n = 12	n = 11	n = 11	n = 9
	TNF- $\alpha$	122.1 (39.41)	121.7 (44.06)	61.72 (33.29)	66.85 (38.50)	67.43 (46.69)	75.80 (33.58)
	IFN- $\gamma$	0.0775 (0.1151)	0.0892 (0.1143)	0.0833 (0.1128)	0.6255 (1.648)	0.1264 (0.1666)	0.1967 (0.2177)
	IL-1 $\beta$	2.847 (1.526)	2.997 (2.147)	2.831 (2.345)	4.391 (2.993)	3.778 (3.244)	4.199 (2.267)
	IL-2	0.6575 (0.2487)	0.6117 (0.3597)	0.5042 (0.2224)	0.3891 (0.1829)	0.4245 (0.2181)	0.4322 (0.3130)
	IL-6	5.158 (2.369)	5.453 (2.088)	6.564 (4.392)	8.393 (6.413)	8.945 (7.461)	7.468 (3.732)
	IL-10	3.141 (1.218)	1.933 (1.718)	2.558 (1.544)	2.139 (2.063)	3.150 (1.573)	2.447 (1.421)
	IL-12p70	0.1108 (0.3839)	0.0783 (0.2620)	0.0942 (0.2202)	0.3091 (0.5361)	0.0864 (0.1928)	0.4589 (0.7519)
	IL-17A	0.0425 (0.0971)	0.0450 (0.0668)	0.1233 (0.1454)	0.1536 (0.1555)	0.1500 (0.1350)	0.1844 (0.1559)

Tabelle 7: Durchschnittliche Zytokinkonzentration im Überstand mit LPS (in pg/mL mit Standardabweichung)

		Unbe- handelt	Unbe- handelt + Nikotin	Sham-VGX + SID	Sham-VGX + SID + Nikotin	VGX + SID	VGX + SID + Nikotin
6h		n = 12	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12
	TNF- $\alpha$	739.8 (174.3)	776.1 (164.0)	1071 (209.8)	1039 (224.3)	1030 (170.2)	776.0 (219.9)
	IFN- $\gamma$	73.57 (52.42)	85.76 (64.88)	70.22 (35.60)	64.74 (35.54)	78.90 (57.55)	30.08 (28.88)
	IL-1 $\beta$	27.76 (4.727)	32.35 (14.76)	29.03 (9.655)	35.48 (8.903)	33.04 (11.85)	23.31 (5.889)
	IL-2	0.5042 (0.1605)	0.4917 (0.1530)	0.5317 (0.1923)	0.5317 (0.1094)	0.4283 (0.1021)	0.3067 (0.0685)
	IL-6	376.4 (107.2)	371.3 (117.7)	484.2 (169.8)	511.5 (162.4)	520.4 (142.8)	275.4 (128.9)
	IL-10	98.46 (24.26)	106.3 (22.05)	119.8 (19.71)	120.8 (16.80)	104.7 (16.67)	76.80 (23.57)
	IL-12p70	1.912 (1.112)	1.483 (0.9544)	1.600 (0.8812)	1.592 (0.9503)	2.068 (1.170)	1.492 (1.293)
	IL-17A	0.0892 (0.0815)	0.1925 (0.2335)	0.0733 (0.0651)	0.2317 (0.2762)	0.1400 (0.0801)	0.0400 (0.0655)
72h		n = 12	n = 11*	n = 12	n = 11	n = 11	n = 9
	TNF- $\alpha$	754.4 (160.9)	768.6 (133.1)	1256 (333.6)	1227 (508.5)	1011 (421.7)	795.4 (207.4)
	IFN- $\gamma$	89.56 (32.93)	108.6 (60.77)	102.9 (78.06)	62.20 (44.03)	132.8 (139.5)	66.39 (52.17)
	IL-1 $\beta$	36.67 (11.56)	35.19 (15.61)	45.43 (30.45)	48.97 (30.97)	45.06 (30.02)	42.04 (24.81)
	IL-2	1.052 (0.2691)	0.8218 (0.3208)	0.5650 (0.2582)	0.5318 (0.1725)	0.5027 (0.2130)	0.5078 (0.2150)
	IL-6	413.1 (116.4)	425.3 (151.3)	725.0 (310.9)	860.4 (574.4)	1035 (865.6)	609.9 (239.0)
	IL-10	180.0 (29.96)	144.2 (39.52)	227.9 (73.32)	235.9 (72.73)	226.5 (56.46)	153.6 (40.49)
	IL-12p70	1.786 (0.9805)	1.875 (0.9709)	1.885 (1.175)	1.873 (1.350)	2.425 (1.290)	1.452 (0.997)
	IL-17A	0.0833 (0.0648)	0.1609 (0.1270)	0.3250 (0.3701)	0.4155 (0.4340)	0.4909 (0.5251)	0.1167 (0.1001)

\* Ein Tier dieser Gruppe wurde nach ROUT's Outliers Test (Q = 0.1%) aus allen Berechnungen für die Gruppe ausgeschlossen

