

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

Thema:

**Analyse des Zeitverlaufs der postoperativen Immundysfunktion nach viszeralchirurgischen  
Eingriffen anhand des Mausmodells der *surgically-induced immune dysfunction***

Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen  
Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der  
Universitätsmedizin  
der  
Universität Greifswald

2022

vorgelegt von: Laura Eileen Hundt  
geboren am: 19.03.1995  
in: Dorsten



Stellvertretender Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachterin: PD Dr. med. Pia Menges

2. Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Ort, Raum: online Zoom-Meeting (Meeting-ID 699 9860 1493)

Tag der Disputation: 14.03.2022



---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Epidemiologie und Komplikationen viszeralchirurgischer Operationen .....	1
1.2	Modelle der Reaktion des Immunsystems auf ein Trauma .....	1
2	Ziele der Arbeit .....	5
3	Material.....	6
3.1	Laborgeräte .....	6
3.2	Verbrauchsmaterialien .....	7
3.3	Reagenzien und Chemikalien .....	8
3.4	Puffer, Medien und Lösungen .....	8
3.4.1	Narkose – Ketamin/Xylazin-Injektionslösung.....	8
3.4.2	Medium für Splenozyten-Stimulation.....	8
3.4.3	Puffer für die Durchflusszytometrie.....	8
3.5	Kits .....	9
3.6	Antikörper .....	9
3.7	Programme.....	11
4	Methoden .....	12
4.1	Tierexperimentelle Methoden .....	12
4.1.1	Tierhaltung und Zucht.....	12
4.1.2	Operationsvorbereitung und Narkotisierung .....	12
4.1.3	<i>Surgically-induced immune dysfunction</i> .....	12
4.1.4	Laparotomie .....	13
4.1.5	Postoperative Überwachung und Beurteilung der Belastung .....	13
4.1.6	Blutentnahme und -aufarbeitung .....	14
4.1.7	Peritoneallavage und Organentnahme .....	15
4.1.8	Aufarbeitung der Peritoneallavage.....	15
4.1.9	Isolation von murinen Splenozyten .....	16
4.2	Zellbiologische Methoden .....	16
4.2.1	Blutbildbestimmung .....	16
4.2.2	Bakteriologie .....	16
4.2.3	Lipopolysaccharid-Stimulation der Splenozyten .....	17
4.2.4	Durchflusszytometrische Methoden.....	17
4.2.4.1	Zellzählung am Durchflusszytometer.....	17
4.2.4.2	Bestimmung der Aktivierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in der Milz.....	18

4.2.4.3	Analyse verschiedener Zellpopulationen der Milz und Peritoneallavage .....	20
4.2.4.4	Analyse der natürlichen Killerzellen in der Milz .....	22
4.2.4.5	Untersuchung der Zytokinlevel im Serum und im Milzüberstand nach LPS-Stimulation	23
4.2.5	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> zur Bestimmung des Corticosterons im Plasma bzw. Serum.....	24
4.2.6	Bestimmung des Tryptophan-Katabolismus mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie.....	24
5	Ergebnisse .....	26
5.1	Belastung nach Laparotomie und SID .....	26
5.1.1	Bakterielle Belastung der Versuchstiere .....	28
5.2	Gesamtleukozyten im Blut .....	31
5.3	Veränderungen im angeborenen Immunsystem .....	32
5.3.1	Neutrophile Granulozyten.....	32
5.3.1.1	Neutrophile Granulozyten im Vollblut.....	32
5.3.1.2	Neutrophile Granulozyten in der Milz .....	33
5.3.1.3	Neutrophile Granulozyten in der Peritoneallavage .....	34
5.3.2	Monozyten-Makrophagen-System .....	35
5.3.2.1	Monozyten im Blut .....	35
5.3.2.2	Makrophagen in der Milz .....	36
5.3.2.3	Makrophagen in der Peritoneallavage.....	37
5.3.3	Natürliche Killerzellen.....	38
5.3.4	Dendritische Zellen .....	39
5.3.4.1	Dendritische Zellen in der Milz .....	39
5.3.4.2	Dendritische Zellen in der Peritoneallavage.....	40
5.4	Veränderungen des adaptiven Immunsystems .....	41
5.4.1	Gesamtlymphozyten im Blut .....	41
5.4.2	B-Zellen .....	42
5.4.2.1	B-Zellen der Milz.....	42
5.4.2.2	B-Zellen der Peritoneallavage .....	43
5.4.3	CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	44
5.4.3.1	CD4 <sup>+</sup> T-Zellen der Milz.....	44
5.4.3.2	Differenzierung in T-Effektorzellen und regulatorische T-Zellen .....	45
5.4.3.3	Aktivierungsstatus von T-Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen.....	46
5.5	Zytokine im Serum.....	48

5.5.1	Interleukin-6 im Serum .....	48
5.5.2	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ im Serum .....	49
5.5.3	Interleukin-10 im Serum .....	50
5.6	Zytokinsekretion von murinen Splenozyten.....	51
5.6.1	Interleukin-1 $\beta$ im Splenozytenüberstand.....	51
5.6.2	Interleukin-6 im Splenozytenüberstand.....	52
5.6.3	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ im Splenozytenüberstand .....	53
5.6.4	Interferon- $\gamma$ im Splenozytenüberstand .....	54
5.6.5	Interleukin-10 im Splenozytenüberstand.....	55
5.7	Tryptophan-Metabolismus.....	56
5.7.1	Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase.....	56
5.7.2	Weiterer Abbau des Kynurenins.....	58
6	Diskussion .....	62
6.1	Operationsstress und dessen Einfluss auf den physiologischen Zustand des Tieres ....	62
6.2	SID – Tiermodell zur Induktion eines abakteriellen oder doch bakteriell ausgelösten <i>systemic inflammatory response syndrome</i> ? .....	65
6.3	Reaktionen des Immunsystems auf ein operatives Trauma.....	67
6.3.1	Frühe, primär proinflammatorische Reaktion des Immunsystems.....	67
6.3.1.1	Zellen des angeborenen Immunsystems dominieren die frühe Reaktion.....	67
6.3.1.2	Zytokine in der frühen Phase der Immunreaktion.....	70
6.3.1.3	Funktionsstatus der murinen Splenozyten in der frühen postoperativen Phase .....	71
6.3.2	Späte, primär antiinflammatorische Reaktion des Immunsystems .....	72
6.3.2.1	Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der antiinflammatorischen Phase .....	73
6.3.2.2	Zellen des adaptiven Immunsystems als Korrelat der Immunsuppression .....	74
6.3.2.3	Zytokine in der späten Phase der Immunreaktion.....	77
6.3.2.4	Funktionsstatus der murinen Splenozyten in der späten postoperativen Phase .....	78
6.4	Immunsuppressive Wirkung über die Indolamin-2,3-Dioxygenase .....	78
6.5	Überblick über die Immunreaktion nach viszeralchirurgischen Traumata .....	79
7	Zusammenfassung der Arbeit.....	83
8	Literaturverzeichnis .....	84
9	Abbildungsverzeichnis .....	89
10	Tabellenverzeichnis .....	91
11	Abkürzungsverzeichnis.....	91
Anhang	.....	XIV





## 1 Einleitung

### 1.1 Epidemiologie und Komplikationen viszeralchirurgischer Operationen

Viszeralchirurgische Eingriffe, also all jene Operationen, die im Bereich des Verdauungssystems durchgeführt werden, sind in Deutschland in den meisten Krankenhäusern Teil der alltäglichen Routine. In den letzten Jahren kam es zu einer stetigen Zunahme der viszeralchirurgischen Eingriffe, wobei im Jahr 2018 hierzulande circa 2,6 Millionen Operationen am Verdauungstrakt durchgeführt wurden, was etwa 15 % der chirurgischen Prozeduren entspricht [4]. Das Spektrum der Viszeralchirurgie ist dabei ein sehr vielfältiges, welches verhältnismäßig unkomplizierte Eingriffe wie Leistenhernien-Operationen genauso beinhaltet wie hochspezialisierte onkologische Operationen bei Darm- und Pankreaskarzinomen. Die gesamte Viszeralchirurgie weist eine Mortalitätsrate von 1,9 % im Krankenhaus auf [5], aber auch eine deutliche Morbidität geht mit viszeralchirurgischen Operationen einher. Baum *et al.* führten eine deutschlandweite Analyse der viszeralchirurgischen Operationen zwischen 2009 und 2015 durch und zeigten, dass schwerwiegende Komplikationen wie die Entwicklung einer Sepsis in 4,3 % der Fälle, einer Peritonitis in 3,2 % der Fälle und eine über 48 Stunden prolongierte Beatmung bei 3,2 % der Operationen auftraten [5]. Diese Mortalitäts- und Komplikationsraten sind über alle Schweregrade der Eingriffe gemittelt, aber eine Untergruppenanalyse zeigte, dass komplexe Operationen wie zum Beispiel Gastrektomien Mortalitäten bis zu 11,9 % aufwiesen. Trotz diesem nicht zu vernachlässigendem Risiko für Komplikationen, auch bis hin zum Tod, sind häufig operative Eingriffe die besten Behandlungsansätze, sodass die Notwendigkeit besteht, die Therapie sicherer zu machen.

### 1.2 Modelle der Reaktion des Immunsystems auf ein Trauma

Jede Operation stellt eine Verletzung der Integrität des Körpers dar, was diesen bedroht. In diesem Zusammenhang ist es erstmal weitgehend unerheblich, ob dieses Trauma chirurgisch oder im Rahmen eines Unfalls entstanden ist, da die Reaktion des Körpers vergleichbar ist [6]. Darüber hinaus lässt sich diese auch im Zuge einer Sepsis beobachten [6]. In der posttraumatischen Phase hat das Immunsystem vielfältige Aufgaben, um die Homöostase des Körpers zu gewährleisten. Das Ziel ist, dass die Wundheilung adäquat abläuft und währenddessen schädigende Einflüsse, zum Beispiel durch Mikroorganismen, vermieden werden.

Auslöser der Immunreaktion können zweierlei Molekülgruppen sein. Bei einem sterilen Trauma werden sogenannten *damage-associated molecular patterns* (DAMP) aus geschädigten Zellen freigesetzt oder sezerniert, wohingegen Pathogene sogenannte *pathogene-associated molecular patterns* (PAMP) aufweisen [7]. Diese beiden Molekülgruppen werden von gleichartigen

Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*) erkannt und lösen über eine Kaskade die Immunreaktion aus [7]. Dieses erklärt auch, wieso eine Vielzahl an infektiösen und nicht-infektiösen Reizen eine gleichartige Immunantwort auslöst.

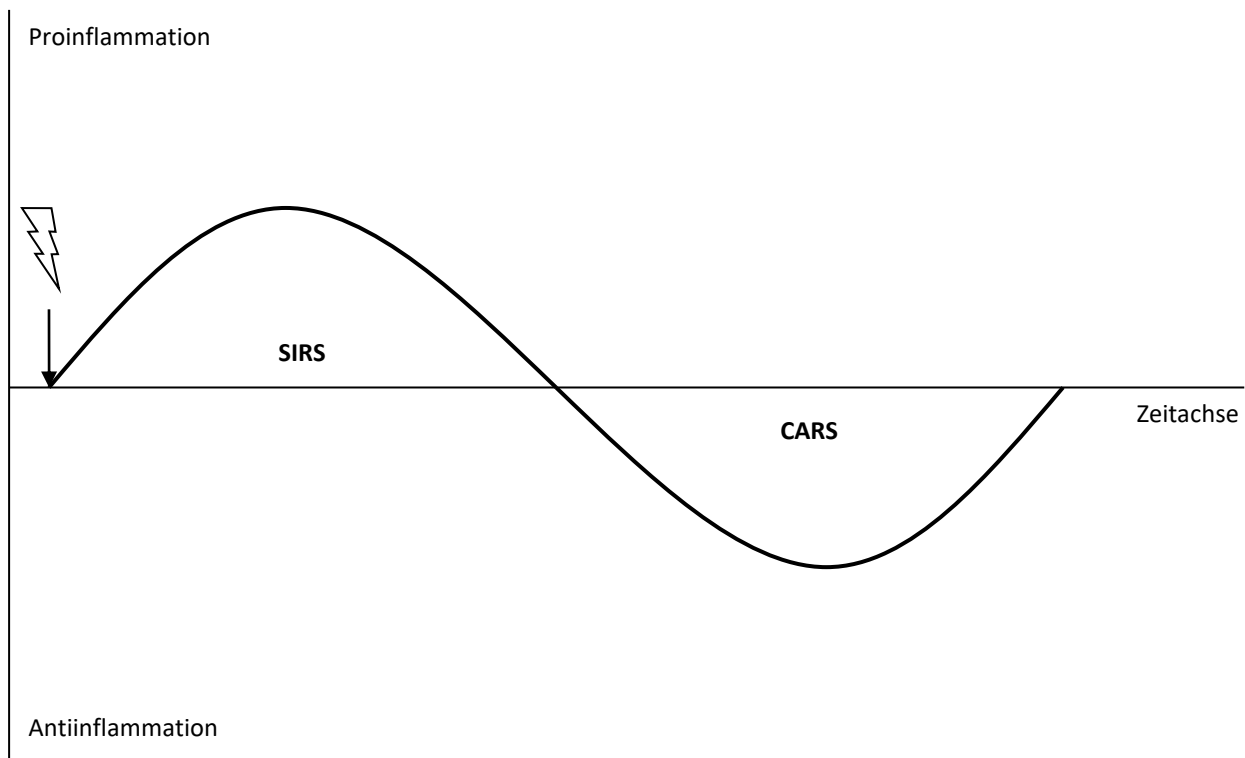
Klassischerweise teilt man diese Immunreaktion in zwei Phasen auf, was in Abbildung 1 dargestellt ist. Die erste Phase ist das *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS), welches eine hyperinflammatorische Reaktion darstellt. Das SIRS wurde im Rahmen der ersten Sepsis-Konsensusdefinition von Bone *et al.* als typische proinflammatorische Reaktion des Immunsystems auf einen Vielzahl an Stimuli beschrieben und mithilfe von klinisch einfach erhebbaren Parametern definiert [8]. Eine Übersicht der SIRS-Kriterien nach erster Sepsisdefinition [8] ist in Tabelle 1 zu finden.

**Tabelle 1 SIRS-Kriterien nach Bone *et al.* [8]**

Parameter	Ausprägung
Körpertemperatur	$\geq 38\text{ °C}$ oder $\leq 36\text{ °C}$
Herzfrequenz	$\geq 90 / \text{min}$
Atemfrequenz	$\geq 20 / \text{min}$ oder Hyperventilation bestätigt durch eine Blutgasanalyse
Blutbild	Leukozyten $> 12000 / \mu\text{l}$ oder $< 4000 / \mu\text{l}$ oder $> 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild

Auch wenn nach neuester Sepsisdefinition die SIRS-Kriterien in ihrer Bedeutung verloren haben [9], so ist das SIRS immer noch ein Indiz für eine schwere Erkrankung des Körpers mit großen Herausforderungen für das Immunsystem [10]. Diese Reaktion ist essentiell und dient der effektiven Pathogenabwehr, kann aber auch entgleisen und ein Multiorganversagen mit Todesfolge verursachen [8].

Als Gegenreaktion zum SIRS wird eine folgende antiinflammatorische Reaktion angesehen, die Bone *et al.* mit dem Begriff des *compensatory antiinflammatory response syndrome* (CARS) benannten [11]. Klassischerweise sah man in diesem die Möglichkeit, eine überschießende proinflammatorische Reaktion zu verhindern, was aber mit der Gefahr einer Immunparalyse und erhöhter Infektanfälligkeit einhergeht [1].



**Abbildung 1 Schematische Darstellung der Immunreaktion durch ein chirurgisches Trauma**

Abgewandelte Darstellung nach [1]. Ein chirurgisches Trauma (Dargestellt durch den Blitz) führt zu einer zweiphasigen Immunreaktion mit Überlappungen. Die initiale Reaktion ist das *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) mit proinflammatorischen Eigenschaften, welches durch das *compensatory antiinflammatory response syndrome* (CARS) mit antiinflammatorischen Eigenschaften ergänzt wird.

einsetzt, ist heutzutage nicht mehr haltbar. Im Jahr 2011 zeigten Xiao *et al.*, dass nach einem ausgeprägten Trauma und bei der Bekämpfung von Infektionen sowohl die Expression von Genen des SIRS als auch von Genen des CARS schnell gesteigert wird [12]. Das von ihnen vorgeschlagene Modell mit dem gleichzeitigen Einsetzen der pro- und antiinflammatorischen Reaktion wurde von Gentile *et al.* weiterentwickelt. Diese beobachteten, dass Patienten Dank der heutigen Möglichkeiten der Intensivmedizin zwar häufig die kritische erste Phase der Inflammation überleben, aber eine prolongierte Rekonvaleszenz haben mit sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Episoden und deutlichem Katabolismus. Um dieses Syndrom zu beschreiben, prägten sie den Begriff des Syndroms der persistierenden Entzündung, Immunsuppression und des persistierenden Katabolismus (*PICS – persistent inflammation/immunosuppression catabolism syndrome*), welches mit einer verlängerten Behandlungsdauer, vermehrten sekundären Infektionen und erhöhter Mortalität einhergeht [2]. Die optimale Behandlung von Patienten mit PICS ist aktuell noch unklar [2].

Zwar ist die Modellvorstellung der Immunantwort nach einem Trauma im Wandel, aber dennoch sind verschiedene Aspekte der postoperativen Immunreaktion beschrieben, auch wenn oft der pathophysiologische Hintergrund unklar bleibt.

Es konnte gezeigt werden, dass jedes Trauma oder jede Operation eine Stressreaktion hervorruft mit vermehrter Freisetzung von Glucocorticoiden [13], welche durch proinflammatorische Zytokine verstärkt wird. Die proinflammatorische Reaktion ist geprägt durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin- (IL-) 1, IL-6 oder Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) [14]. Das angeborene Immunsystem reagiert überdies frühzeitig mit einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten und Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems [15]. Bekannte immunsuppressive Faktoren nach chirurgischen Eingriffen oder Traumata sind eine erhöhte Apoptose von T-Zellen [16] mit einer Verschiebung in Richtung regulatorisch wirkender T-Zellen, die vor allem eine Immunhomöostase sichern sollen [17]. IL-10 wird vermehrt ausgeschüttet und wirkt antiinflammatorisch über die Verringerung der Produktion proinflammatorischer Zytokine, einer Begrenzung der Phagozytoseaktivität und der Reduktion der Antigenpräsentation [18]. Die Kapazität der Antigenpräsentation lässt sich durch die Expression des humanen Leukozytenantigens DR (HLA-DR), beziehungsweise des *Major Histocompatibility Complex Class II* (MHCII), auf Monozyten darstellen, wobei eine verringerte Expression mit der Wahrscheinlichkeit einer Sepsisentwicklung und Komplikationen korreliert [19, 20]. Außerdem konnten Lachmann *et al.* zeigen, dass Monozyten auf einen zweiten Stimulus keine adäquate Zytokinproduktion ausführen, um diesem zu begegnen, sie waren also anerg [21]. Auch die MHCII-Expression auf dendritischen Zellen ist eingeschränkt [22]. Aus der Sepsisforschung ist bekannt, dass der Tryptophankatabolismus mit dem Schlüsselenzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), immunmodulatorisch wirkt [23], wobei dies bisher noch nicht für operative Traumata überprüft wurde. Insgesamt zeigen die vorliegenden Studien häufig nur einen kleinen Ausschnitt der stattfindenden Immunreaktion, sodass eine allumfassendere Analyse dieser nötig ist.

Das Verständnis der Pathophysiologie der postoperativen Immunalterationen ist wichtig, um eine optimale Therapie zu entwickeln, da geschätzt wird, dass 2018 immer noch weltweit circa 8 Millionen Menschen an den Folgen einer Operation verstarben [24]. Erste vielversprechende Therapiestrategien *in vivo* sind unter anderem die Gabe von Granulozyten-Monozyten Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) [25], INF- $\gamma$  [26] und eine perioperative Immunonutrition [27].

Dennoch muss betont werden, dass bisherigen Versuche der Behandlung der Immundysfunktion noch zu keinen allgemeingültigen Therapieempfehlungen führten, da häufig groß angelegte, randomisierte, doppelblinde Studien fehlen.

## 2 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Dissertation hat zum Ziel, die Immundysfunktion nach einem viszeralchirurgischen Eingriff bei Mäusen über einen Zeitraum von drei bis 72 Stunden zu analysieren, um zu untersuchen, ob diese vergleichbar mit der humanen Immunreaktion ist. Hierbei werden sowohl Aspekte des angeborenen und erworbenen Immunsystems als auch des Tryptophankatabolismus genauer beschrieben. Ein besonderes Augenmerk liegt auf der Kinetik der Immunreaktionen, damit man eine primäre pro- und antiinflammatorische Reaktion trennen kann, da dies voraussichtlich therapeutische Konsequenzen hat. Die Frage, ob der Auslöser der Immunreaktion ein septischer oder aseptischer Stimulus ist, muss beantwortet werden, um die Notwendigkeit einer antibiotischen Therapie zu evaluieren.

Darüber hinaus soll untersucht werden, inwiefern die Manipulation des Darmes eine zusätzliche Alterationen des Immunsystems auslöst, die nicht durch die Anästhesie und den Hautschnitt erklärbar ist, weswegen als Vergleichsgruppe sowohl unbehandelte als auch laparotomierte Tiere genutzt werden.

Langfristig soll ein valides Tiermodell der postoperativen Immunalterationen erzeugt werden, welches einerseits die Grundlagenforschung der Immundysfunktion erlaubt und andererseits genutzt werden kann, um therapeutische Strategien zu entwickeln.

### 3 Material

#### 3.1 Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
Analysenwaage BP 110 S	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav	Systec GmbH, Wettenberg
Bechergläser	Kavalierglass, Prag (Tschechische Republik)
CO <sub>2</sub> -Inkubator CB 150	Binder GmbH, Tuttlingen
Digitalwaage PT1200	Sartorius AG, Göttingen
Durchflusszytometer LSR II	Becton Dickinson, New Jersey (USA)
Eismaschine	Manitowoc Foodservice, New Port Richey (USA)
ELISA-Reader Tecan Infinite M200 Pro	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
Infrarotlichtlampe LPB 300	interHeat, Seongnam (Korea)
Laborschüttler S410	MLW, Leipzig
Mausinkubator Scantainer	Scanbur-BK, Karlslunde(Dänemark)
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Präparierbesteck	
Schere, Pinzette, Nadelhalter	Aesculap, Tuttlingen
Precellys 24 Homogenisator	Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux (Frankreich)
Sterilwerkbank	
Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Hera Save HS 12	Heraeus Instruments, Hanau
Thermometer AZ8851	AZ Instrument, Taichung City (Taiwan)
Thermometersonde RET-3	Physitemp Instruments, Clifton (USA)
Tiefkühlschrank -80°C	Hans-siehe Schröder GmbH, Hamburg
Ultraschallgerät	VWR International, Radnor (USA)
Vet Scan HM5	Abraxis, Union City (USA)
Vortexer	VWR International, Radnor (USA)
Wärmeplatte Thermolux	Witte + Sutor, Murrhardt
Zentrifugen	
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-Loch-Platten, Cellstar, U-Bottom	Greiner bio-one, Kremsmünster (Österreich)
BD™ Columbia Agar	BD, Heidelberg
BD TruCOUNT™ Tubes	BD, Heidelberg
Chirurgisches Nahtmaterial	
Polyester weiß 4/0	Catgut GmbH, Markneukirchen
Coated Vicryl 5/0	Ethicon Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt
EDTA Röhrchen (1,6 mg EDTA/ml Blut)	Sarstedt, Nümbrecht
End-to-End-Kapillare (20 µl, K2E)	Sarstedt, Nümbrecht
FACS™-Röhrchen	BD, Heidelberg
Falcon Röhrchen (15 ml / 50 ml)	BD, Heidelberg
Kanülen (20G)	BD, Heidelberg
Klebefolie für Mikrotiterplatten	Excel Scientific, Wrightwood (USA)
Leukoplast	BSN Medical, Hannover
Lithium-Heparin 1,3 ml Microtubes	Sarstedt, Nümbrecht
Mullkompressen (5 x 5 cm)	Fuhrmann GmbH, Much
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Illinois (USA)
Peha-soft Nitril-Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Petrischalen (10 cm Durchmesser)	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Precellys Ceramic Kit 1,4 / 2,8 mm	
2 ml Tubes	Peqlab, Erlangen
Reaktionsgefäße	
0,5 ml/ 1,5 ml/ 2 ml/ 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Spritzen	
0,5 ml Tuberculin Syringe	Becton Dickinson, New Jersey (USA)
1 ml Luer-Lok™ Syringe	BD, Heidelberg
1 ml Micro-Fine™ 29G	BD Medical, Le Pont de Claix Cedex(Frankreich)
5 ml Luer Lock Solo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Braun INJEKT Spritzen (10 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Tierfutter (M-Z Extrudat V1126)	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Wattestäbchen, steril	Heinz Herenz Medizinbedarf GmbH, Hamburg
Zellsieb (70 µm)	BD, Heidelberg

### 3.3 Reagenzien und Chemikalien

Reagenz / Chemikalie	Hersteller
Aqua bidest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
BD™ CompBeads	BD, Heidelberg
BD FACS™ Clean Solution	BD, Heidelberg
BD FACS Flow™ Sheath Fluid	BD, Heidelberg
BD FACS™ Rinse Solution	BD, Heidelberg
Ethanol 70%, MEK-vergällt	Universitätsapotheke, Greifswald
LPS E.coli 055:B5	Sigma-Aldrich, St. Luis (USA)
Natriumchlorid-Lösung, 0,9%	Berlin-Chemie, Berlin
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Sigma-Aldrich, St. Luis (USA)
RBC Lyse-Puffer (10x)	Biolegend, San Diego (USA)
Vaseline elkos body	EDEKA Zentrale AG & Co KG, Hamburg

### 3.4 Puffer, Medien und Lösungen

#### 3.4.1 Narkose – Ketamin/Xylazin-Injektionslösung

Ingredienzien	Hersteller
8,5 ml Natriumchlorid-Lösung 0,9 %	Berlin-Chemie, Berlin
1 ml Ketamin (100 mg/ml)	Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn Hochzolling
0,5 ml Xylazin (20 mg/ml)	Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn Hochzolling
Dosierung: 10 µl pro g KG	

#### 3.4.2 Medium für Splenozyten-Stimulation

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

#### 3.4.3 Puffer für die Durchflusszytometrie

Ingredienzien	Hersteller
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup>	Sigma-Aldrich, St. Luis (USA)
2 % FCS	Biochrom, Berlin
2 mM EDTA	200 mM, neoLab Migge, Heidelberg



### 3.5 Kits

Kit	Hersteller	Katalognummer
Maus/Ratte Soluble Protein Master Buffer Kit	BD Heidelberg	558267
CBA FlexSet Maus IL-1 $\beta$	BD Heidelberg	560232
CBA FlexSet Maus IL-2	BD Heidelberg	558297
CBA FlexSet Maus IL-4	BD Heidelberg	558298
CBA FlexSet Maus IL-6	BD Heidelberg	558301
CBA FlexSet Maus IL-10	BD Heidelberg	558300
CBA FlexSet Maus IL-12p70	BD Heidelberg	558303
CBA FlexSet Maus IL-17A	BD Heidelberg	560283
CBA FlexSet Maus TNF- $\alpha$	BD Heidelberg	558299
CBA FlexSet Maus INF- $\gamma$	BD Heidelberg	558296
HMGB1 ELISA	IBL International GmbH, Hamburg	ST51011
Corticosteron (Ratte/Maus) ELISA	DRG Instruments GmbH, Marburg	EIA-5186
Ratte Control (Fertility / Pregnancy)	DRG Instruments GmbH, Marburg	CTL-5262

### 3.6 Antikörper

Spezifität	Konjugat	Wirt	Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller	Verdünnung
7-AAD					50 $\mu$ g/ml	Biolegend 420403	
Anti-Arm. & Syrian Hamster IG	Biotin				0,5 mg/ml	BD 554010	1:200
B220	V500	Ratte	IgG2a, $\kappa$	RA3-6B2	0,2 mg/ml	BD 561226	1:50
CD3e	V500	Hamster	IgG2, $\kappa$	500A2	0,2 mg/ml	BD 560771	1:50
CD4	A700	Ratte	IgG2a, $\kappa$	GK1.5	0,5 mg/ml	Biolegend 100536	1:50
CD4	FITC	Ratte	IgG2b, $\kappa$	L3T4	0,5 mg/ml	BD 553729	1:50
CD4	PE	Ratte	IgG2a, $\kappa$	RM4-5	0,2 mg/ml	BD 553049	1:500
CD8a	Biotin	Ratte	IgG2a, $\kappa$	53-6.7	0,5 mg/ml	Biolegend 100704	1:50
CD11b	APC- A780	Ratte	IgG2b, $\kappa$	M1/70	0,2 mg/ml	eBioscience 47-0112-82	1:50
CD11b	V450	Ratte	IgG2b, $\kappa$	M1/70	0,2 mg/ml	BD 560455	1:200
CD11c	FITC	Arm. Hamster	IgG1, $\lambda$ 2	HL3	0,5 mg/ml	BD 557400	1:50

## Material

Spezifität	Konjugat	Wirt	Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller	Verdünnung
CD19	A647	Ratte	IgG2a, κ	eBio1D3	0,2 mg/ml	eBioscience 51-0193-82	1:100
CD25	PE-Cy7	Ratte	IgG1, λ	PC61.5	0,2 mg/ml	eBioscience 25-0251-82	1:50
CD25-iso	PE-Cy7	Ratte	IgG1, λ	EBRG1	0,2 mg/ml	eBioscience 25-4301	1:50
CD49b	FITC	Ratte	IgM, κ	DX5	0,5 mg/ml	Pharminge n 09944D	1:50
CD 69	PE	Arm. Hamster	IgG1, λ3	H1.2F3	0,2 mg/ml	BD 553237	1:50
CD 69-iso	PE	Arm. Hamster	IgG1, λ3	G235- 2356	0,2 mg/ml	BD 553954	1:50
CTLA-4	pure	Hamster	IgG1, κ	UC10- 4F10-11	0,5 mg/ml	BD 553719	1:50
CTLA-4-iso	pure	Hamster	IgG1, κ	A19-3	0,5 mg/ml	BD 553969	1:50
Fc-Block						Miltenyi 130-092- 575	
FoxP3	APC	Maus	IgG1	3G3	Keine Angabe	Miltenyi 130-093- 013	1:12,5
Ly6G	V450	Ratte	IgG2a, κ	1A8	0,2 mg/ml	BD 560603	1:200
MHCII	Biotin	Ratte	IgG2b, κ	M5/114. 15.2	0,5 mg/ml	eBioscience 13-5321-82	1:200
MHCII-iso	Biotin	Ratte	IgG2b, κ	eB149/1 OH5	0,5 mg/ml	eBioscience 13-4031-85	1:200
NK1.1	PE	Ratte	IgG2a, κ	PK136	0,2 mg/ml	eBioscience 12-5941-82	1:50
Streptavidin	PE				0,2 mg/ml	eBioscience 12-4317	1:200
Streptavidin	PE-Cy7				0,2 mg/ml	eBioscience 25-4317-82	1:500

### 3.7 Programme

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
EndNote X7	Clarivate Analytics, Philadelphia (USA)
FACS Diva Software v6.2	BD Biosciences, San Jose (USA)
FCAP Array v3.0.1	Soft Flow, Pécs (Ungarn)
FlowJo v10.2	Tree Star Inc., Ashland (USA)
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., San Diego (USA)
Microsoft Excel 2007	Microsoft, Redmond (USA)
Microsoft Word 2007	Microsoft, Redmond (USA)

## 4 Methoden

### 4.1 Tierexperimentelle Methoden

#### 4.1.1 Tierhaltung und Zucht

Die Versuche wurden mit weiblichen C57BL/6N Mäusen im Alter von zehn bis zwölf Wochen durchgeführt. Das Körpergewicht (KG) der Mäuse lag mindestens bei 20 g. Die Zucht und Tierhaltung erfolgte durch das Institut der Immunologie und Transfusionsmedizin, Abteilung Immunologie, der Universitätsmedizin Greifswald in den Räumlichkeiten des BioTechnikums (Walther-Rathenau-Straße 49, 17489 Greifswald) unter konventionellen Bedingungen. Die Tiere wurden im offenen Käfig mit Einstreu und Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum* gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug zwölf Stunden. Alle Tierversuche wurden unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes nach Genehmigung durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V /TSD/7221.3-1.1-048/15) durchgeführt.

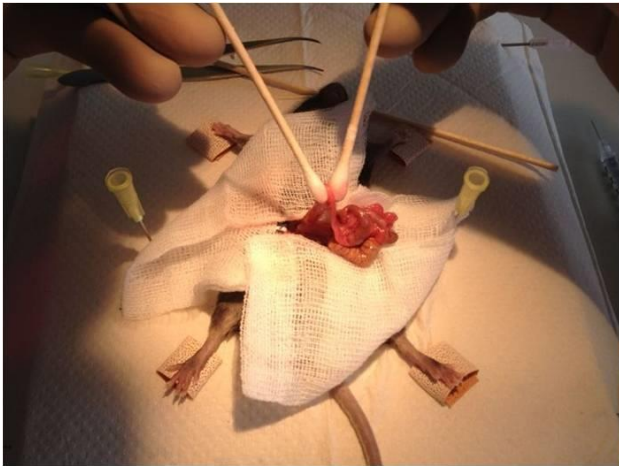
#### 4.1.2 Operationsvorbereitung und Narkotisierung

Vor Beginn der Narkose wurde jedes Tier gewogen und die Körpertemperatur wurde rektal bestimmt. Zur Narkotisierung wurde den Tieren intraperitoneal die Ketamin/Xylazin-Narkose appliziert (10 µl pro g KG). Durchgeführt wurden die Operationen auf Wärmeplatten, auf denen die Mäuse in Rückenlage mit Leukoplast an den Extremitäten fixiert wurden. Zur Desinfektion des Abdomens diente 70 %-iges Ethanol.

#### 4.1.3 *Surgically-induced immune dysfunction*

Das chirurgische Trauma wurde mit Hilfe des Modells der *surgically-induced immune dysfunction* (SID) erzeugt in Anlehnung an das Ileusmodell der Arbeitsgruppe Kalff *et al.* [28]. Nach Vorbereitung der Tiere erfolgte eine Mittellinien-Laparotomie mit ca. 2 cm langem Hautschnitt, gefolgt von der Durchtrennung des Peritoneums entlang der *Linea alba*. Die Umgebung des Schnittes wurde mit Kochsalzlösung-angefeuchteten Mullkompressen abgedeckt. Mit Hilfe von zwei befeuchteten sterilen Wattestäbchen wurde das Zäkum auf die Mullkompressen mobilisiert. Ausgehend vom Zäkum erfolgte die Verlagerung des Dünndarms bis zum Treitz-Band vor die Bauchdecke. Der freigelegte Dünndarm wurde dreimalig mit rollenden Bewegungen zwischen den Wattestäbchen antegrad bis zum Zäkum ausgestrichen (Abbildung 2). Besonderes Augenmerk lag hierbei auf der Schonung der Gefäße im Peritoneum und im Darm. Anschließend folgte die Rückverlegung des Darms in umgekehrter Reihenfolge. Zum Ausgleich der Flüssigkeitsverluste wurde 500 µl 0,9%-ige Kochsalzlösung in die Bauchhöhle appliziert. Der Verschluss des

Peritoneums wurde mit Hilfe einer fortlaufenden Naht durch einen resorbierbaren 5/0 Faden gewährleistet. Der Hautverschluss erfolgte in gleicher Technik mit einem 4/0 Polyesterfaden.



**Abbildung 2 Ausstreichen des Darms während der *surgically-induced immune dysfunction***

Nach Eröffnung der Bauchhöhle mittels einer Mittellinien-Laparotomie erfolgte die Mobilisation des Dünndarms vor die Bauchdecke. Der Dünndarm wurde dreimalig antegrad mit Hilfe der Wattestäbchen ausgestrichen. Nach Rückverlagerung des Darms und dem Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes erfolgte ein zweischichtiger Verschluss.