Tabelle 8: Auswertung FACS-Panel 1

		Unbe- handelt	Unbe- handelt + Nikotin	Sham- VGX + SID	Sham- VGX + SID + Nikotin	VGX + SID	VGX + SID + Nikotin
6h		n = 9	n = 9	n = 9	n = 9	n = 9	n = 9
	Zellzahl (in Mio.)	69.66 (12.35)	77.45 (13.29)	59.02 (8.278)	64.81 (12.36)	64.34 (12.59)	64.37 (20.46)
	Lebend (%)						
	B-Zellen (%)	36.30 (3.214)	39.51 (1.755)	35.52 (2.531)	31.87 (2.257)	32.14 (6.504)	32.88 (8.518)
	T-Zellen (%)	25.96 (3.640)	25.49 (5.067)	27.99 (2.745)	23.67 (6.904)	24.52 (4.319)	27.42 (4.076)
	CD4+ (% von T-Zellen)	57.70 (2.693)	58.33 (4.445)	56.56 (3.657)	53.69 (3.399)	53.87 (4.681)	53.23 (5.456)
	CD8+ (% von T-Zellen)	33.51 (2.879)	32.58 (2.223)	36.94 (3.923)	39.04 (2.627)	40.61 (4.121)	41.49 (4.746)
	DN's	7.772 (2.643)	8.156 (3.343)	5.776 (1.433)	6.449 (2.126)	4.896 (1.301)	4.597 (1.559)
	CD4+ / CD8+- Verhältnis	1.736 (0.1981)	1.805 (0.257)	1.556 (0.2768)	1.384 (0.1684)	1.351 (0.2714)	1.308 (0.2541)
	gMFI MHCII auf B-Zellen	13 011 (1 548)	11 256 (941.1)	13 581 (2 781)	11 545 (4 499)	16 498 (2 960)	18 097 (3 300)
72h		n = 12	n = 12	n = 12	n = 11	n = 11	n = 9
	Zellzahl (in Mio.)	69.78 (20.46)	69.09 (17.71)	55.80 (17.33)	64.85 (19.42)	65.43 (36.77)	48.64 (13.27)
	Lebend (%)	66.45 (3.376)	67.83 (6.045)	68.43 (3.099)	70.39 (2.970)	71.59 (4.027)	67.89 (9.800)
	B-Zellen (%)	33.94 (4.523)	36.03 (4.050)	31.74 (6.933)	28.35 (4.820)	30.40 (5.529)	27.11 (3.726)
	T-Zellen (%)	26.37 (4.834)	25.85 (3.321)	22.60 (3.758)	19.95 (4.346)	23.86 (4.188)	22.62 (6.867)
	CD4+ (% von T-Zellen)	59.21 (3.434)	57.44 (6.353)	55.32 (6.677)	52.37 (5.482)	51.72 (6.524)	50.76 (6.747)
	CD8+ (% von T-Zellen)	32.52 (3.704)	34.46 (5.811)	37.59 (6.505)	39.85 (5.596)	40.60 (7.552)	38.62 (4.318)
	DN's	7.795 (1.565)	7.681 (1.390)	6.725 (1.487)	7.387 (0.8198)	7.169 (2.233)	10.05 (5.040)
	CD4+ / CD8+- Verhältnis	1.853 (0.3136)	1.745 (0.5100)	1.549 (0.5013)	1.355 (0.3216)	1.345 (0.4381)	1.341 (0.3032)
	gMFI MHCII auf B-Zellen	10,903 (7,871)	9,676 (5,5457)	9,119 (5,324)	10,367 (5,975)	8,041 (7,615)	12,771 (7,733)

Tabelle 9: Auswertung FACS-Panel 2

	Unbe- handelt	Unbe- handelt + Nikotin	Sham- VGX + SID	Sham- VGX + SID + Nikotin	VGX + SID	VGX + SID + Nikotin
	<i>n = 9</i>	<i>n = 9</i>	<i>n = 9</i>	<i>n = 9</i>	<i>n = 9</i>	<i>n = 9</i>
<b>6h</b>						
Neutrophile (%)	3.352 (0.5953)	2.753 (0.5222)	10.34 (3.754)	13.05 (2.348)	10.59 (3.715)	7.662 (2.244)
Eosinophile (%)	0.7833 (0.2002)	0.8244 (0.2246)	0.3911 (0.1950)	0.3478 (0.0992)	0.4733 (0.2575)	0.5389 (0.5538)
Makrophagen (%)	1.802 (0.6232)	1.411 (0.3006)	1.163 (0.2104)	1.411 (0.6999)	0.8556 (0.4016)	0.6789 (0.2959)
Ly6C <sup>high</sup> (%)	1.066 (0.4191)	0.9011 (0.2261)	0.7867 (0.2165)	0.9878 (0.6193)	0.5889 (0.3431)	0.4233 (0.2471)
Ly6C <sup>low</sup> (%)	0.7189 (0.2956)	0.4933 (0.0980)	0.3656 (0.0520)	0.4056 (0.1689)	0.2567 (0.0900)	0.2500 (0.0760)
Ly6C <sup>high</sup> / Ly6C <sup>low</sup> - Verhältnis	1.639 (0.6117)	1.849 (0.3794)	2.212 (0.7891)	2.516 (1.213)	2.336 (1.006)	1.694 (0.6902)
gMFI alpha7-PE auf Ly6C <sup>high</sup>	192.4 (92.24)	139.3 (94.79)	246.6 (160.5)	302.3 (82.96)	261.2 (102.6)	271.2 (83.07)
gMFI alpha7-PE auf Ly6C <sup>low</sup>	443.8 (240.6)	346.0 (259.9)	393.4 (169.7)	573.2 (144.7)	440.3 (176.0)	368.7 (141.7)
gMFI MHCII-FITC auf Ly6C <sup>high</sup>	996.7 (311.1)	1009 (182.4)	1261 (247.8)	1143 (270.3)	1085 (275.0)	1238 (439.8)
gMFI MHCII-FITC auf Ly6C <sup>low</sup>	1181 (244.2)	1129 (190.2)	1060 (178.9)	1101 (290.8)	1042 (171.2)	960.9 (154.1)
<b>72h</b>						
	<i>n = 12</i>	<i>n = 12</i>	<i>n = 12</i>	<i>n = 11</i>	<i>n = 11</i>	<i>n = 9</i>
Neutrophile (%)	3.736 (0.8977)	3.261 (0.9209)	8.489 (3.720)	12.69 (5.854)	8.998 (4.112)	9.863 (4.270)
Eosinophile (%)	0.9642 (0.4705)	0.8358 (0.2914)	1.873 (0.6535)	2.004 (0.8963)	2.082 (1.237)	2.111 (1.227)
Makrophagen (%)	1.111 (0.3994)	1.136 (0.3156)	2.277 (0.8427)	3.662 (1.615)	2.653 (1.012)	2.601 (1.275)
Ly6C <sup>high</sup> (%)	0.8517 (0.3475)	0.8625 (0.2647)	1.912 (0.7808)	3.097 (1.456)	2.224 (0.8986)	2.062 (1.000)
Ly6C <sup>low</sup> (%)	0.2545 (0.0831)	0.2692 (0.0667)	0.3592 (0.1197)	0.5555 (0.2784)	0.4191 (0.1662)	0.5256 (0.2812)
Ly6C <sup>high</sup> / Ly6C <sup>low</sup> - Verhältnis	3.513 (1.273)	3.231 (0.7719)	5.559 (2.094)	6.872 (5.429)	5.717 (1.917)	4.141 (1.111)
gMFI alpha7-PE auf Ly6C <sup>high</sup>	274.5 (56.7)	258.1 (72.99)	230.3 (70.71)	244.2 (88.02)	237.4 (82.73)	244.1 (53.22)
gMFI alpha7-PE auf Ly6C <sup>low</sup>	451.3 (106.9)	497.2 (109.8)	426.1 (88.71)	496.5 (91.91)	404.4 (79.68)	457.6 (72.32)
gMFI MHCII-FITC auf Ly6C <sup>high</sup>	721.5 (113.9)	770.3 (115.1)	546.9 (222.4)	549.3 (245.5)	453.3 (199.9)	503.3 (147.4)
gMFI MHCII-FITC auf Ly6C <sup>low</sup>	1017 (309.1)	1047 (265.0)	1210 (432.9)	1211 (400.8)	1059 (308.4)	1392 (447.8)