#### **4.1.4 Laparotomie**

Die Tiere der Laparotomiegruppe erhielten ebenfalls eine ca. 2 cm lange Mittellinien-Laparotomie mit Eröffnung der Bauchhöhle. Die Bauchhöhle blieb für 20 Minuten offen, bevor es zur Flüssigkeitssubstitution mit 500 µl 0,9 %-iger Kochsalzlösung kam. Der zweischichtige Verschluss erfolgte analog zu 4.1.3.

#### **4.1.5 Postoperative Überwachung und Beurteilung der Belastung**

Das Aufwachen der Tiere erfolgte in gruppengetrennten Käfigen unter einer Rotlichtlampe. Zum Schutz vor Überhitzung wurde die Käfigtemperatur auf 37 °C eingestellt.

Postoperativ wurden die Tiere dreimal täglich im Abstand von sechs Stunden bewertet. Die Beurteilung bestand aus Messung der Körpertemperatur und des Körpergewichts sowie der Bestimmung eines Belastungsscores (Tabelle 2, abgewandelt nach Zantl *et al.* [29]). Bei einem Summenbelastungsscore  $\geq 9$  wären die Tiere unter Ketamin/Xylazin-Narkose durch zervikale Dislokation getötet worden.

**Tabelle 2 Belastungsscore zur Beurteilung der Tiere nach operativen Eingriffen**

Die Beurteilung der Mäuse erfolgte dreimal täglich im Abstand von 6 h anhand unten genannter Kriterien. Ein Summenbelastungsscore  $\geq 9$  führte zur Tötung des Tieres unter Ketamin/Xylazin-Narkose mittels zervikaler Dislokation. Abgewandelt nach [29].

Parameter	Bewertung	Punkte
Erscheinungsbild	normal, gepflegt	0
	gesträubtes Fell	1
	nasses Fell	2
	schleimige Augen	3
Atmung	normal	0
	beschleunigt	1
	schwer	2
	schwach	3
Spontanverhalten	normal, lebhaft, neugierig	0
	verlangsamt, sitzende Haltung	1
	träge, schwankender Gang	2
	Seitenlage	3
Provoziertes Verhalten	flieht bei Käfigöffnung	0
	fliegt bei Annäherung	1
	flieht bei Berührung	2
	flieht nicht	3
Kotverhalten/-beschaffenheit	viel Kot im Käfig, Koten bei Untersuchung	0
	viel blutiger, schleimiger Kot	1
	wenig Kot im Käfig	2
	kein frischer Kot im Käfig	3

#### 4.1.6 Blutentnahme und -aufarbeitung

Die Blutentnahme wurde unter Ketamin/Xylazin-Narkose zum Zeitpunkt der jeweiligen Organentnahme durchgeführt. Mit Hilfe einer 20  $\mu$ l EDTA-*End-to-End*-Kapillare wurde der retroorbitale Plexus punktiert und somit ca. 2 ml Blut entnommen. Drei Tropfen Blut (40-50  $\mu$ l) wurden in einem Lithium-Heparin-Röhrchen aufgefangen, welches im Anschluss für die Bakteriologie genutzt wurde. Weitere 400  $\mu$ l Blut wurden in ein EDTA-Gefäß gegeben. Nach ausreichender Antikoagulation wurden 350  $\mu$ l Blut aus dem EDTA-Gefäß in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. 50  $\mu$ l verblieben im EDTA-Gefäß für eine spätere Analyse des Blutbilds mit Hilfe des VetScans HM5. Das restliche Blut wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Im Anschluss wurden die 1,5 ml Reaktionsgefäße bei 16.000  $\times g$  für 6 min zentrifugiert, um EDTA-Plasma bzw. Serum zu gewinnen. Die Überstände wurden erneut in 1,5 ml Reaktionsgefäße

überführt und die Zentrifugation wurde wiederholt. 110 µl EDTA-Plasma wurde für die Analyse des Tryptophan-Stoffwechsels genutzt. Das Serum wurde à 40 µl in 0,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, welche für die Serumzytokinbestimmung und den Corticosteron-ELISA genutzt wurden. Übrige EDTA-Plasma- bzw. Serumproben wurden ebenfalls à 40 µl aliquotiert und als Rest gesammelt. Das EDTA- und Lithium-Heparin-Vollblut wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Die restlichen Blutproben wurden bei -80 °C eingefroren.

#### **4.1.7 Peritoneallavage und Organentnahme**

Die Organentnahme fand 3 h, 6 h, 24 h bzw. 72 h nach dem operativen Eingriff statt. Nach der Narkotisierung und Blutentnahme wurden die Mäuse schmerzfrei durch zervikale Dislokation getötet.

Um die Peritoneallavage und Organentnahme unter sterilen Bedingungen durchzuführen, wurden die Tiere mit 70 %-igem Alkohol desinfiziert. Die nachfolgenden Schritte fanden unter einer Sterilbank statt.

Für die Peritoneallavage wurde zunächst die Bauchhaut der Mäuse mit Hilfe einer Schere durchtrennt. Bei unbehandelten Tieren geschah dies kreuzförmig. Operierte Tiere erhielten einen U-förmigen Schnitt um die Operationswunde und davon ausgehend zwei querverlaufende Schnitte zu den Seiten hin. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf der Unversehrtheit des Peritoneums. Im Anschluss wurden 10 ml eiskaltes, steriles PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  mit Hilfe einer 20 G Kanüle in die Bauchhöhle gespritzt. Nach sorgfältiger Verteilung der Flüssigkeit wurde mit selbiger Spritze und Kanüle möglichst viel PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  zurückgewonnen. Die Lavage wurde in 15 ml Reagenzgefäßen aufgefangen und die Menge notiert. 150 µl der Lavage wurden zusätzlich in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß für die Bakteriologie abgefüllt, woraufhin beides, bis zur weiteren Benutzung, auf Eis gelagert wurde.

Folgend wurden Milz, Leber, die linke Niere und die Lunge entnommen. Von der Milz wurde ein ca. 2 mm x 2 mm x 2 mm großes Stück abgeschnitten und in ein Precellys Gefäß mit 1 ml sterilem PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gegeben. Die restliche Milz wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  plus 10 % FCS überführt. Zwei Leberteilstücke aus unterschiedlichen Lappen, die linke Niere und die Lunge wurden ebenfalls in Precellys Gefäße mit je 1 ml sterilem PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gegeben. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Organe auf Eis gelagert.

#### **4.1.8 Aufarbeitung der Peritoneallavage**

Die Peritoneallavage wurde für 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde die Lavage mit 10 ml FACS-Puffer gewaschen und wiederum wie oben

zentrifugiert. Ein weiteres Mal wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet wurde in 5 ml FACS-Puffer resuspendiert.

### **4.1.9 Isolation von murinen Splenozyten**

Die Milz wurde unter Spülung mit FACS-Puffer und Zuhilfenahme des Kolbens einer 5 ml Spritze durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb in ein 50 ml Falcon gedrückt, um eine Zellsuspension zu erhalten. Anschließend wurde die Suspension auf 35 ml mit FACS-Puffer aufgefüllt und für 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Folgend wurde zehnfach konzentrierter RBC-Lyse Puffer mit PBS vermischt, um eine einfache Konzentration zu erhalten, von der 5 ml zum Zellpellet gegeben wurde. Nach sorgfältigem Mischen inkubierte dies für 5 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln. Nach Zugabe von 20 ml FACS-Puffer kam es erneut zur oben genannten Zentrifugation. Folgend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml FACS-Puffer resuspendiert.

## **4.2 Zellbiologische Methoden**

### **4.2.1 Blutbildbestimmung**

Zur Bestimmung des Blutbildes wurde der VetScan HM5 genutzt. Dieser bestimmt aus 50 µl EDTA-Vollblut mit Hilfe von Impedanztechnologie und Spektrophotometrie vollautomatisch ein großes Differentialblutbild.

### **4.2.2 Bakteriologie**

Die bakterielle Last der Tiere wurde mit Hilfe einer bakteriologischen Analyse des Lithium-Heparin-Blutes, der Peritoneallavage, der Milz, der Leber, der Niere und der Lunge bestimmt. Die Durchführung erfolgte vollständig unter sterilen Bedingungen.

Als Vorbereitung zur Laparotomie wurden je Tier und Organ jeweils ein Precellys Gefäß mit 1 ml sterilem PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gefüllt. Die Organgewichte wurden bestimmt. Die Organe wurden folgend mit Hilfe des Precellys 24 Homogenisators für 15 Sekunden bei 5000 rpm homogenisiert, sodass eine Organsuspension entstand.

In einer 96-Loch-Rundbodenplatte wurde je Organ eine vierstufige 1:10 - Verdünnungsreihe angelegt, bei der jeweils 10 µl der Organsuspensionen, des Bluts bzw. der Peritoneallavage mit 90 µl sterilem PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gemischt wurden. Letztlich entstanden so die genutzten Verdünnungsstufen: 1, 1:10, 1:100 und 1:1000.

Je Organ und Tier wurde eine Blutagar-Platte geviertelt. Auf jedes Viertel wurde je dreimal 10 µl derselben Verdünnungsstufe aufgetropft, sodass auf der Platte schließlich alle Verdünnungsstufen eines Organs in Dreifachbestimmung dargestellt wurden.



Nach Eintrocknen der Tropfen wurden die Platten für 22 h bei 37 °C inkubiert.

Zur Auswertung der Platten wurde, je Verdünnungsstufe und Bestimmung, die Kolonienanzahl ausgezählt und der Mittelwert aus den drei Bestimmungen berechnet. Aus dem Mittelwert der Kolonienanzahl der Verdünnungsstufe, die mit den meisten Kolonien noch sicher auszählbar war, wurde mit Hilfe der Verdünnung und des Organgewichtes, bzw. bei Blut und Peritoneallavage des Volumens, die Anzahl an koloniebildenden Einheiten pro Gramm Organgewicht bzw. pro Milliliter Blut oder Peritoneallavage berechnet.

### 4.2.3 Lipopolysaccharid-Stimulation der Splenozyten

Um zu untersuchen, ob die Milzzellen auf einen inflammatorischen Stimulus hin *ex vivo* Zytokine ausschütten, wurde ein *second-hit*-Modell verwendet. Den *first-hit* stellte der operative Eingriff dar und der *second-hit* bestand aus einer Simulation mit E.coli Lipopolysaccharid (LPS).

Die Milzzellen wurden nach oben genanntem Protokoll gewonnen und aufgearbeitet. Nach der Zählung der Zellen (siehe 4.2.4.1) wurden  $1 \times 10^7$  Zellen entnommen und bei 300 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Medium für die Splenozytenstimulation resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Suspension (entsprechen  $1 \times 10^6$  Splenozyten) in sechs Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Drei dieser Vertiefungen dienten zur Kontrolle, indem ihnen jeweils weitere 100 µl Splenozytenmedium zugesetzt wurden. Die restlichen Vertiefungen wurden mit 1 µg / ml LPS stimuliert. Hierzu wurde zunächst aus der LPS-Stammlösung mit einer Konzentration von 1000 µg/ml durch Verdünnung mit Splenozytenmedium (1:500) eine Konzentration von 2 µg/ml erzeugt. 100 µl des verdünnten LPS wurde in die jeweiligen Löcher gegeben, sodass eine Endkonzentration von 1 µl/ml LPS in den Vertiefungen entstand.

Die Proben inkubierten für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach der Inkubation wurde die Platte für 10 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Von den Überständen wurden je drei Aliquote à 50 µl abgenommen und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

### 4.2.4 Durchflusszytometrische Methoden

#### 4.2.4.1 Zellzählung am Durchflusszytometer

Die Zellzahl von Peritoneallavage und Milz wurde mit *BD TruCount Beads* am Durchflusszytometer bestimmt. Mit Hilfe einer definierten Anzahl an *BD TruCount Beads* kann die Zellzahl in einer Suspension aus *BD TruCount Beads* und Probenmaterial bestimmt werden, da die Anzahl gezählter *BD TruCount Beads* in Relation zur Anzahl gezählter Zellen gesetzt wird.

Hierzu wurden die *BD TruCount Beads* mit 1 ml FACS-Puffer vermischt. Nach intensivem Mischen wurden 200 µl der Suspension entnommen und in einem FACS-Tube mit 20 µl der Zellsuspension

aus Milz- bzw. Lavagezellen vermischt. Am Durchflusszytometer wurden mindestens 20.000 Messereignisse gemessen und mit folgender Gleichung wurde die Zellzahl bestimmt.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = 50 \times \frac{\text{gemessene Zellzahl} \times \text{Beads pro } 200 \mu\text{l}}{\text{gemessene Beads}}$$

### 4.2.4.2 Bestimmung der Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz

Zur Analyse wurden die Milzzellen wie oben beschrieben aufgearbeitet. Die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen CD25, CD69 und gegen das *Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA4) bestimmt (Tabelle 3). Zur Identifikation von regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) als Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wurde ein Antikörper gegen das *Forkhead-Box-Protein P3* (FoxP3) genutzt. Auch diese Subpopulation wurde durch oben genannte Aktivitätsmarker weiter beschrieben.

Zunächst wurden je Färbung 2 x 10<sup>6</sup> Splenozyten entnommen und mit 2 ml FACS-Puffer bei 300 x g und 4 °C für 6 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes erfolgte die Zugabe von 1 µl Fc-Block und die Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Folgend wurden 50 µl des Antikörpergemischs zur extrazellulären Färbung (Tabelle 4) zugegeben und für 30 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Proben mit 2 ml FACS-Puffer für 6 min gewaschen (300 x g, 4 °C). Nach Verwerfen des Überstandes folgte die Fixierung und Permeabilisierung der Proben mittels 1 ml Fix- und Permlösung des *FoxP3 Staining Buffer Sets*. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Anschließend wurden die Probe erneut bei 300 x g und 4 °C für 6 min gewaschen, wobei der erste Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer und der zweite mit 1 ml Permeabilisierungspuffer durchgeführt wurde. Nach erneuter Blockung mit 1 µl Fc-Block (siehe oben) erfolgte die Zugabe des Antikörpergemischs zur intrazellulären Färbung (Tabelle 5, in Permeabilisierungspuffer) und die Inkubation für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Das Waschen mit 1 ml Permeabilisierungspuffer folgte (300 x g, 4 °C, 6 min). Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren mit 200 µl FACS-Puffer konnte Färbung 1 und 2 (Tabelle 3) am Durchflusszytometer LSR-II gemessen werden (100.000 Messereignisse). Der Überstand von Färbung 3 und 4 wurden ebenfalls verworfen und anschließend für 30 min mit dem Sekundärreagenzgemisch der intrazellulären Färbung (Tabelle 6, in Permeabilisierungspuffer) versetzt (4 °C, im Dunkeln). Erneut wurde mit 1 ml Permeabilisierungspuffer gewaschen (300 x g, 4 °C, 6 min). Nun wurden die Proben mit dem Tertiärreagenzgemisch (Tabelle 6, in Permeabilisierungspuffer) für 30 min inkubiert (4 °C, im Dunkeln). Ein letzter Waschschrift wurde mit 1 ml Permeabilisierungspuffer durchgeführt (300 x g, 4 °C, 6 min) und nach Verwerfen des Überstandes wurden die Proben in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Es folgte die Messung von

100.000 Messereignissen am Durchflusszytometer. Zur Analysestrategie mittels FlowJo siehe Anhang Abbildung 42.

### Tabelle 3 Übersicht über die Färbung zur Bestimmung des Aktivierungsstatus von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Als Aktivierungsmarker wurden CD25, CD69 und CTLA-4 genutzt. Eine Subpopulation wurde mit Hilfe von FoxP3 als regulatorische T-Zellen identifiziert und auch in ihrer Aktivität untersucht.

Färbung 1		Färbung 2	
CD4	FITC	CD4	FITC
CD11b	V450	CD11b	V450
CD25	PE-Cy7	CD25-iso	PE-Cy7
CD69	PE	CD69-iso	PE
FoxP3 <sup>1</sup>	APC	FoxP3 <sup>1</sup>	APC
Färbung 3		Färbung 4	
CD4	FITC	CD4	FITC
CD11b	V450	CD11b	V450
CTLA-4 <sup>1,2</sup>	PE	CTLA-4-iso <sup>1,2</sup>	PE
FoxP3 <sup>1</sup>	APC	FoxP3 <sup>1</sup>	APC

<sup>1</sup> intrazelluläre / intranukleäre Färbung

<sup>2</sup> Sekundärreagenz anti-Hamster Ig Biotin, Tertiärreagenz Streptavidin PE

### Tabelle 4 Antikörper der extrazellulären Färbung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung

Spezifität	Konjugat	Wirt	Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller	Verdünnung
CD4 <sup>1,2</sup>	FITC	Ratte	IgG2b, κ	L3T4	0,5 mg/ml	BD 553729	1:50
CD11b <sup>1,2</sup>	V450	Ratte	IgG2b, κ	M1/70	0,2 mg/ml	BD 560455	1:200
CD25 <sup>1</sup>	PE-Cy7	Ratte	IgG1, λ	PC61.5	0,2 mg/ml	eBioscience 25-0251-82	1:50
CD25-iso <sup>1</sup>	PE-Cy7	Ratte	IgG1, λ	EBRG1	0,2 mg/ml	eBioscience 25-4301	1:50
CD 69 <sup>1</sup>	PE	Arm. Hamster	IgG1, λ3	H1.2F3	0,2 mg/ml	BD 553237	1:50
CD 69-iso <sup>1</sup>	PE	Arm. Hamster	IgG1, λ3	G235- 2356	0,2 mg/ml	BD 553954	1:50

<sup>1</sup> Färbung 1 / 2

<sup>2</sup> Färbung 3/ 4

**Tabelle 5 Antikörper der intrazellulären Färbung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung**

Spezifität	Konjugat	Wirt	Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller	Verdünnung
CTLA-4 <sup>2</sup>	pure	Hamster	IgG1, κ	UC10-4F10-11	0,5 mg/ml	BD 553719	1:50
CTLA-4-iso <sup>2</sup>	pure	Hamster	IgG1, κ	A19-3	0,5 mg/ml	BD 553969	1:50
FoxP3 <sup>1,2</sup>	APC	Maus	IgG1	3G3	Keine Angabe	Miltenyi 130-093-013	1:12,5

<sup>1</sup>Färbung 1 / 2<sup>2</sup>Färbung 3 / 4**Tabelle 6 Sekundär- / Tertiärreagenz der Färbung 3 / 4**

	Konjugat	Konzentration	Hersteller	Verdünnung
Anti-Arm. & Syrian Hamster IG	Biotin	0,5 mg/ml	BD 554010	1:200
Streptavidin	PE	0,2 mg/ml	eBioscience 12-4317	1:200

#### 4.2.4.3 Analyse verschiedener Zellpopulationen der Milz und Peritoneallavage

Diese extrazelluläre Färbung wurde genutzt, um B-Zellen (CD19<sup>+</sup> B220<sup>+</sup>), dendritische Zellen (CD11c<sup>high</sup>, MHCII<sup>+</sup>), neutrophile Granulozyten (Ly6G<sup>+</sup>) und Makrophagen (CD11b<sup>+</sup>) zu quantifizieren. Eine detaillierte Übersicht über die Färbung bietet Tabelle 7.

Jeweils 2 x 10<sup>6</sup> Zellen der Milz bzw. der Peritoneallavage wurden nach der Aufarbeitung (siehe 4.1.8 und 4.1.9) in 2 ml FACS-Puffer resuspendiert und bei 300 x g und 4 °C für 6 min gewaschen.

Nach Abkippen des Überstandes erfolgte die Fc-Blockade mit 1 µl Fc-Block für 5 min bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 50 µl des Primärantikörpergemischs (Tabelle 8) startete die Inkubationszeit von 30 min bei 4 °C im Kühlschrank.

Anschließend erfolgte das Waschen mit 1 ml FACS-Puffer (300 x g, 4 °C, 6 min) und erneutem Verwerfen des Überstandes. 50 µl des Sekundärreagenzgemischs (siehe Tabelle 9) wurden hinzugegeben und für 30 min bei 4 °C und Dunkelheit inkubiert.

Letztlich wurde erneut mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (300 x g, 4 °C, 6 min) und das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Messung von 100.000 Messereignissen erfolgt am LSR-II Durchflusszytometer. Zur Auswertung wurde FlowJo genutzt, wobei die Analysestrategie im Anhang Abbildung 43 dargestellt ist.

**Tabelle 7 Übersicht über die Färbungen zur Bestimmung verschiedener Zellpopulationen**

Anhand dieser Antikörper wurden B-Zellen (CD19<sup>+</sup> B220<sup>+</sup>), dendritische Zellen (CD11c<sup>high</sup>, MHCII<sup>+</sup>), neutrophile Granulozyten (Ly6G<sup>+</sup>) und Makrophagen (CD11b<sup>+</sup>) quantifiziert.

Färbung 5		Färbung 6	
B220	V500	B220	V500
CD4	PE	CD4	PE
CD11b	APC-A780	CD11b	APC-A780
CD11c	FITC	CD11c	FITC
CD19	A647	CD19	A647
Ly6G	V450	Ly6G	V450
MHCII <sup>1</sup>	PE-Cy7	MHCII-Iso <sup>1</sup>	PE-Cy7

<sup>1</sup> Sekundärreagenz Streptavidin

**Tabelle 8 Primärantikörper der extrazellulären Färbung verschiedener Zellpopulationen**

Spezifität	Konjugat	Wirt	Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller	Verdünnung
B220	V500	Ratte	IgG2a, κ	RA3-6B2	0,2 mg/ml	BD 561226	1:50
CD4	PE	Ratte	IgG2a, κ	RM4-5	0,2 mg/ml	BD 553049	1:500
CD11b	APC-A780	Ratte	IgG2b, κ	M1/70	0,2 mg/ml	eBioscience 47-0112-82	1:50
CD11c	FITC	Arm. Hamster	IgG1, λ2	HL3	0,5 mg/ml	BD 557400	1:50
CD19	A647	Ratte	IgG2a, κ	eBio1D3	0,2 mg/ml	eBioscience 51-0193-82	1:100
Ly6G	V450	Ratte	IgG2a, κ	1A8	0,2 mg/ml	BD 560603	1:200
MHCII	Biotin	Ratte	IgG2b, κ	M5/114.1 5.2	0,5 mg/ml	eBioscience 13-5321-82	1:200
MHCII-iso	Biotin	Ratte	IgG2b, κ	eB149/10 H5	0,5 mg/ml	eBioscience 13-4031-85	1:200

**Tabelle 9 Sekundärreagenz zur Analyse verschiedener Zellpopulationen und zur Analyse von NK –Zellen**

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

#### 4.2.4.4 Analyse der natürlichen Killerzellen in der Milz

Zur Analyse der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) wurde die in Tabelle 10 aufgeführte Färbung genutzt, wobei sie mit Hilfe eines Antikörpers gegen NK1.1 identifiziert wurden.

Pro Tier wurden  $2 \times 10^6$  aufgearbeitete Splenozyten aus der Suspension entnommen, mit 2 ml FACS-Puffer vermischt und bei  $300 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 6 min gewaschen. Das verbliebene Zellpellet wurde für 5 min mit  $1 \mu\text{l}$  Fc-Block bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin folgte die Zugabe von  $50 \mu\text{l}$  des Antikörpermastermixes (Tabelle 11) und eine Inkubation von 30 min im Kühlschrank.

Nach erneutem Waschen mit 1 ml FACS-Puffer ( $300 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 6 min) wurden  $50 \mu\text{l}$  des Sekundärreagenzmixes (Tabelle 9) für 30 min hinzugefügt ( $4^\circ\text{C}$ , dunkel).

Letztmalig wurde nach oben genanntem Schema gewaschen. Es folgte die Zugabe von  $5 \mu\text{l}$  7-AAD und die Inkubation für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunklen. Resuspendiert wurden die Proben mit  $200 \mu\text{l}$  FACS-Puffer und anschließend am LSR-II Durchflusszytometer gemessen (100.000 Messereignisse). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von FlowJo nach dem im Anhang Abbildung 44 befindlichen Schema.

#### Tabelle 10 Übersicht über die Färbung zur Analyse der NK-Zellen

Anhand dieser Antikörper wurden natürliche Killerzellen (NK1.1<sup>+</sup>) identifiziert.

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

<sup>1</sup> Sekundärreagenz Streptavidin

Tabelle 11 Primärantikörper der Analyse von NK-Zellen

Spezifität	Konjugat	Wirt	Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller	Verdünnung
CD3e	V500	Hamster	IgG2, κ	500A2	0,2 mg/ml	BD 560771	1:50
CD4	A700	Ratte	IgG2a, κ	GK1.5	0,5 mg/ml	Biolegend 100536	1:50
CD8a	Biotin	Ratte	IgG2a, κ	53-6.7	0,5 mg/ml	Biolegend 100704	1:50
CD11b	APC-A780	Ratte	IgG2a, κ	M1/70	0,2 mg/ml	eBioscience 47-0112-82	1:50
CD49b	FITC	Ratte	IgM, κ	DX5	0,5 mg/ml	Pharmingen 09944D	1:50
Ly6G	V450	Ratte	IgG2a, κ	1A8	0,2 mg/ml	BD 560603	1:200
NK1.1	PE	Ratte	IgG2a, κ	PK136	0,2 mg/ml	eBioscience 12-5941-82	1:50
7-AAD					50 µg/ml	Biolegend 420403	

#### 4.2.4.5 Untersuchung der Zytokinlevel im Serum und im Milzüberstand nach LPS-Stimulation

Zur Analyse der Zytokinlevel wurde ein *Cytometric bead array (CBA) Mouse Flex Set* genutzt, bei dem die Zytokine frei zusammenstellbar sind. Das gewählte CBA-Panel umfasste folgende Zytokine: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF-α und INF-γ. Zusätzlich fand noch das *Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit* Anwendung. Das Prinzip des CBA besteht darin, dass Fluoreszenz-markierte *Beads* einen Antikörper auf ihrer Oberfläche besitzen und mit diesem das Zielzytokin binden, wodurch dieses quantifiziert werden kann. Durch die Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe können mehrere Zielzytokine gleichzeitig aus einer Probe bestimmt werden. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität erfolgt mit Hilfe eines Durchflusszytometers. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Zunächst wurde der lyophilisierte Standard aller Zytokine in 4 ml *Assay-Diluent* vorsichtig resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur rekonstituiert, sodass der Topstandard entstand. Nach dieser Zeit wurde mit Hilfe des Topstandards und des *Assay-Diluents* eine achtstufige 1:2 - Verdünnungsreihe gebildet. Je 25 µl der Proben bzw. der Verdünnungsreihe wurden in die entsprechenden FACS-Röhrchen pipettiert. Aus den neun *Capture-Bead-Stocklösungen* und dem *Capture-Bead-Diluent* wurde der *Capture-Bead-Mix* gemischt, von dem je 25 µl zu den Proben gegeben wurden. Es folgte die Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur und sanftem Mischen auf einem Mikroplatten-Rüttler.

Zur Herstellung des *PE-Detection-Reagenz* wurden die *PE-Reagenz-Stocklösungen* mit *PE-Reagenz-Verdünnung* gemischt. Je 25 µl des *PE-Detection-Reagenz* wurden zu den Proben gegeben und für eine weitere Stunde bei gleichbleibenden Bedingungen inkubiert.

Zuletzt wurde mit 1 ml Waschpuffer bei 200 x g und 4 °C für 5 min gewaschen. Nach Absaugen des Überstandes konnten die Proben in 200 µl Waschpuffer resuspendiert werden.

Die anschließende Messung erfolgte am LSR - II Durchflusszytometer mit je 300 Messereignissen pro Zytokin. Zur Auswertung wurde FCAP - Array v3.0.1 genutzt.

### **4.2.5 Enzyme-linked immunosorbent assay zur Bestimmung des Corticosterons im Plasma bzw.**

#### **Serum**

Corticosteron wurde entweder im EDTA-Plasma oder im Serum der Mäuse mit einem *Enzyme-linked immunosorbent assay* - (ELISA) Kit nach Herstellerangaben bestimmt. Als Positivkontrolle dienten kommerziell erhältliche Kontrollen aus dem Serum der Ratte bei Fruchtbarkeit bzw. Schwangerschaft.

Zunächst wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte je 100 µl Inkubationspuffer gegeben. Danach wurden 10 µl der Proben, der Standardverdünnungen und der Positivkontrollen in die jeweilige Vertiefung gegeben, wobei alles als Dreifachansatz pipettiert wurde. Nach Zugabe von 50 µl Enzymkonjugat begann eine zweistündige Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf einem Mikroplatten-Rüttler.

Folgend wurde die Inkubationslösung verworfen und viermalig mit 300 µl Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen. Durch Zugabe von 200 µl Substratlösung startete die nächste Inkubationszeit für 30 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur.

Das Abstoppen der Reaktion gelang mit 50 µl einer Stopp-Lösung, woraufhin die Lichtabsorption am Tecan Infinite M2000 Pro bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen wurde.

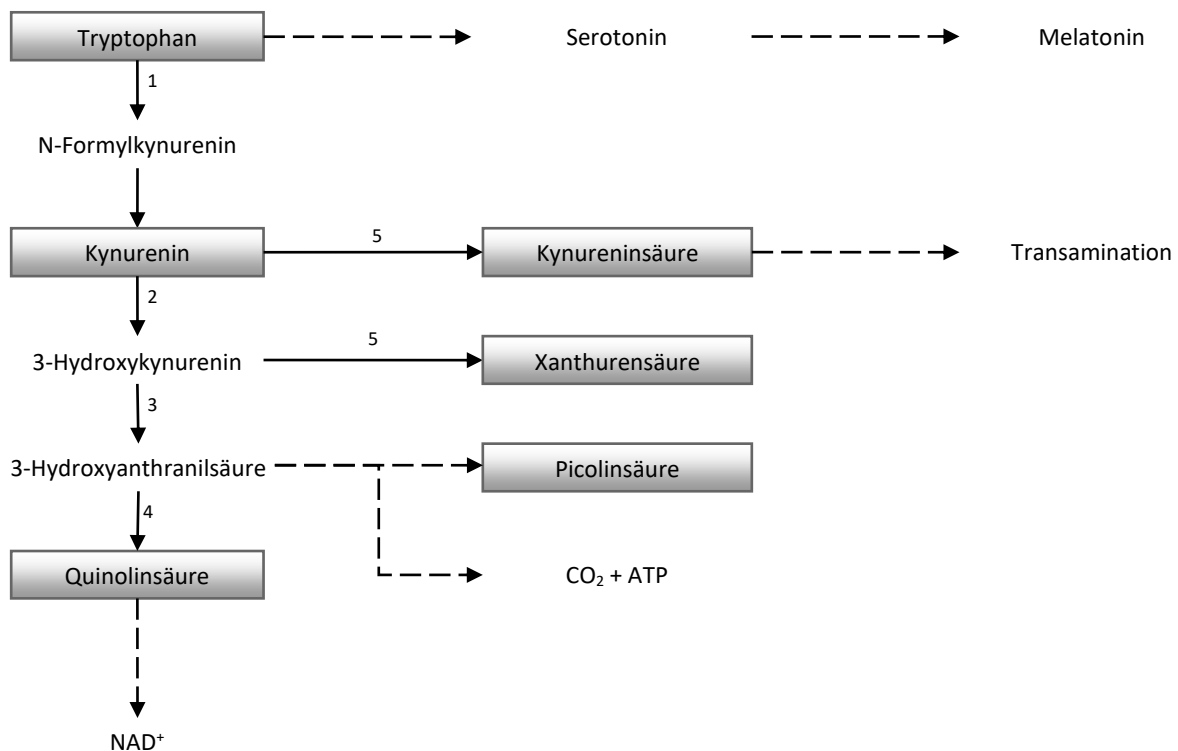
Die Regression der Durchschnittswerte wurde mittels 4-Parameter-Logistik mit Hilfe von GraphPad Prism 6 bestimmt. Für die weitere Auswertung wurden EDTA-Plasma- und Serumproben gleichwertig genutzt, da es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Probenotypen gab.

### **4.2.6 Bestimmung des Tryptophan-Katabolismus mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie**

Die Bestimmung des Tryptophan-Katabolismus mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. Grazyna Domanska des Institutes der Immunologie und Transfusionsmedizin, Abteilung Immunologie, der Universitätsmedizin Greifswald durchgeführt. Für ein genaues Protokoll siehe [30] (Modifiziert nach [31]).



Das Grundprinzip besteht darin, dass die EDTA-Proben zunächst mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie anhand ihrer Hydrophilie in Moleküle aufgetrennt werden. Diese können durch die Tandem-Massenspektrometrie durch ihrer Masse und Ladung identifiziert und quantifiziert werden. Die Untersuchten Moleküle waren Tryptophan, Kynurenin, Kynureninsäure, Quinolinsäure, Xanthurensäure und Picolinsäure. Die IDO-Aktivität wurde aus dem Quotienten des Kynurenins  $\times 100$  und des Tryptophans berechnet. Eine Übersicht über den Tryptophanmetabolismus zeigt Abbildung 3.



**Abbildung 3 Übersicht über den Tryptophanmetabolismus**

Dargestellt ist der Hauptabbauweg von Tryptophan über Kynurenin und Weitere zu Nikotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) und weitere Abbauege zu Melatonin, zur Transamination oder zur totalen Oxidation zu Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und Adenosintri-phosphat (ATP). Durchgezogene Linien sind jeweils eine enzymatische Reaktion, wohingegen gestrichelte Linien mehrere Reaktionsschritte darstellen. Die hervorgehoben Moleküle wurden in der Arbeit quantifiziert. 1 = Indolamin-2,3-Dioxygenase (ubiquitär) und Tryptophan-2,3-Dioxygenase (Leber), 2 = Kynurenin-3-Hydroxylase, 3 = Kynureninase, 4 = 3-Hydroxyanthranilsäure-Oxidase, 5 = Kynurenin-Aminotransferase. Modifiziert nach [3].

## 5 Ergebnisse

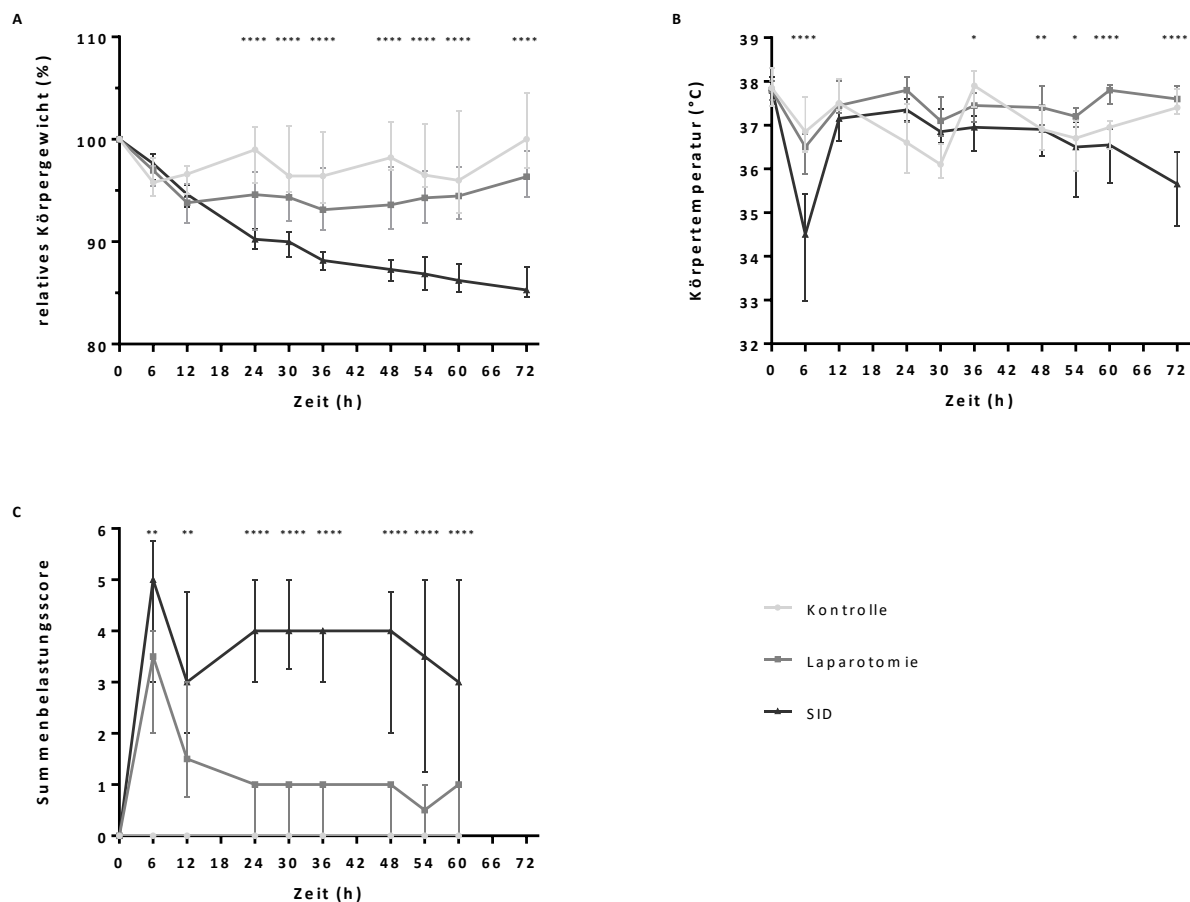
### 5.1 Belastung nach Laparotomie und SID

Der postoperative Verlauf wurden mit Hilfe eines Belastungsscores (Tabelle 2), der Körpertemperatur und des Körpergewicht bewertet.