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Statistisches Bundesamt (Destatis), editor. Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Diagnosen, Prozeduren, Fallpauschalen und Case Mix der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern. Fachserie 12 Reihe 64 2017:44.
- [2] Pearse RM, Moreno RP, Bauer P, Pelosi P, Metnitz P, Spies C, et al. Mortality after surgery in Europe: a 7 day cohort study. *The Lancet* 2012;380:1059–65. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61148-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61148-9).
- [3] Khuri SF, Henderson WG, DePalma RG, Mosca C, Healey NA, Kumbhani DJ. Determinants of Long-Term Survival After Major Surgery and the Adverse Effect of Postoperative Complications. *Ann Surg* 2005;242:326–43. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000179621.33268.83>.
- [4] Kehlet H. Postoperative ileus. *Gut* 2000;47:iv85–6. [https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl\\_4.iv85](https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl_4.iv85).
- [5] Wolthuis AM, Bislenghi G, Fieuws S, Overstraeten A de B van, Boeckxstaens G, D’Hoore A. Incidence of prolonged postoperative ileus after colorectal surgery: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Disease* n.d.;18:O1–9. <https://doi.org/10.1111/codi.13210>.
- [6] Venara A, Slim K, Regimbeau J-M, Ortega-Deballon P, Vielle B, Lermite E, et al. Proposal of a new classification of postoperative ileus based on its clinical impact—results of a global survey and preliminary evaluation in colorectal surgery. *International Journal of Colorectal Disease* 2017;32:797–803. <https://doi.org/10.1007/s00384-017-2788-6>.
- [7] Venara A, Neunlist M, Slim K, Barbieux J, Colas PA, Hamy A, et al. Postoperative ileus: Pathophysiology, incidence, and prevention. *Journal of Visceral Surgery* 2016;153:439–46. <https://doi.org/10.1016/j.jvisc Surg.2016.08.010>.
- [8] Tevis SE, Carchman EH, Foley EF, Harms BA, Heise CP, Kennedy GD. Postoperative Ileus—More than Just Prolonged Length of Stay? *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2015;19:1684–90. <https://doi.org/10.1007/s11605-015-2877-1>.
- [9] Engel C, Brunkhorst FM, Bone H-G, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Medicine* 2007;33:606–18. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0517-7>.



- [10] Heublein S, Hartmann M, Hagel S, Hutagalung R, Brunkhorst F. Epidemiology of sepsis in German hospitals derived from administrative databases. vol. 41, Weimar: Weimar. Infection; 2013, p. 7–23.
- [11] Hadley JS, Wang JE, Michaels LC, Dempsey CM, Foster SJ, Thiemermann C, et al. Alterations in inflammatory capacity and TLR expression on monocytes and neutrophils after cardiopulmonary bypass. Shock 2007;27:466–73. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000245033.69977.c5>.
- [12] Menges P, Kessler W, Kloecker C, Feuerherd M, Gaubert S, Diedrich S, et al. Surgical Trauma and Postoperative Immune Dysfunction. European Surgical Research 2012;48:180–6. <https://doi.org/10.1159/000338196>.
- [13] Chrousos GP. The Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation. N Engl J Med 1995;332:1351–63. <https://doi.org/10.1056/NEJM199505183322008>.
- [14] Larsson EL. Cyclosporin A and dexamethasone suppress T cell responses by selectively acting at distinct sites of the triggering process. J Immunol 1980;124:2828–33.
- [15] Palacios R, Sugawara I. Hydrocortisone Abrogates Proliferation of T Cells in Autologous Mixed Lymphocyte Reaction by Rendering the Interleukin-2 Producer T Cells Unresponsive to Interleukin-1 and Unable to Synthesize the T-Cell Growth Factor. Scandinavian Journal of Immunology 1982;15:25–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1982.tb00618.x>.
- [16] Nieto MA, González A, Gambón F, Díaz-Espada F, López-Rivas A. Apoptosis in human thymocytes after treatment with glucocorticoids. Clin Exp Immunol 1992;88:341–4.
- [17] Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS, Spencer RL. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. J Immunol 1996;157:1638–44.
- [18] Umland SP, Schleimer RP, Johnston SL. Review of the Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Glucocorticoids for Use in Asthma. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 2002;15:35–50. <https://doi.org/10.1006/pupt.2001.0312>.
- [19] Nanus DE, Filer AD, Hughes B, Fisher BA, Taylor PC, Stewart PM, et al. TNF $\alpha$  regulates cortisol metabolism in vivo in patients with inflammatory arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases 2015;74:464–9. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203926>.
- [20] Dąbrowska AM, Słotwiński R. The immune response to surgery and infection. Cent Eur J Immunol 2014;39:532–7. <https://doi.org/10.5114/ceji.2014.47741>.
- [21] Munford RS, Pugin J. Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation

- and Can Be Immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:316–21. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.2.2007102>.
- [22] Osborn TM, Tracy JK, Dunne JR, Pasquale M, Napolitano LM. Epidemiology of sepsis in patients with traumatic injury: *Critical Care Medicine* 2004;32:2234–40. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000145586.23276.0F>.
- [23] Calum H, Høiby N, Moser C. Burn Mouse Models. In: Filloux A, Ramos J-L, editors. *Pseudomonas Methods and Protocols*, New York, NY: Springer New York; 2014, p. 793–802. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0\\_60](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_60).
- [24] Zellweger R, Ayala A, Zhu XL, Morrison MH, Chaudry IH. Effect of surgical trauma on splenocyte and peritoneal macrophage immune function. *J Trauma* 1995;39:645–50.
- [25] Ko F, Isoda F, Mobbs C. Laparotomy in Mice Induces Blood Cell Expression of Inflammatory and Stress Genes. *J Interferon Cytokine Res* 2015;35:302–12. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0031>.
- [26] Koerner P, Busemann A, Traeger T, Kessler W, Cziupka K, Diedrich S, et al. Postoperative Immune Suppression in Visceral Surgery: Characterisation of an Intestinal Mouse Model. *European Surgical Research* 2011;47:260–6. <https://doi.org/10.1159/000333391>.
- [27] Reich F. Einfluss der subdiaphragmalen Vagotomie auf die postoperative Immunantwort im Modell der chirurgisch induzierten Immunsuppression. 2019.
- [28] Günther T. Der Einfluss des Nervus vagus auf die Zellmigration des adaptiven und angeborenen Immunsystems in der postoperativen Immunsuppression. 2021.
- [29] Klöcker C. Charakterisierung und Etablierung eines Mausmodells zur Evaluation von Ursachen und Mechanismen der postoperativen Immundysfunktion. 2017.
- [30] Kalff JC, Schraut WH, Simmons RL, Bauer AJ. Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Ann Surg* 1998;228:652–63.
- [31] Evans C, Galustian C, Kumar D, Hagger R, Melville DM, Bodman-Smith M, et al. Impact of surgery on immunologic function: comparison between minimally invasive techniques and conventional laparotomy for surgical resection of colorectal tumors. *Am J Surg* 2009;197:238–45. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2008.01.021>.
- [32] Tada T. The Immune System as a Supersystem. *Annual Review of Immunology* 1997;15:1–13. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.1>.
- [33] Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 2008;154:1558–71. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.185>.

- [34] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405:458–62.
- [35] Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003;421:5.
- [36] Rosas-Ballina M, Goldstein RS, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, Valdés-Ferrer SI, Patel NB, et al. The Selective  $\alpha 7$  Agonist GTS-21 Attenuates Cytokine Production in Human Whole Blood and Human Monocytes Activated by Ligands for TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, and RAGE. *Molecular Medicine* 2009;8.
- [37] Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nature Medicine* 2004;10:1216–21. <https://doi.org/10.1038/nm1124>.
- [38] Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Susarla S, Czura CJ, et al. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *Journal of Vascular Surgery* 2002;36:1231–6. <https://doi.org/10.1067/mva.2002.129643>.
- [39] Guarini S, Altavilla D, Cainazzo M-M, Giuliani D, Bigiani A, Marini H, et al. Efferent Vagal Fibre Stimulation Blunts Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation and Protects Against Hypovolemic Hemorrhagic Shock. *Circulation* 2003;107:1189–94. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000050627.90734.ED>.
- [40] van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Bruno MJ, LaRosa GJ, Ulloa L, et al. The Vagus Nerve and Nicotinic Receptors Modulate Experimental Pancreatitis Severity in Mice. *Gastroenterology* 2006;130:1822–30. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.02.022>.
- [41] Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002;420:853.
- [42] Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nature Reviews Immunology* 2009;9:418–28. <https://doi.org/10.1038/nri2566>.
- [43] Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *The Journal of Experimental Medicine* 2006;203:1623–8. <https://doi.org/10.1084/jem.20052362>.
- [44] Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM, et al. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105:11008–13.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0803237105>.