Das relative Körpergewicht (Abbildung 4A), bezogen aufs Anfangsgewicht zum Zeitpunkt 0 h, nahm bis 12 h postoperativ sowohl bei den laparotomierten Tieren als auch bei den SID-operierten Tieren im Median um 5 bis 6 % ab. Im weiteren Verlauf stabilisierte sich das Gewicht der laparotomierten Tiere und ab 36 h postoperativ nahmen sie stetig zu. Im Gegenzug dazu sank das relative Körpergewicht der SID-operierten Tiere und erreichte ein Minimum nach 72 h mit einem medianen Wert von 85 % des Ausgangsgewichtes. Ab 24 h postoperativ bestand ein signifikanter Unterschied im relativen Körpergewicht zwischen laparotomierten und SID-operierten Tieren. Die tageszeitlichen Schwankungen des Körpergewichts, welche bei unbehandelten Kontrolltieren + / - 4 % betragen, konnten nach den operativen Eingriffen nicht beobachtet werden.

Die Körpertemperatur (Abbildung 4B) erreichte 6 h postoperativ ihr Minimum mit einem medianen Wert von 36,4 °C nach Laparotomie bzw. 34,2 °C nach SID, wobei dies ein signifikanter Unterschied war. Im weiteren Verlauf stabilisierte sich die Körpertemperatur in beiden Gruppen bis 36 h postoperativ. Danach kam es bei SID-operierten Tieren erneut zu einem Abfall der Körpertemperatur bis zu einem medianen Wert von 35,3 °C 72 h postoperativ, welcher bei laparotomierten Tieren nicht beobachtet wurde. Nur die Kontrolltiere wiesen eine tageszeitliche Schwankung in ihrer Körpertemperatur von + / - 1,8 °C auf.

Die Belastung ist in Abbildung 4C dargestellt. Sechs Stunden nach SID zeigten die Tiere die maximale Belastung mit einem Gesamtscore von 5 Punkten. Dieser war signifikant höher als nach Laparotomie, was sich im Verlauf fortsetzt. Die weitere mediane Belastung lag bei 4 Punkten. Folgend auf eine initiale Belastung von 3,5 Punkten nach Laparotomie, waren die Tiere mit einem Punkt belastet. Kontrolltiere zeigten während der gesamten Versuchszeit keine Belastung. Im gesamten Versuchszeitraum wurde keine Belastung  $\geq 9$  Punkte festgestellt, sodass kein Tier vorzeitig aus dem Versuch ausgeschieden ist.



**Abbildung 4 Belastung nach Laparotomie und SID**

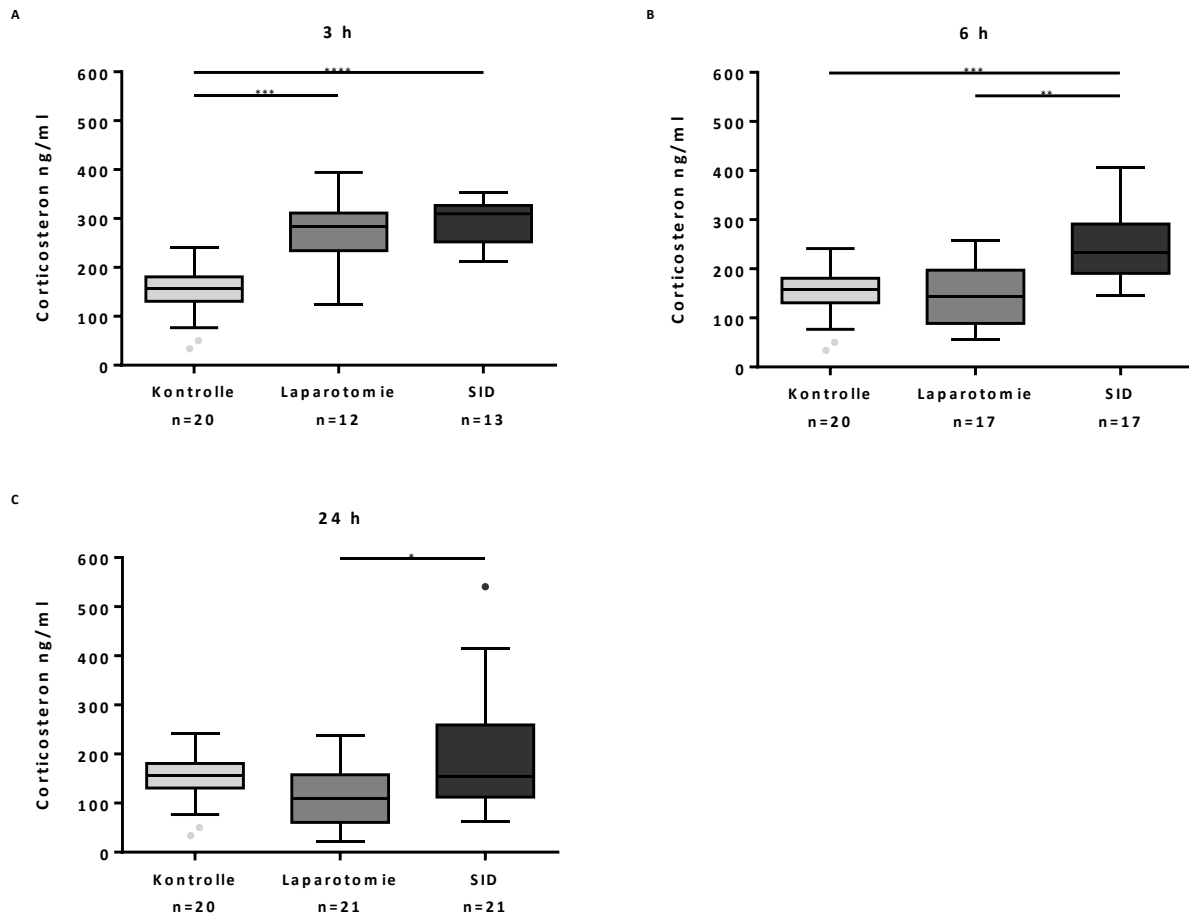
Die postoperative Belastung wurde anhand des relativen Körpergewichtes (**A**), der Körpertemperatur (**B**) und eines Summenbelastungsscores (**C**) bewertet. Auffällig ist hierbei, dass SID-operierte Tiere zum Ende des Beobachtungszeitraumes ein signifikant niedrigeres relatives Körpergewicht und eine niedrigere Körpertemperatur aufweisen als laparotomierte Tiere. Nach SID ist im Vergleich zur Laparotomie die Gesamtbelastung größer. Kontrolle n=6, Laparotomie n=22, SID n=20 je Zeitpunkt. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstand. Die Vergleiche zwischen Laparotomie und SID wurden mittels multiplen T-Tests auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Als weiterer Parameter, um die Belastung der Versuchstiere einzuschätzen, wurde das Level des Stresshormons Corticosteron mittels eines ELISAs bestimmt (4.2.5).

Zum 3 h-Zeitpunkt wiesen sowohl die SID-operierten als auch die laparotomierten Tiere eine signifikant erhöhte Corticosteron-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle auf (Abbildung 5A). Zu diesem Zeitpunkt wurde die maximale Corticosteron-Konzentration nach SID bzw. Laparotomie beobachtet.

Nach SID war die Elevation des Corticosteron-Levels auch noch zum 6 h-Zeitpunkt sichtbar, wobei dies nun auch signifikant gegenüber den laparotomierten Tieren erhöht war (Abbildung 5B).

Weiterhin blieb die Corticosteron-Konzentration 24 h nach SID gegenüber den laparotomierten Tieren signifikant erhöht (Abbildung 5C). Zum 72 h-Zeitpunkt waren keine signifikanten Gruppenunterschiede mehr zu erkennen (nicht dargestellt).



**Abbildung 5 Corticosteron-Konzentration nach operativen Eingriffen**

Die Bestimmung der Corticosteron-Konzentration erfolgte mittels eines ELISAs. Zum 3 h-Zeitpunkt (**A**) war die Corticosteron-Konzentration nach SID und nach Laparotomie im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Die Corticosteron-Konzentration blieb nach SID auch zum 6 h- (**B**) bzw. zum 24 h-Zeitpunkt (**C**) signifikant erhöht zur Kontrolle und Laparotomie bzw. nur zur Laparotomie. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in Box Plots mit Whiskers nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließend dem Dunn's multiple comparisons test auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

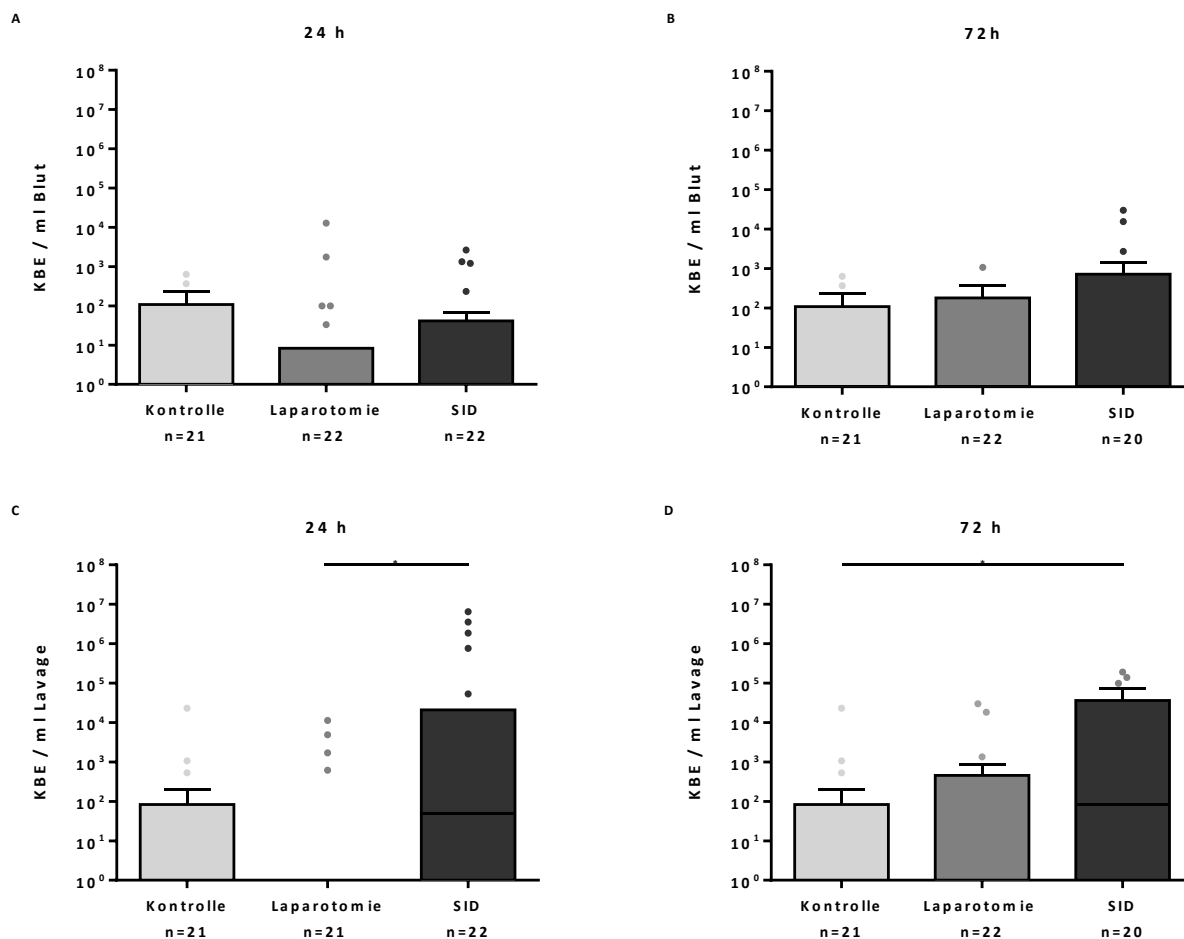
### 5.1.1 Bakterielle Belastung der Versuchstiere

Die bakterielle Belastung der Tiere wurde im Vollblut, in der Peritoneallavage, der Milz, der Niere, der Leber und der Lunge untersucht. Die bakterielle Last wurde als Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Milliliter Probenmaterial (Blut und Peritoneallavage) bzw. Gramm Organgewicht (Milz, Niere, Leber, Lunge) bestimmt.

Da es 3 h und 6 h nach SID keine signifikante Bakterielle Belastung im Untersuchungsmaterial gab, sind im Folgenden nur die Daten der Versuchszeitpunkte 24 h und 72 h dargestellt.

Das Blut der SID-operierten Tiere wies zu keinem Zeitpunkt nach SID eine signifikante bakterielle Last im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen auf (Abbildung 6A und B). Zum 24 h-Zeitpunkt wiesen 14 SID-Tiere gar keine bakterielle Belastung im Blut auf. Zum 72 h-Zeitpunkt waren dies 11 Tiere.

In der Peritoneallavage gab es zum 24 h-Zeitpunkt eine signifikant höhere bakterielle Belastung bei SID-operierten im Vergleich zu laparotomierten Tieren, allerdings nicht im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 6C). Nach 72 h war eine signifikante Belastung von im Median 492 KBE / ml Peritoneallavage der SID-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen (Abbildung 6D). Hierbei fiel eine deutliche Streuung der Werte auf (Min:0 KBE / ml, Max:4,3 x 10<sup>6</sup> KBE / ml) mit insgesamt 8 gar nicht belasteten Tieren nach SID.

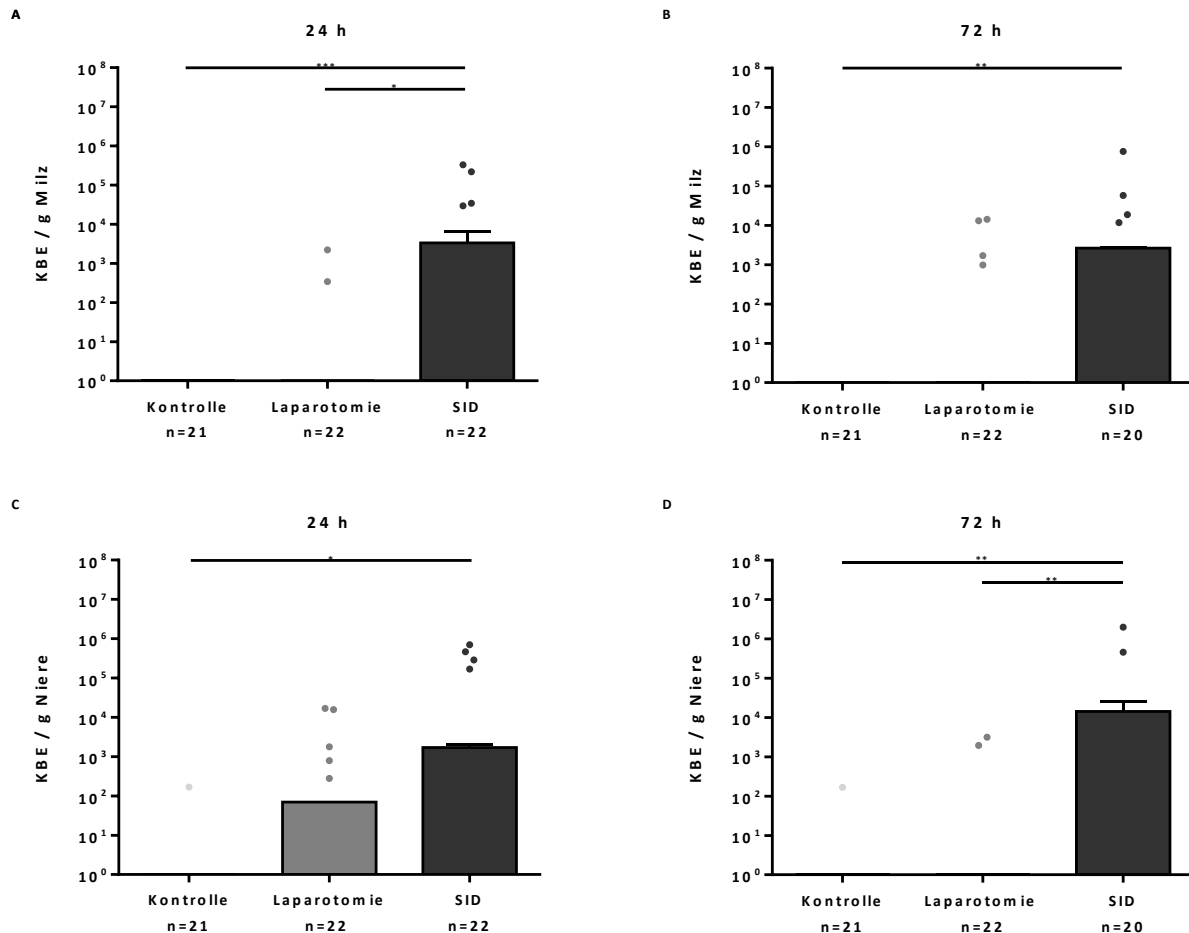


**Abbildung 6 Bakterielle Last von Blut und Peritoneallavage**

Die bakterielle Belastung ist als koloniebildende Einheiten (KBE) pro Milliliter (Blut, Peritoneallavage), bzw. pro Gramm (Milz) dargestellt. Im Blut fand sich keine signifikant erhöhte Belastung nach SID im Vergleich zur Kontrolle oder Laparotomie (A und B). Die Peritoneallavage war 24 h nach SID signifikant mehrbelastet als nach Laparotomie (C). 72 h nach SID fiel eine erhöhte bakterielle Last in der Peritoneallavage auf im Vergleich zur Kontrolle (D). Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Die Milz zeigte sowohl zum 24 h- als auch zum 72 h-Zeitpunkt eine signifikante Belastung mit Bakterien nach SID im Vergleich zur Kontrolle und nach 24 h auch im Vergleich zur Laparotomiegruppe (Abbildung 7A und B). Insgesamt waren aber zu beiden Zeitpunkten je 13 Milzen von SID-Tiere unbelastet.