- [45] Bellinger DL, Lorton D, Hamill RW, Felten SY, Felten DL. Acetylcholinesterase Staining and Choline Acetyltransferase Activity in the Young Adult Rat Spleen: Lack of Evidence for Cholinergic Innervation. *Brain, Behavior, and Immunity* 1993;7:191–204. <https://doi.org/10.1006/brbi.1993.1021>.
- [46] Berthoud H-R, Powley TL. Characterization of vagal innervation to the rat celiac, suprarenal and mesenteric ganglia. *Journal of the Autonomic Nervous System* 1993;42:153–69. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(93\)90046-W](https://doi.org/10.1016/0165-1838(93)90046-W).
- [47] Cano G, Sved AF, Rinaman L, Rabin BS, Card JP. Characterization of the central nervous system innervation of the rat spleen using viral transneuronal tracing. *Journal of Comparative Neurology* n.d.;439:1–18. <https://doi.org/10.1002/cne.1331>.
- [48] Bellinger DL, Felten SY, Lorton D, Felten DL. Origin of noradrenergic innervation of the spleen in rats. *Brain, Behavior, and Immunity* 1989;3:291–311. [https://doi.org/10.1016/0889-1591\(89\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0889-1591(89)90029-9).
- [49] Nance DM, Burns J. Innervation of the spleen in the rat: Evidence for absence of afferent innervation. *Brain, Behavior, and Immunity* 1989;3:281–90. [https://doi.org/10.1016/0889-1591\(89\)90028-7](https://doi.org/10.1016/0889-1591(89)90028-7).
- [50] Vida G, Peña G, Deitch EA, Ulloa L.  $\alpha$ 7-Cholinergic Receptor Mediates Vagal Induction of Splenic Norepinephrine. *The Journal of Immunology* 2011;186:4340–6. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003722>.
- [51] Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdes-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, et al. Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science* 2011;334:98–101. <https://doi.org/10.1126/science.1209985>.
- [52] de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bannink RJ, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nature Immunology* 2005;6:844–51. <https://doi.org/10.1038/ni1229>.
- [53] Lu B, Kwan K, Levine YA, Olofsson PS, Yang H, Li J, et al.  $\alpha$ 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling Inhibits Inflammasome Activation by Preventing Mitochondrial DNA Release. *Mol Med* 2014;20:350–8. <https://doi.org/10.2119/molmed.2013.00117>.
- [54] Kessler W, Diedrich S, Menges P, Ebker T, Nielson M, Partecke LI, et al. The Role of the Vagus Nerve: Modulation of the Inflammatory Reaction in Murine Polymicrobial Sepsis. *Mediators of Inflammation* 2012;2012:1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/467620>.

- [55] Mueller MH, Karpitschka M, Gao Z, Mittler S, Kasperek MS, Renz B, et al. Vagal Innervation and Early Postoperative Ileus in Mice. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2011;15:891–901. <https://doi.org/10.1007/s11605-011-1481-2>.
- [56] Khan MAS, Farkhondeh M, Crombie J, Jacobson L, Kaneki M, Martyn JAJ. Lipopolysaccharide Upregulates  $\alpha 7$  Acetylcholine Receptors: Stimulation with GTS-21 mitigates growth arrest of macrophages and improves survival in burned mice. *Shock* 2012;38:213–9. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31825d628c>.
- [57] Chernyavsky AI, Arredondo J, Skok M, Grando SA. Auto/paracrine control of inflammatory cytokines by acetylcholine in macrophage-like U937 cells through nicotinic receptors. *International Immunopharmacology* 2010;10:308–15. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.12.001>.
- [58] Yeboah MM, Xue X, Javdan M, Susin M, Metz CN. Nicotinic acetylcholine receptor expression and regulation in the rat kidney after ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2008;295:F654–61. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90255.2008>.
- [59] Su X, Matthay MA, Malik AB. Requisite Role of the Cholinergic  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Pathway in Suppressing Gram-Negative Sepsis-Induced Acute Lung Inflammatory Injury. *The Journal of Immunology* 2010;184:401–10. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901808>.
- [60] Downs AM, Bond CE, Hoover DB. Localization of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor mRNA and protein within the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Neuroscience* 2014;266:178–85. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.02.011>.
- [61] Inoue T, Abe C, Sung SJ, Moscalu S, Jankowski J, Huang L, et al. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through  $\alpha 7$ nAChR+ splenocytes. *J Clin Invest* 2016;126:1939–52. <https://doi.org/10.1172/JCI83658>.
- [62] Prechtel JC, Powley TL. The fiber composition of the abdominal vagus of the rat. *Anat Embryol* 1990;181:101–15.
- [63] Kinouchi K, Brown G, Pasternak G, Donner DB. Identification and characterization of receptors for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 1991;181:7.
- [64] Schöbitz B, Voorhuis DAM, De Kloet ER. Localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Neuroscience Letters* 1992;136:189–92. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90046-A](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90046-A).

- [65] TAKAO T, TRACEY DE, MITCHELL WM, DE EBS. Interleukin-1 Receptors in Mouse Brain: Characterization and Neuronal Localization. *Endocrinology* 1990;127:3070–8. <https://doi.org/10.1210/endo-127-6-3070>.
- [66] Zanos TP, Silverman HA, Levy T, Tsaava T, Battinelli E, Lorraine PW, et al. Identification of cytokine-specific sensory neural signals by decoding murine vagus nerve activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:E4843–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719083115>.
- [67] Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol Rev* 2012;248:188–204. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01138.x>.
- [68] Goehler LE, Gaykema RPA, Hansen MK, Anderson K, Maier SF, Watkins LR. Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. *Autonomic Neuroscience* 2000;85:49–59. [https://doi.org/10.1016/S1566-0702\(00\)00219-8](https://doi.org/10.1016/S1566-0702(00)00219-8).
- [69] Mills KHG. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 2011;11:807.
- [70] Fogel-Petrovic M, Long JA, Knight DA, Thompson PJ, Upham JW. Activated human dendritic cells express inducible cyclo-oxygenase and synthesize prostaglandin E2 but not prostaglandin D2. *Immunology and Cell Biology* 2004;82:47–54. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2004.01213.x>.
- [71] Bell FR. The localization within the dorsal motor nucleus of the vagus of the efferent fibres to the ruminant stomach. *J Anat* 1960;94:410–7.
- [72] Ben-Menachem E, Mañon-Espallat R, Ristanovic R, Wilder BJ, Stefan H, Mirza W, et al. Vagus nerve stimulation for treatment of partial seizures: 1. A controlled study of effect on seizures. First International Vagus Nerve Stimulation Study Group. *Epilepsia* 1994;35:616–26.
- [73] Morris GL, Gloss D, Buchhalter J, Mack KJ, Nickels K, Harden C. Evidence-Based Guideline Update: Vagus Nerve Stimulation for the Treatment of Epilepsy. *Epilepsy Curr* 2013;13:297–303. <https://doi.org/10.5698/1535-7597-13.6.297>.
- [74] Bonaz B, Sinniger V, Hoffmann D, Clarençon D, Mathieu N, Dantzer C, et al. Chronic vagus nerve stimulation in Crohn's disease: a 6-month follow-up pilot study. *Neurogastroenterology & Motility* n.d.;28:948–53. <https://doi.org/10.1111/nmo.12792>.
- [75] Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells. *Nature Medicine* 1999;5:1249–55. <https://doi.org/10.1038/15200>.