In der Niere fanden sich nach SID signifikant erhöhte Mengen an koloniebildenden Einheiten pro Gramm Nierengewebe sowohl zum 24 h-als auch zum 72 h-Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 7C und D). Zum 72 h-Zeitpunkt war dies auch signifikant gegenüber den laparotomierten Tieren. 13 Tiere zeigten 24 h nach SID in der Niere gar keine bakterielle Belastung. Zum 72 h-Zeitpunkt waren dies insgesamt 11 Tiere.

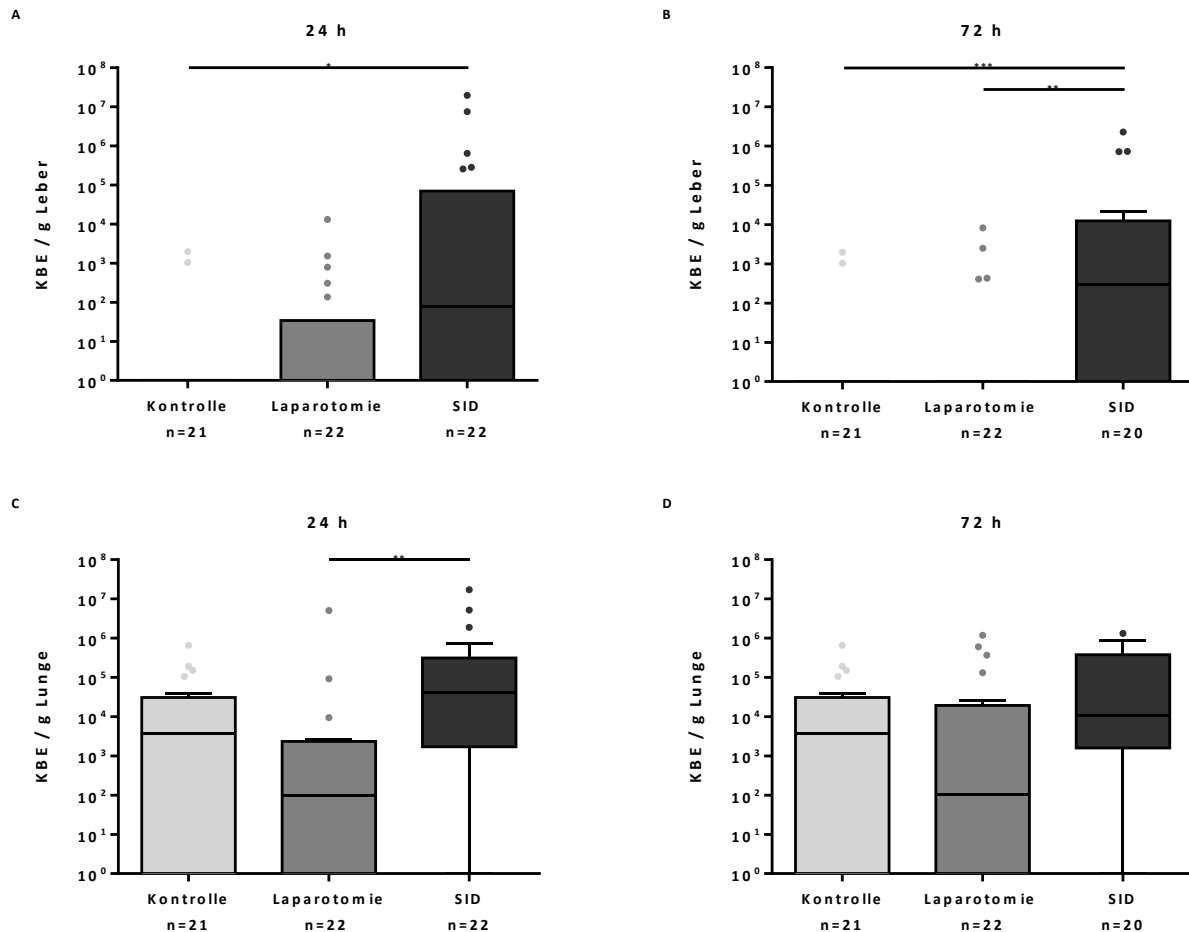


**Abbildung 7 Bakterielle Last von Milz und Niere**

Die bakterielle Belastung ist als Kolonie-bildende Einheiten (KBE) pro Gramm dargestellt. Die SID führte sowohl nach 24 h als auch nach 72 h zu einer signifikanten Zunahme der bakteriellen Last im Vergleich zur Kontrollgruppe, beziehungsweise auch im Vergleich zur Laparotomiegruppe (**A** und **B**). Ein ähnliches Bild ist in der Niere sichtbar. Nach SID gab es eine signifikante Erhöhung der bakteriellen Last in der Niere sowohl zum 24 h- (**C**) als auch zum 72 h-Zeitpunkt (**D**) gegenüber der Kontrolle bzw. der Kontrolle und Laparotomie. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in Box Plots mit Whiskers nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließend dem Dunn's multiple comparisons test auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Die bakterielle Belastung der Leber lag bei SID-operierten Tieren zum 24 h-Zeitpunkt im Mediane bei 80 KBE / g und zum 72 h-Zeitpunkt bei 707 KBE / g (Abbildung 8A und B). Diese Werte sind im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht und zum 72 h-Zeitpunkt auch im Vergleich zur Laparotomie. 24 h nach SID zeigten 10 Tiere in der Leber keine bakterielle Belastung. 72 h nach SID waren dies 8 Tiere.

In der Lunge fand man regelhaft, auch bei unbehandelten und laparotomierten Tieren, etwa bei der Hälfte der Tiere Bakterien. Dennoch kam es 24 h nach SID zu einem signifikanten Anstieg der bakteriellen Last im Vergleich zu den laparotomierten Tieren (Abbildung 8C) Zum 72 h-Zeitpunkt zeigten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede (Abbildung 8D). Zum 24 h- und zum 72 h-Zeitpunkt wiesen je 4 SID-Tiere gar keine bakterielle Last auf.



**Abbildung 8 Bakterielle Last von Leber und Lunge**

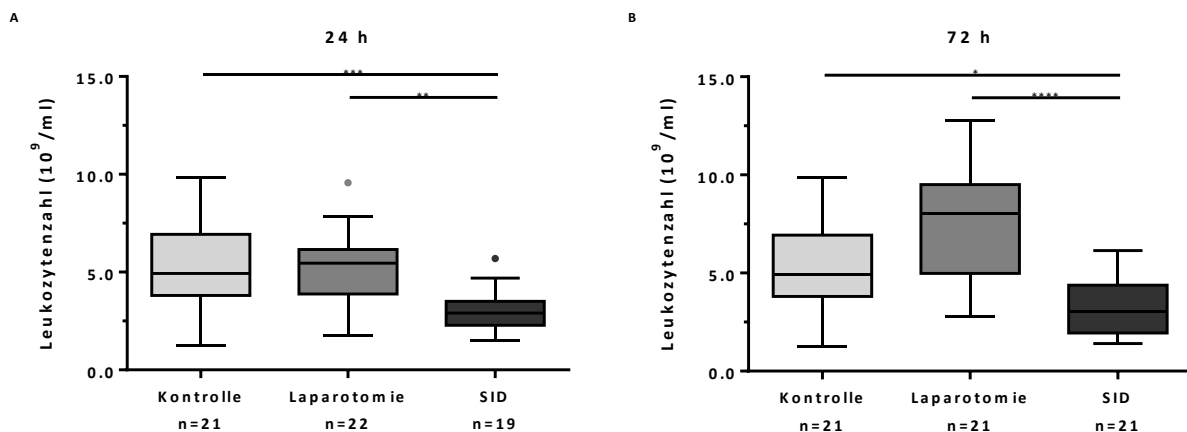
Die bakterielle Belastung ist als Kolonie-bildende Einheiten (KBE) pro Gramm dargestellt. Nach SID gab es eine signifikante Erhöhung der bakteriellen Last in der Leber sowohl zum 24 h- (A) als auch zum 72 h-Zeitpunkt (B) gegenüber der Kontrolle bzw. der Kontrolle und Laparotomie. In der Lunge zeigten SID-operierte Tiere eine Zunahme der bakteriellen Last gegenüber laparotomierten Tieren nach 24 h (C). Nach 72 h zeigten sich in der Lunge keine signifikanten Gruppenunterschiede (D). Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in Box Plots mit Whiskers nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's multiple comparisons test auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

## 5.2 Gesamtleukozyten im Blut

Die Anzahl der Gesamtleukozyten, welche sich sowohl aus Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems zusammensetzen, wurden aus EDTA-Vollblut mit Hilfe des VetScan HM5 bestimmt (4.2.1).

24 h nach SID fiel eine deutliche Reduktion der Gesamtleukozytenzahl sowohl gegenüber den laparotomierten Tieren als auch den Kontrolltieren auf (Abbildung 9A). Diese Reduktion war auch noch nach 72 h gegenüber beiden Gruppen signifikant (Abbildung 9B).

Die weitere Differenzierung der Gesamtleukozyten im Blut erfolgte in neutrophile Granulozyten (Abbildung 10) und Monozyten (Abbildung 13), also Zellen des angeborenen Immunsystems, und Lymphozyten (Abbildung 21), also vor allem Zellen des adaptiven Immunsystems.



**Abbildung 9 Leukozyten im Vollblut**

Die Gesamtleukozytenzahl war 24 h (A) und 72 h (B) nach SID signifikant gegenüber den laparotomierten Tieren und den Kontrolltieren erniedrigt. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in Box Plots mit Whiskers nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließend Dunn's multiple comparisons test auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

## 5.3 Veränderungen im angeborenen Immunsystem

### 5.3.1 Neutrophile Granulozyten

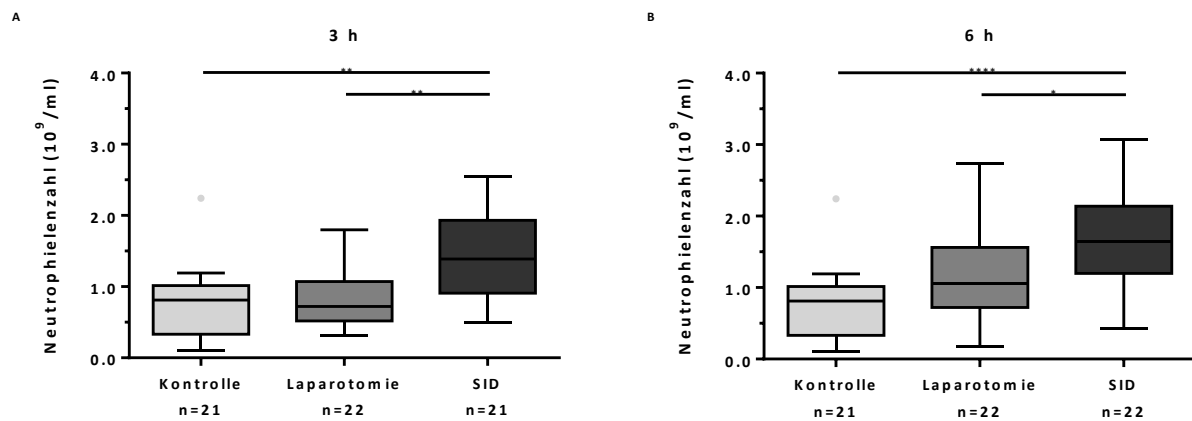
Die neutrophilen Granulozyten, die der primären Abwehr von Mikroorganismen dienen wurden im Vollblut, der Milz und der Peritoneallavage bestimmt.

#### 5.3.1.1 Neutrophile Granulozyten im Vollblut

Die Messung der neutrophilen Granulozyten erfolgte aus EDTA-Vollblut mit Hilfe des VetScan HM5 (4.2.1). Im Folgenden sind die Zeitpunkte 3 h und 6 h dargestellt, da hier Gruppenunterschiede beobachtet wurden.

Die neutrophilen Granulozyten zeigten bei SID-operierten Tieren eine Zunahme ihrer Gesamtzahl zum 3 h- und 6 h-Zeitpunkt, wobei diese signifikant im Vergleich zu laparotomierten und Kontrolltieren war (Abbildung 10).





**Abbildung 10 Neutrophile Granulozyten im Vollblut**

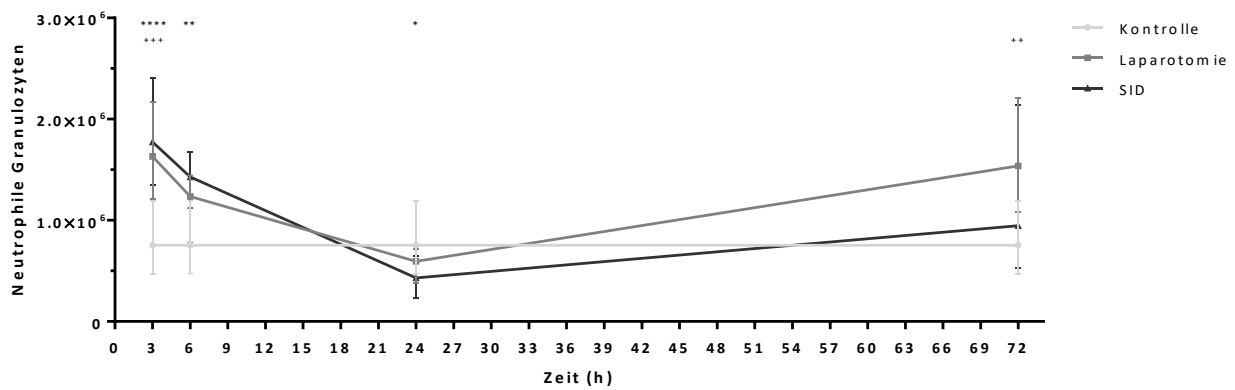
Bei den Neutrophilen ist eine signifikante Erhöhung ihrer Gesamtzahl 3 h und 6 h nach SID zu sehen, die sowohl gegenüber der Kontroll- als auch der Laparotomiegruppe signifikant wird (A und B). Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

### 5.3.1.2 Neutrophile Granulozyten in der Milz

Die  $\text{Ly6G}^+$  neutrophilen Granulozyten wurden durchflusszytometrisch analysiert (4.2.4.3) und die Entwicklung der neutrophilen Granulozyten ist in Abbildung 11 dargestellt.

Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten war nach beiden Operationen zum 3 h-Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Zum 6 h-Zeitpunkt zeigten nur die SID-operierten Tieren eine signifikante Zunahme der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Dahingegen ließ sich 24 h nach SID eine signifikante Abnahme der Gesamtneutrophilen im Vergleich zur Kontrolle beobachten. Der 72 h-Zeitpunkt zeigte, dass es nach Laparotomie signifikant mehr neutrophile Granulozyten in der Milz gab als in der Kontrollgruppe. Gruppenunterschiede zwischen den beiden Operationsmethoden waren zu keinem Zeitpunkt signifikant.



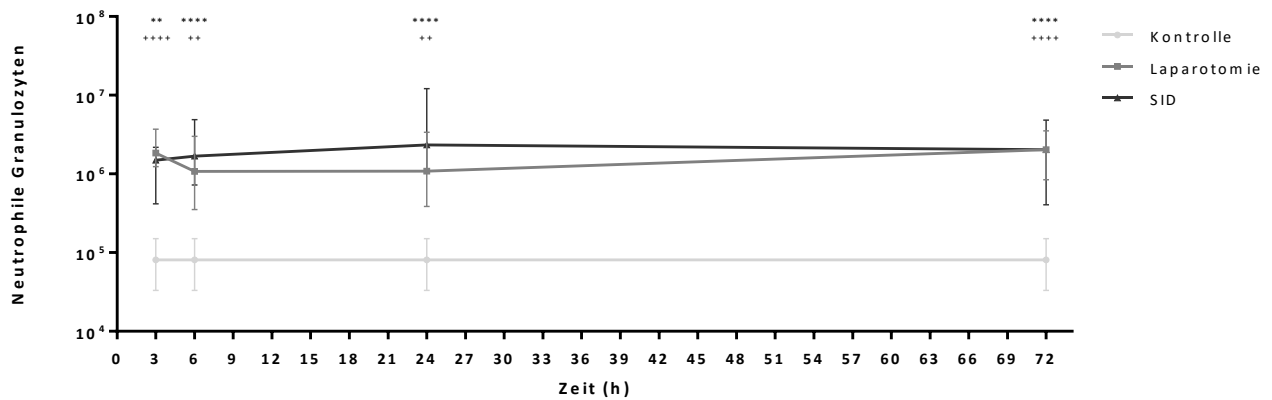
**Abbildung 11 Neutrophile Granulozyten in der Milz**

Durchflusszytometrisch wurden die neutrophilen Granulozyten anhand der Ly6G-Positivität identifiziert. In den ersten 6 h nach SID kam es zu einer signifikanten Zunahme der Neutrophilen gegenüber der Kontrollgruppe. Ebenfalls zeigten sich die neutrophilen Granulozyten der laparotomierten Tiere im Vergleich zur Kontrolle zum 3 h-Zeitpunkt erhöht. Im Gegenzug war 24 h nach SID die Gesamtneutrophilenzahl signifikant geringer als in der Kontrolle. Überdies stieg zum 72 h-Zeitpunkt die Gesamtzahl der Neutrophilen in der Laparotomiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Kontrolle. +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ ; ++++  $p \leq 0,0001$  zwischen Laparotomie und Kontrolle.  $n \geq 20$  pro Gruppe und Zeitpunkt.

### 5.3.1.3 Neutrophile Granulozyten in der Peritoneallavage

In der Peritoneallavage wurden ebenfalls die neutrophilen Granulozyten durchflusszytometrisch anhand von Ly6G identifiziert (4.2.4.3). Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 aufgezeigt.

Deutlich zu sehen war, dass bei unbehandelten Kontrolltieren sehr wenig Neutrophile zu finden waren (Median 80600 Zellen). Durch die operativen Interventionen kam es zu jedem Zeitpunkt zu einer signifikanten Zunahme der Neutrophilen im Vergleich zur Kontrolle. Gruppenunterschiede zwischen laparotomierten und SID-operierten Tieren waren nicht feststellbar.



**Abbildung 12 Neutrophile Granulozyten in der Peritoneallavage**

Mit Hilfe von Ly6G wurden die neutrophilen Granulozyten durchflusszytometrisch analysiert, wobei ihre absolute Zellzahl dargestellt ist. Die Kontrolltiere wiesen insgesamt nur 80600 neutrophile Granulozyten auf. Durch die Operationen kam es zu jedem Versuchszeitpunkt zu einem signifikanten Anstieg der Neutrophilen im Vergleich mit den Kontrolltieren. Zwischen den operierten Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Kontrolle. +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ ; ++++  $p \leq 0,0001$  zwischen Laparotomie und Kontrolle. .  $n \geq 20$  pro Gruppe und Zeitpunkt.

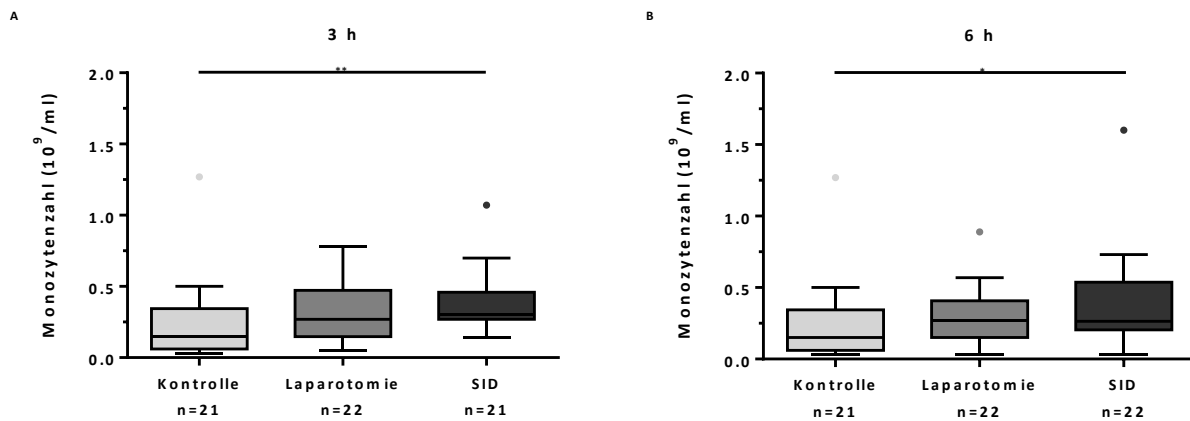
### 5.3.2 Monozyten-Makrophagen-System

Die Funktion des Monozyten-Makrophagen-Systems ist vor allem die Phagozytose von körpereigenen und körperfremden Material und daraufhin die Antigenpräsentation mittels MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen.

#### 5.3.2.1 Monozyten im Blut

Die Monozyten im Blut wurden mit Hilfe des VetScan HM5 analysiert (4.2.1).

Es kam sowohl zum 3 h- als auch zum 6 h-Zeitpunkt zu einem signifikanten Anstieg ihrer Anzahl nach SID im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 13A und B). Zu den anderen Versuchszeitpunkten konnten keine Gruppenunterschiede beobachtet werden.



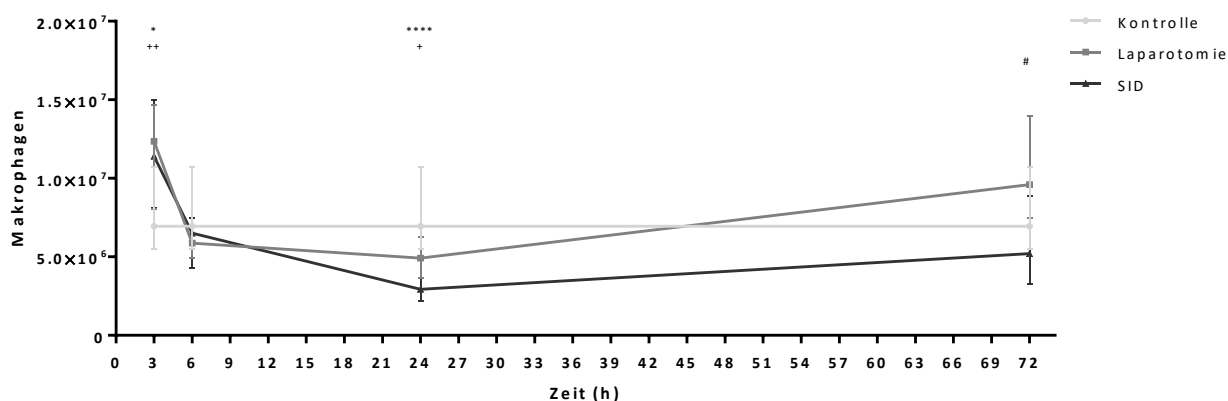
**Abbildung 13 Monozyten im Vollblut**

Die Monozyten sind nach SID sowohl zum 3 h- (A) als auch zum 6 h-Zeitpunkt (B) gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

### 5.3.2.2 Makrophagen in der Milz

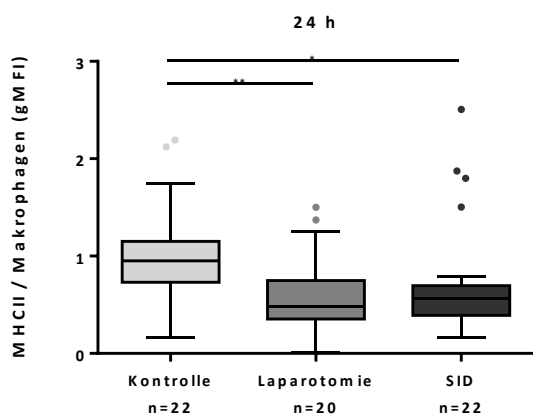
In der Milz wurden die  $\text{CD11b}^+$  Makrophagen durchflusszytometrisch bestimmt (4.2.4.3). Die Zahl der Makrophagen ist in Abbildung 14 dargestellt, wobei zusätzlich die MHCII-Expression bestimmt wurde (Abbildung 15).

Zum 3 h-Zeitpunkt gab einen signifikanten Anstieg der Makrophagen nach den operativen Eingriffen im Vergleich zur Kontrolle, wobei jedoch kein Unterschied zwischen den Operationsverfahren ermittelt werden konnte (Abbildung 14). Der 6 h-Zeitpunkt zeigte keine Gruppenunterschiede. 24 h nach den Operationen gab es signifikant weniger Makrophagen in der Milz als in der Kontrollgruppe (Abbildung 14), wobei diese auch signifikant weniger MHCII exprimierten (Abbildung 15). Zu keinem anderen Zeitpunkt war die MHCII-Expression alteriert (nicht dargestellt). SID-operierte Tiere wiesen zum 72 h-Zeitpunkt signifikant weniger Makrophagen auf als laparotomierte Tiere (Abbildung 14).



**Abbildung 14 Makrophagen in der Milz**

CD11b<sup>+</sup> Makrophagen wurden durchflusszytometrisch in der Milz bestimmt. Zum 3 h-Zeitpunkt zeigten beiden Operationsgruppen einen signifikanten Anstieg der Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der 6 h-Zeitpunkt wies keine Gruppenunterschiede auf. 24 h nach Laparotomie und SID war die absolute Zahl der Makrophagen geringer als bei der Kontrolle. 72 h nach SID fand man signifikant weniger Makrophagen als nach der Laparotomie. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Kontrolle. +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ ; ++++  $p \leq 0,0001$  zwischen Laparotomie und Kontrolle. #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$ ; ####  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Laparotomie.  $n \geq 20$  pro Gruppe und Zeitpunkt.



**Abbildung 15 MHCII-Expression auf Makrophagen der Milz**

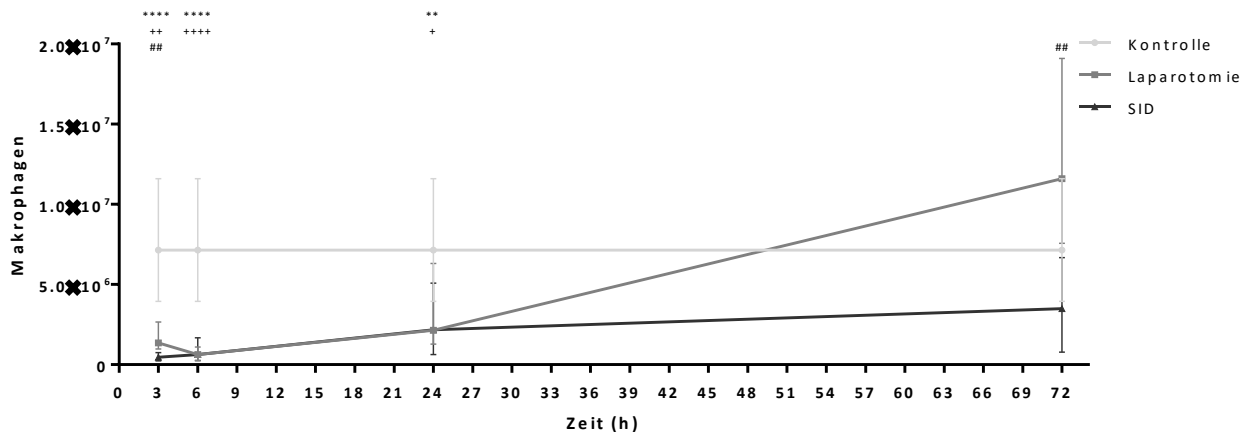
Dargestellt ist die die Expression von MHCII auf Makrophagen als geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität (gMFI) abzüglich einer Isotypenkontrolle. Die Makrophagen zeigen nach SID und Laparotomie zum 24 h-Zeitpunkt gegenüber der Kontrolle eine signifikant erniedrigte MHCII-Expression. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

### 5.3.2.3 Makrophagen in der Peritoneallavage

Ebenso wie in der Milz, wurden auch die Makrophagen in der Peritoneallavage anhand von CD11b durchflusszytometrisch bestimmt (4.2.4.3). In Abbildung 16 ist die Anzahl der Makrophagen im Zeitverlauf dargestellt.

Drei Stunden nach den operativen Eingriffen sah man eine deutliche Abnahme der Makrophagen im Vergleich zur Kontrolle. Zudem war die Gesamtzahl der Makrophagen zu diesem Zeitpunkt nach SID signifikant geringer als nach der Laparotomie.

Ähnliche Bilder zeigten sich zum 6 h- und 24 h-Zeitpunkt, wobei allerdings kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den OP-Gruppen gefunden werden konnte. Zweiundsiebzig Stunden nach der Laparotomie gab es signifikant mehr Makrophagen als nach der SID.



**Abbildung 16 Makrophagen in der Peritoneallavage**

CD11b<sup>+</sup> Makrophagen wurden mittels Durchflusszytometrie in der Peritoneallavage gemessen, wobei die Gesamtzahl der Makrophagen dargestellt ist. Deutlich zu sehen ist, dass es in den ersten 24 h nach den operativen Eingriffen zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der Makrophagen im Vergleich zur Kontrolle kam. Zusätzlich gab es zum 3 h-Zeitpunkt signifikant weniger Makrophagen nach der SID als nach der Laparotomie. Zum 72 h-Zeitpunkt wurde ein signifikanter Anstieg der Makrophagen nach Laparotomie im Vergleich zur SID deutlich. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Kontrolle. +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ ; ++++  $p \leq 0,0001$  zwischen Laparotomie und Kontrolle. #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$ ; ####  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Laparotomie.  $n \geq 20$  pro Gruppe und Zeitpunkt.

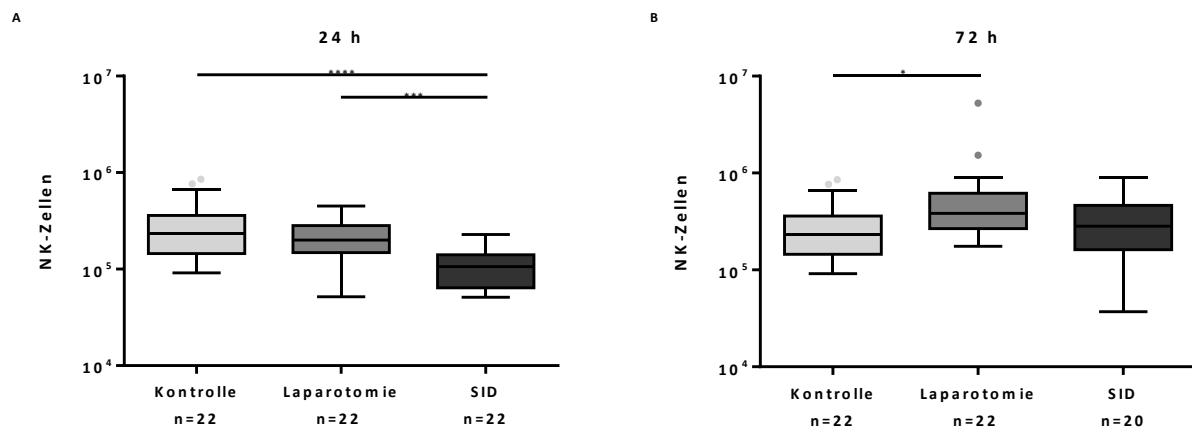
### 5.3.3 Natürliche Killerzellen

Die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) haben zytotoxische Eigenschaften und können somit vor allem gegen Virus-infizierte Zellen oder Tumorzellen wirken. In dieser Arbeit wurden sie in der Milz durchflusszytometrisch mittels NK1.1 identifiziert (4.2.4.4).

Die 3 h- und 6 h- Zeitpunkte zeigten keine Gruppenunterschiede und sind daher nicht dargestellt.

24 h nach SID war die absolute Zahl der NK-Zellen deutlich reduziert im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (Abbildung 17A).

Zum 72 h-Zeitpunkt ließ sich ein signifikanter Anstieg der NK-Zellen bei laparotomierten Tieren im Vergleich zur Kontrolle feststellen (Abbildung 17B).



**Abbildung 17 Natürliche Killerzellen in der Milz**

NK1.1<sup>+</sup> NK-Zellen wurden in der Milz durchflusszytometrisch bestimmt.

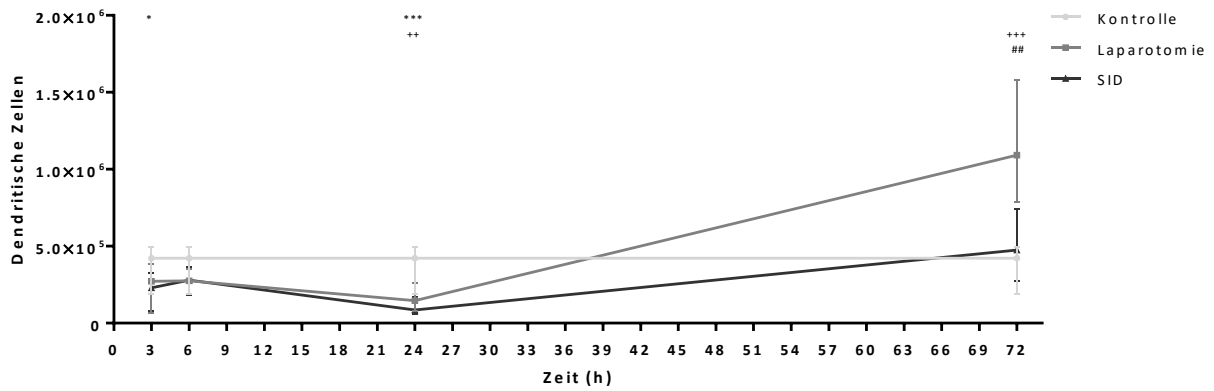
24 h nach SID kam es zu einer Reduktion der NK-Zellen im Vergleich im Vergleich zu beiden anderen Gruppen (**A**). Gegenteilig kam es zu einem signifikanten Anstieg der NK-Zellen nach Laparotomie verglichen zur Kontrollgruppe (**B**). Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

### 5.3.4 Dendritische Zellen

Die dendritischen Zellen (DC) gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen und stellen ein Bindeglied zwischen angeborenen und erworbenen Immunsystem dar. Untersucht wurden sie in der Milz und in der Peritoneallavage, indem durchflusszytometrisch MHCII<sup>+</sup> CD11c<sup>high</sup> Zellen gemessen wurden. Des Weiteren wurde die Oberflächenexpression von MHCII auf den DC der Milz bestimmt (4.2.4.3).