- [76] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 2006;124:783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.
- [77] Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B, Catalanotti F, Giazson M, et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep* 2004;5:825–30. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400205>.
- [78] Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim J-Y, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of Toll-like Receptors 2 and 4 in Cellular Activation by High Mobility Group Box 1 Protein. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279:7370–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306793200>.
- [79] Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003;425:516–21. <https://doi.org/10.1038/nature01991>.
- [80] Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, et al. High Mobility Group Box Protein 1: An Endogenous Signal for Dendritic Cell Maturation and Th1 Polarization. *The Journal of Immunology* 2004;173:307–13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.1.307>.
- [81] Engel DR, Koscielny A, Wehner S, Maurer J, Schiwon M, Franken L, et al. T helper type 1 memory cells disseminate postoperative ileus over the entire intestinal tract. *Nature Medicine* 2010;16:1407–13. <https://doi.org/10.1038/nm.2255>.
- [82] Dumitriu IE, Baruah P, Valentini B, Voll RE, Herrmann M, Nawroth PP, et al. Release of High Mobility Group Box 1 by Dendritic Cells Controls T Cell Activation via the Receptor for Advanced Glycation End Products. *The Journal of Immunology* 2005;174:7506–15. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.12.7506>.
- [83] Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct Effects of T-bet in TH1 Lineage Commitment and IFN- $\gamma$  Production in CD4 and CD8 T Cells. *Science* 2002;295:6.
- [84] McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature Immunology* 2009;10:314–24. <https://doi.org/10.1038/ni.1698>.
- [85] Johansson-Lindbom B, Svensson M, Pabst O, Palmqvist C, Marquez G, Förster R, et al. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med* 2005;202:1063–73. <https://doi.org/10.1084/jem.20051100>.
- [86] Hu J, August A. Naive and Innate Memory Phenotype CD4+ T Cells Have Different Requirements for Active Itk for Their Development. *The Journal of Immunology* 2008;180:6544–52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6544>.

- [87] Kalff JC, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. *Gastroenterology* 2000;118:316–27.
- [88] van Westerloo DJ, Giebelen IAJ, Florquin S, Daalhuisen J, Bruno MJ, de Vos AF, et al. The Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway Regulates the Host Response during Septic Peritonitis. *The Journal of Infectious Diseases* 2005;191:2138–48. <https://doi.org/10.1086/430323>.
- [89] Kessler W, Traeger T, Westerholt A, Neher F, Mikulcak M, Müller A, et al. The vagal nerve as a link between the nervous and immune system in the instance of polymicrobial sepsis. *Langenbeck's Archives of Surgery* 2006;391:83–7. <https://doi.org/10.1007/s00423-006-0031-y>.
- [90] Bigos M. Separation Index: An Easy-to-Use Metric for Evaluation of Different Configurations on the Same Flow Cytometer. *Current Protocols in Cytometry* 2007;40:1.21.1-1.21.6. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0121s40>.
- [91] Maecker HT, Trotter J. Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. *Cytometry Part A* 2006;69A:1037–42. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20333>.
- [92] Rose S, Misharin A, Perlman H. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry Part A* 2012;81A:343–50. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22012>.
- [93] Buttenschoen K, Schneider ME, Utz K, Kornmann M, Beger HG, Carli Buttenschoen D. Effect of major abdominal surgery on endotoxin release and expression of Toll-like receptors 2/4. *Langenbeck's Archives of Surgery* 2009;394:293–302. <https://doi.org/10.1007/s00423-008-0357-8>.
- [94] Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990;265:621–36.
- [95] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>.
- [96] Papatheodorou DC, Karagiannidis LK, Paltoglou G, Margeli A, Kaparos G, Valsamakis G, et al. Pulsatile Interleukin-6 Leads CRH Secretion and Is Associated With Myometrial Contractility During the Active Phase of Term Human Labor. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:4105–12. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-4023>.
- [97] Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology* 2015;16:448–57. <https://doi.org/10.1038/ni.3153>.



- [98] Yasukawa K, Hirano T, Watanabe Y, Muratani K, Matsuda T, Nakai S, et al. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J* 1987;6:2939–45.
- [99] Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology* 2008;180:5771–7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5771>.
- [100] Li Q, Lei H, Liu A, Yang Y, Su D, Liu X. The antishock effect of anisodamine requires the upregulation of  $\alpha 7$  nicotine acetylcholine receptors by IL-10. *Life Sciences* 2011;89:395–401. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.07.008>.
- [101] Komegae EN, Farmer DGS, Brooks VL, McKinley MJ, McAllen RM, Martelli D. Vagal afferent activation suppresses systemic inflammation via the splanchnic anti-inflammatory pathway. *Brain, Behavior, and Immunity* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.06.005>.
- [102] The FO, Boeckxstaens GE, Snoek SA, Cash JL, Bennink R, LaRosa GJ, et al. Activation of the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway Ameliorates Postoperative Ileus in Mice. *Gastroenterology* 2007;133:1219–28. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.07.022>.
- [103] Paliard X, de Waal Malefijt R, Yssel H, Blanchard D, Chrétien I, Abrams J, et al. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell clones. *J Immunol* 1988;141:849–55.
- [104] Huston JM, Rosas-Ballina M, Xue X, Dowling O, Ochani K, Ochani M, et al. Cholinergic Neural Signals to the Spleen Down-Regulate Leukocyte Trafficking via CD11b. *J Immunol* 2009;183:552–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802684>.
- [105] Pittman K, Kubes P. Damage-Associated Molecular Patterns Control Neutrophil Recruitment. *J Innate Immun* 2013;5:315–23. <https://doi.org/10.1159/000347132>.
- [106] Kovtun A, Messerer DAC, Scharffetter-Kochanek K, Huber-Lang M, Ignatius A. Neutrophils in Tissue Trauma of the Skin, Bone, and Lung: Two Sides of the Same Coin. *J Immunol Res* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8173983>.
- [107] Salvo-Romero E, Rodiño-Janeiro BK, Albert-Bayo M, Lobo B, Santos J, Farré R, et al. Eosinophils in the Gastrointestinal Tract: Key Contributors to Neuro-Immune Crosstalk and Potential Implications in Disorders of Brain-Gut Interaction. *Cells* 2022;11:1644. <https://doi.org/10.3390/cells11101644>.
- [108] Samarasinghe AE, Melo RCN, Duan S, LeMessurier KS, Liedmann S, Surman SL, et al. Eosinophils Promote Antiviral Immunity in Mice Infected with Influenza A Virus. *J Immunol* 2017;198:3214–26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600787>.

- [109] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 2004;75:163–89. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>.
- [110] Perussia B. Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway. *Journal of Experimental Medicine* 1983;158:2058–80. <https://doi.org/10.1084/jem.158.6.2058>.
- [111] Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol* 1995;58:373–81.
- [112] Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997;15:749–95. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.749>.
- [113] Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* 1999;163:4647–50.
- [114] Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol* 1988;140:1022–7.
- [115] Capobianco MP, Cassiano GC, da Cruz Furini AA, Storti de Melo LM, Bonini Domingos CR, Dantas Machado RL. Human Interleukin 2 (IL-2) Promotion of Immune Regulation and Clinical Outcomes: A Review. *J Cytokine Biol* 2016;01. <https://doi.org/10.4172/2576-3881.1000109>.
- [116] Lenardo MJ. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 1991;353:858–61. <https://doi.org/10.1038/353858a0>.
- [117] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>.
- [118] Bendickova K, Fric J. Roles of IL-2 in bridging adaptive and innate immunity, and as a tool for cellular immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2020;108:427–37. <https://doi.org/10.1002/JLB.5MIR0420-055R>.
- [119] Mashimo M, Komori M, Matsui YY, Murase MX, Fujii T, Takeshima S, et al. Distinct Roles of  $\alpha 7$  nAChRs in Antigen-Presenting Cells and CD4<sup>+</sup> T Cells in the Regulation of T Cell Differentiation. *Front Immunol* 2019;10:1102. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01102>.
- [120] Rioja LF, Alonso P, de Haro J, de la Cruz J. Prognostic value of the CD4/CD8 lymphocyte ratio in moderately burned patients. *Burns* 1993;19:198–201. [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(93\)90148-2](https://doi.org/10.1016/0305-4179(93)90148-2).
- [121] Lin S-S, Zhang R-Q, Shen L, Xu X-J, Li K, Bazhin A-V, et al. Alterations in the gut

- barrier and involvement of Toll-like receptor 4 in murine postoperative ileus. *Neurogastroenterology & Motility* 2018;30:e13286. <https://doi.org/10.1111/nmo.13286>.
- [122] Handy JM, Scott AJ, Cross AM, Sinha P, O’Dea KP, Takata M. HLA-DR expression and differential trafficking of monocyte subsets following low to intermediate risk surgery\*. *Anaesthesia* 2010;65:27–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2044.2009.06161.x>.
- [123] Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *BJS* 1990;77:204–7. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800770225>.
- [124] Caille V, Chiche J-D, Nciri N, Berton C, Gibot S, Boval B, et al. Histocompatibility Leukocyte Antigen-D Related expression is specifically altered and predicts mortality in septic shock but not in other causes of shock. *Shock* 2004;22:521–6. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000143410.63698.57>.
- [125] Cavaillon J-M, Adib-Conquy M. Determining the Degree of Immunodysregulation in Sepsis. *Acute Kidney Injury* 2007;156:101–11. <https://doi.org/10.1159/000102075>.
- [126] Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996;125:680–7. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-125-8-199610150-00009>.
- [127] Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM Consensus Conference on Sepsis and Organ Failure. *Chest* 1992;101:1481–3. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1481>.
- [128] Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. Tilting toward immunosuppression. *Nat Med* 2009;15:496–7. <https://doi.org/10.1038/nm0509-496>.
- [129] Kratochvil RM, Kuberski P, Deniset JF. Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2017;37:35–42. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308198>.
- [130] Feuerstein R, Seidl M, Prinz M, Henneke P. MyD88 in Macrophages Is Critical for Abscess Resolution in Staphylococcal Skin Infection. *The Journal of Immunology* 2015;194:2735–45. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402566>.
- [131] Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, et al. Staphylococcus aureus biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol* 2011;186:6585–96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002794>.

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Belastungsscore für Versuchstiere nach SID und Vagotomie	18
Tabelle 2	Übersicht über die verwendeten Antikörper für die durchflusszytometrische Färbung 1	25
Tabelle 3	Übersicht über die verwendeten Antikörper für die durchflusszytometrische Färbung 2	26
Tabelle 4	Details zu allen verwendeten Antikörpern	61f
Tabelle 5	Durchschnittliche Plasmakonzentrationen	63
Tabelle 6	Durchschnittliche Zytokinkonzentration im Überstand mit Medium	64
Tabelle 7	Durchschnittliche Zytokinkonzentration im Überstand mit LPS	65
Tabelle 8	Auswertung FACS-Panel 1	66
Tabelle 9	Auswertung FACS-Panel 2	67

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	SID führt in der Frühphase zu reduzierten, in der Spätphase zu höheren Interferon- $\gamma$ -Spiegeln	29
Abbildung 2	Vagotomie führt in der Frühphase nach SID zu niedrigeren IL-2-Konzentrationen im Serum.	30
Abbildung 3	In der Frühphase nach operativem Trauma zeigen sich massiv erhöhte Interleukin-6-Konzentrationen, welche auch nach 72h weiter erhöht sind	31
Abbildung 4	Basale TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den (unstimulierten) Splenozytenkulturen sind nach operativem Trauma vermindert.	32
Abbildung 5	Basale Interleukin-10-Konzentration in unstimulierten Zellüberständen ist in der Frühphase vermindert.	33
Abbildung 6	Nikotin führt zu tendenziell niedrigeren IL-10-Spiegeln in der Spätphase im SID-Modell.	34
Abbildung 7	IL-2-Freisetzung aus unstimulierten Splenozyten ist bei vagotomierten Mäusen zum frühen Zeitpunkt nach SID supprimiert.	35
Abbildung 8	Präoperative Vagotomie führt nach OP-Trauma zu geringerer TNF- $\alpha$ -Ausschüttung aus stimulierten Milzzellen im Vergleich zur Sham-Gruppe.	37
Abbildung 9	Vagotomie führt auch bei IL-10 zu niedrigerer Ausschüttung nach OP aus stimulierten Splenozytenkulturen sowohl in der Früh- als auch Spätphase.	38
Abbildung 10	In der Spätphase nach SID wird bei LPS-stimulierten Splenozyten weniger IL-2 freigesetzt, in der Frühphase in der Vagotomie-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe.	39
Abbildung 11	In der frühen postoperativen Phase zeigen sich insbesondere bei vagotomierten Mäusen erhöhte, adjustierte TNF- $\alpha$ -Konzentration im Zellüberstand nach LPS-Stimulation.	40
Abbildung 12	B- und T-Lymphozytenanteile der Milz ändern sich kaum nach operativem Trauma.	41
Abbildung 13	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> -Verhältnis in der Milz sinkt nach operativem Trauma ab.	42
Abbildung 14	Inbesondere eosinophile Granulozyten der Milz sind initial vermindert, später dann erhöht.	43
Abbildung 15	Anteil der Monozyten/Makrophagen nimmt in Frühphase nach Trauma ab, in der Spätphase zu.	44
Abbildung 16	Inbesondere in der späteren Phase nach Trauma nimmt der Anteil Ly6C <sup>high</sup> - gegenüber Ly6C <sup>low</sup> -Makrophagen in der Milz zu.	45
Abbildung 17	Vagotomierte Mäuse zeigen spät nach Operation eine verringerte MHCII-Expression auf Ly6C <sup>high</sup> -Makrophagen	46
Abbildung 18	Kurz nach Operation zeigen vagotomierte Mäuse erhöhte MHCII-Expressionen auf B-Lymphozyten.	47
Abbildung 19	Modell zum Immunstatus nach aseptischem Trauma am Beispiel der SID	54
Abbildung 20	FACS-Gating-Strategie zu Panel 1	59
Abbildung 21	FACS-Gating-Strategie zu Panel 1	60

## 11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, 05.11.2023

Johannes Czerny

## 12 Lebenslauf

## 13 Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht ohne die Unterstützung von vielen Menschen möglich gewesen:

Zuallererst möchte ich Pia Menges danken, die mich für dieses spannende Gebiet begeistern konnte und mir somit die Möglichkeit gab, meine Promotionsarbeit zu diesem Thema zu verfassen. Auch hatte sie dank ihrer großen Expertise immer viel Hilfe geben können und mich auch nach den ersten etwas ernüchternden Daten dazu bewogen, immer am Ball zu bleiben.

Desweiteren wäre dies natürlich auch nicht ohne die Hilfe der MTAs Antje Janetzko und Julia Klauke sowie die damalige Laborleitung Frau Christine Hackbarth möglich gewesen, die dank ihrer jahrelangen Erfahrung wertvollen Input lieferten und bei der Planung und Durchführung der Experimente behilflich waren und einfach immer ein offenes Ohr bei etwaigen Fragen und Problem hatten. Auch geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. Heidecke zur Bereitstellung der Forschungsmöglichkeiten sowie an Frau Prof. Dr. Bröker vom Institut für Immunologie zur Möglichkeit, das FACS-Gerät kennenlernen und eigenständig nutzen zu dürfen.

Danken möchte ich auch meinen Mitstreitern im Labor, vor allem Janik Brüggemeier und Florian Graw sowie Bastian Wenke und Annabel Kleinwort, mit denen ich mich immer über die aktuellsten Ergebnisse austauschen konnte.

Zu guter Letzt geht mein Dank an meine Familie, welche mir immer zur Seite stand und mich auch in der Phase des Abfassens der Promotionsarbeit anspornte, am Ball zu bleiben.