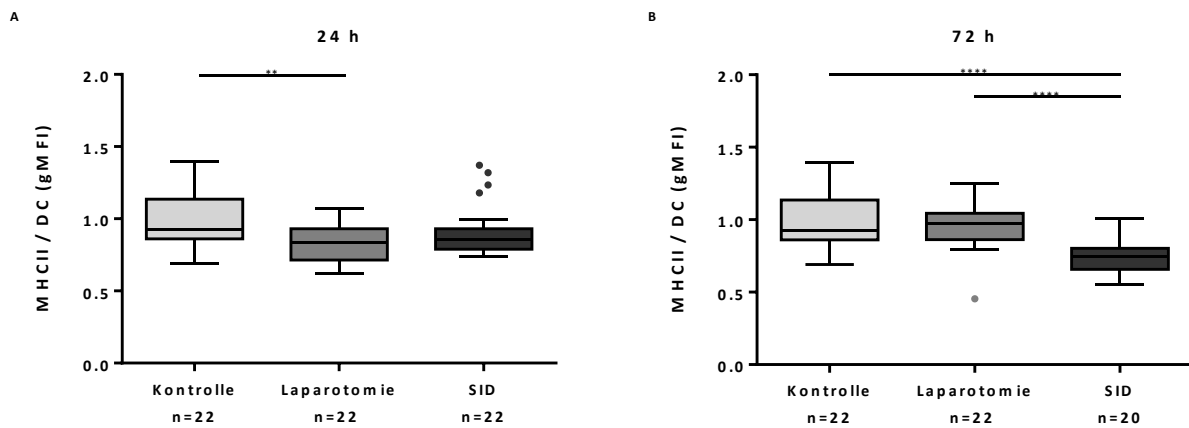
#### 5.3.4.1 Dendritische Zellen in der Milz

Drei Stunden nach den operativen Eingriffen kam es zu einem signifikanten Abfall der DC durch die SID gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 18). Die Anzahl der DC war sowohl 24 h nach Laparotomie als auch nach SID signifikant geringer als bei der Kontrolle (Abbildung 18), wobei die DC der laparotomierten Tiere auch eine verringerte MHCII-Expression aufwiesen (Abbildung 19A). Der 72 h Zeitpunkt zeigte hingegen eine signifikante Zunahme der DC nach Laparotomie im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (Abbildung 18). Die MHCII-Expression der laparotomierten Tiere erreichte wieder das Kontrollniveau, wohingegen die SID-operierten Tiere 72 h nach der Operation eine signifikant niedrigere MHCII-Expression aufwiesen als die anderen Tiere (Abbildung 19B).



**Abbildung 18 Dendritische Zellen in der Milz**

Dargestellt sind die MHCII<sup>+</sup> CD11c<sup>high</sup> dendritischen Zellen (DC). Drei Stunden nach der SID waren signifikant weniger DC vorhanden als in der Kontrollgruppe, was auch zum 24 h-Zeitpunkt der Fall war. Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich auch die DC der laparotomierten Tiere signifikant verringert verglichen mit den Kontrolltieren. Demgegenüber besaßen die laparotomierten Tiere 72 h nach der Operation signifikant mehr DC als die anderen beiden Gruppen. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Kontrolle. +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ ; ++++  $p \leq 0,0001$  zwischen Laparotomie und Kontrolle. #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$ ; ####  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Laparotomie.  $n \geq 20$  pro Gruppe und Zeitpunkt.



**Abbildung 19 MHCII-Expression der dendritische Zellen der Milz**

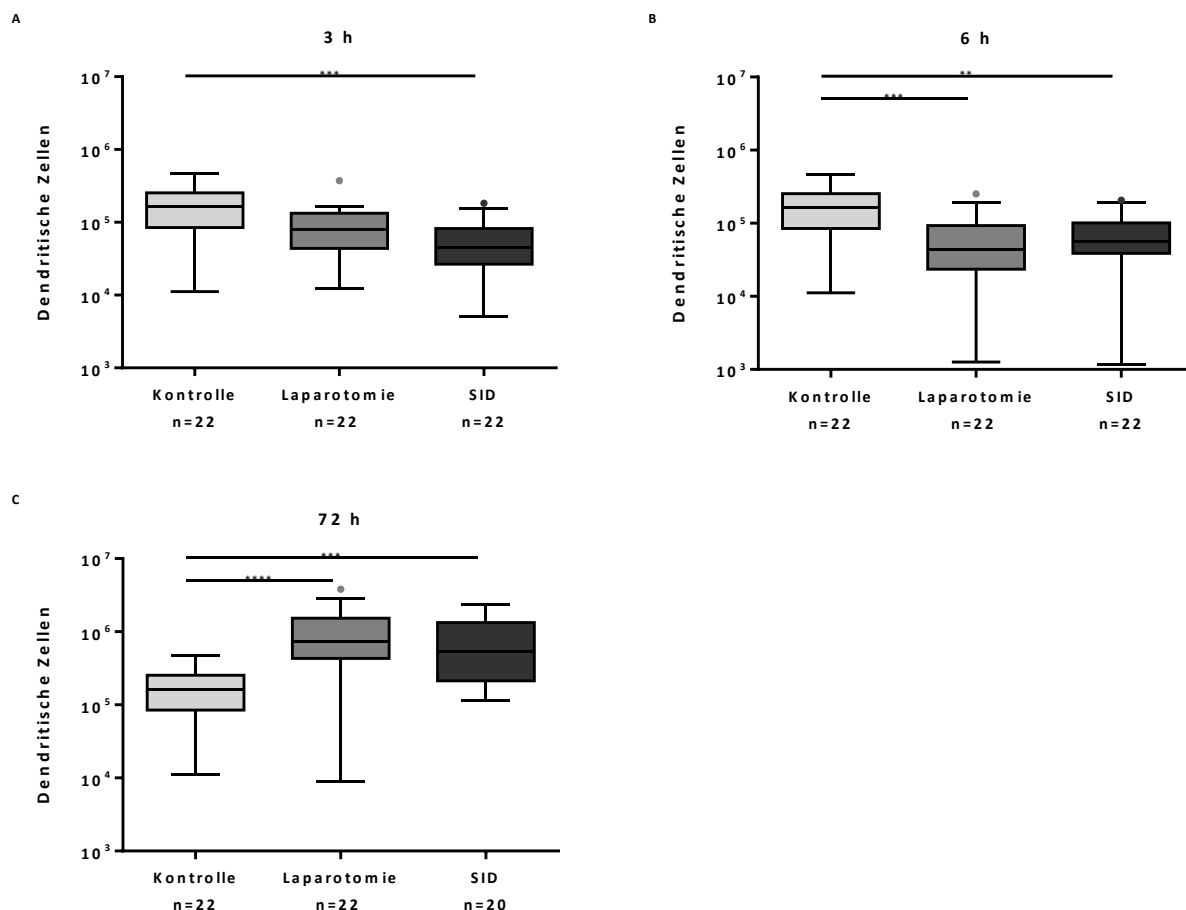
Dargestellt ist die Expression von MHCII auf DC als geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität (gMFI) abzüglich einer Isotypenkontrolle. Diese war 24 h nach der Laparotomie signifikant gegenüber der Kontrolle verringert (A). Die SID-operierten Tiere zeigten erst zum 72 h-Zeitpunkt eine Reduktion der MHCII-Expression im Vergleich zu den anderen Gruppen Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

### 5.3.4.2 Dendritische Zellen in der Peritoneallavage

In der Peritoneallavage beobachtete man 3 h nach den operativen Eingriffen eine signifikante Reduktion der DC nach SID verglichen zur Kontrolle (Abbildung 20A).



Zum 6 h-Zeitpunkt gab es weiterhin eine Reduktion der DC im Vergleich zur Kontrolle, wobei diese nach beiden Operationen auftrat (Abbildung 20B). Der 24 h-Zeitpunkt zeigte keine signifikanten Unterschiede und ist nicht dargestellt. Im Gegensatz zu den frühen Zeitpunkten kam es 72 h nach SID und Laparotomie zu einer Zunahme der DC im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 20C).



**Abbildung 20 Dendritische Zellen in der Peritoneallavage**

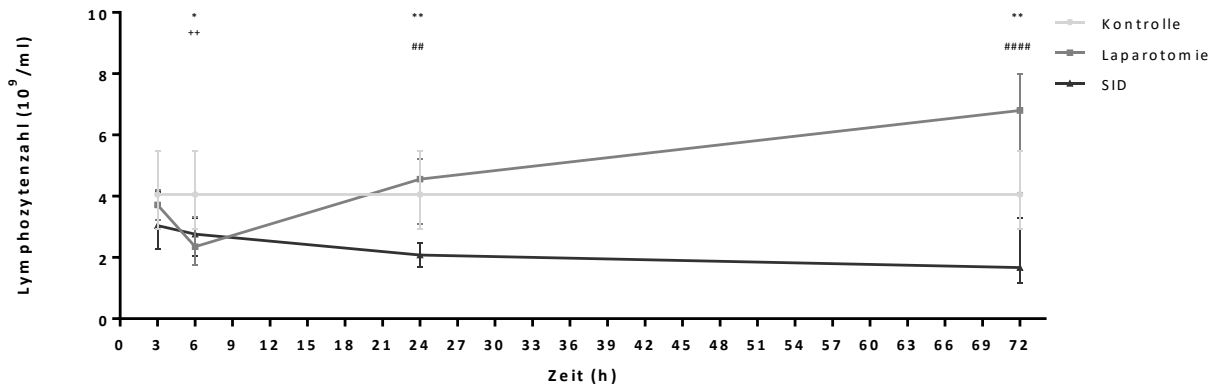
Dargestellt sind die MHCII<sup>+</sup> CD11c<sup>high</sup> DC der Peritoneallavage. Die SID führte nach 3 h und 6 h zu einer Zunahme der DC im Vergleich zur (A und B). Zum 6 h-Zeitpunkt traf das auch für die Laparotomie zu. Dies kehrte sich zum 72 h-Zeitpunkt um, sodass signifikant mehr DC nach beiden Operationen vorhanden sind im Vergleich zur Kontrolle (C). Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

## 5.4 Veränderungen des adaptiven Immunsystems

### 5.4.1 Gesamtlymphozyten im Blut

Die Gesamtlymphozyten wurden mit Hilfe des VetScan HM5 aus dem Vollblut bestimmt (4.2.1) und die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

Der 3 h Zeitpunkt zeigte keine Gruppenunterschiede. Die Lymphozyten zeigten sowohl 6 h nach SID als auch nach Laparotomie einen signifikanten Abfall verglichen zur Kontrolle. Diese Reduktion war auch 24 h bzw. 72 h nach SID zu beobachten, sodass signifikante Unterschiede zur Kontroll- und zur Laparotomiegruppe auffällig wurden.



**Abbildung 21 Lymphozyten im Vollblut**

Ab 6 h nach SID ist ein deutlicher Abfall der Lymphozytenzahl im Blut gegenüber der Kontrolle, wobei dieser ab 24 h auch zur Laparotomie signifikant ist. Die Laparotomiegruppe zeigt nur nach 6 h eine Reduktion ihrer Lymphozytenzahl bezogen auf die Kontrolle. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Kontrolle. +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ ; ++++  $p \leq 0,0001$  zwischen Laparotomie und Kontrolle. #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$ ; ####  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Laparotomie.  $n \geq 19$  pro Gruppe und Zeitpunkt.

## 5.4.2 B-Zellen

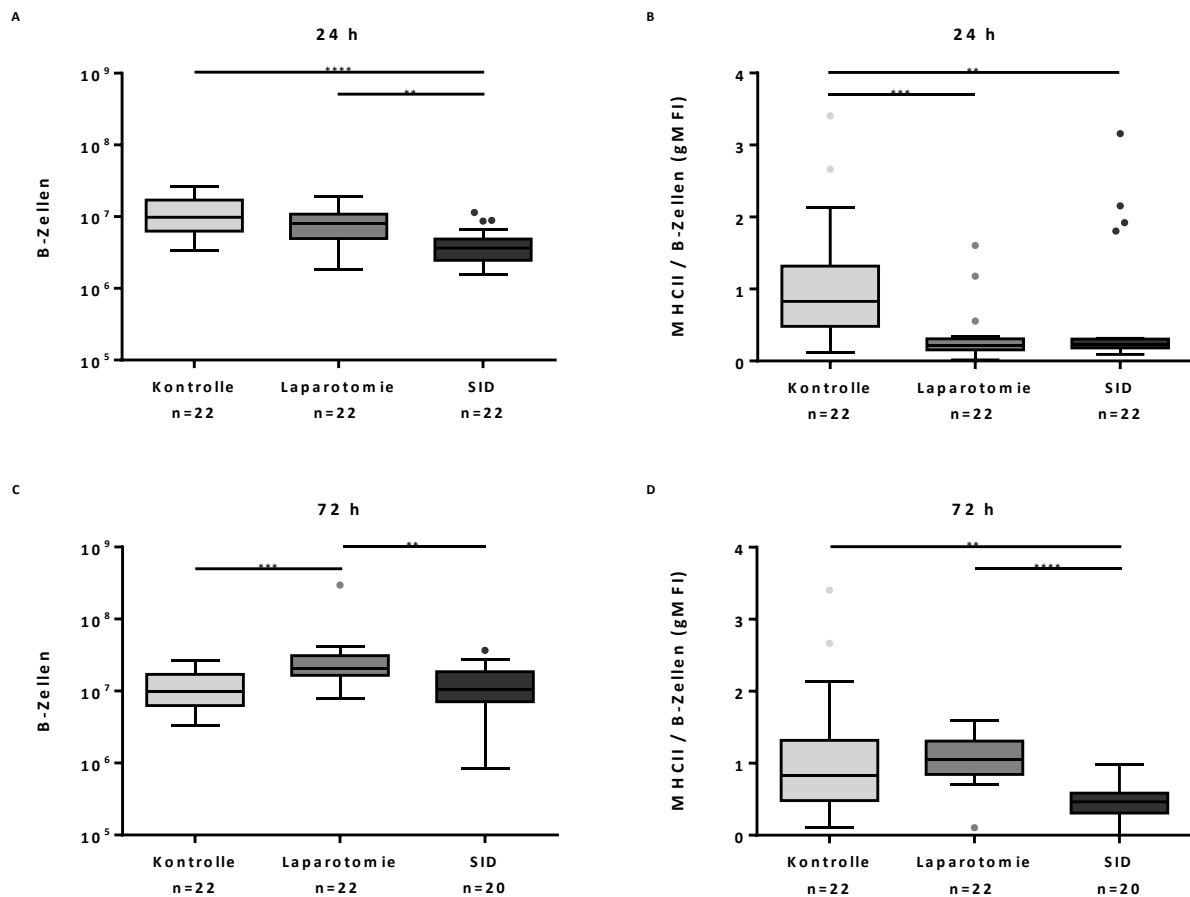
Die B-Zellen sind für die humorale Antwort des Immunsystems verantwortlich und wurden sowohl in der Milz als auch der Peritoneallavage mittels Durchflusszytometrie anhand von CD19<sup>+</sup> CD220<sup>+</sup> untersucht. Des Weiteren wurde die MHCII-Expression der B-Zellen der Milz untersucht.

### 5.4.2.1 B-Zellen der Milz

Im Folgenden sind die Zeitpunkte 24 h und 72 h dargestellt, da zu den anderen Zeitpunkten keine signifikanten Gruppenunterschiede nachgewiesen werden konnten.

Zum 24 h-Zeitpunkt war nach SID eine signifikante Reduktion der B-Zellen im Vergleich zu den anderen Gruppen nachweisbar (Abbildung 22A). Des Weiteren wiesen die B-Zellen 24 h nach einem operativen Eingriff eine signifikant geringere Expression von MHCII auf ihrer Oberfläche auf als die Kontrolle (Abbildung 22B).

Zum 72 h-Zeitpunkt fiel nach der Laparotomie eine deutliche Zunahme der B-Zellen im Vergleich zur Kontrolle und SID-Gruppe auf (Abbildung 22C). Eine Verringerung der MHCII-Expression gegenüber den anderen Gruppen ließ sich 72 h nach SID nachweisen (Abbildung 22D).



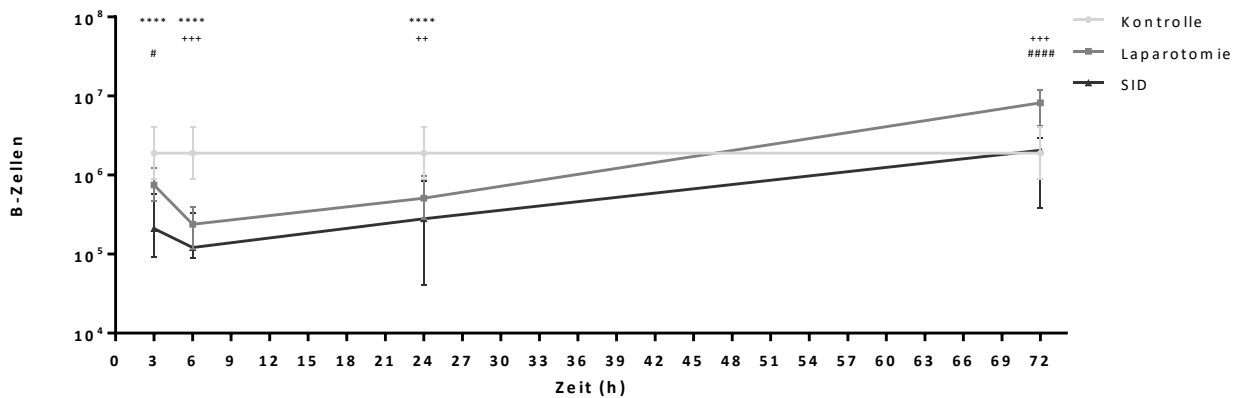
**Abbildung 22 B-Zellen in der Milz**

Dargestellt ist die Gesamtzahl der B-Zellen und die MHCII-Expression dieser als geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität (gMFI) zum 24 h- und zum 72 h-Zeitpunkt. 24 h nach SID nahmen die B-Zellen signifikant gegenüber den anderen Gruppen ab (**A**). Die MHCII-Expression war 24 h nach beiden operativen Eingriffen signifikant verringert im Vergleich zur Kontrolle (**B**). Der 72 h Zeitpunkt zeigte, dass es nach der Laparotomie zu einer signifikanten Zunahme der B-Zellen im Vergleich zur Kontroll- und SID-Gruppe (**C**) kam. Die MHCII-Expression war 72 h nach SID signifikant geringer als in den anderen Gruppen (**D**). Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließend dem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

#### 5.4.2.2 B-Zellen der Peritoneallavage

Abbildung 23 zeigt den Verlauf der Anzahl der B-Zellen in der Peritoneallavage.

Die SID bedingte in den ersten 24 h eine Depletion dieser gegenüber der Kontrolle. Zum 3 h- und 6 h-Zeitpunkt galt dies auch für die laparotomierten Tiere. Gruppenunterschiede zwischen den beiden Operationsmethoden gab es zum 3 h Zeitpunkt, an dem die SID-operierten Tiere signifikant weniger B-Zellen aufwiesen als die laparotomierten Tiere. Zum 72 h-Zeitpunkt zeigten laparotomierte Tiere sogar eine Zunahme der B-Zellen im Vergleich zur Kontrolle und zur SID.



**Abbildung 23 B-Zellen in der Peritoneallavage**

Die CD19<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> B-Zellen wurden in der Peritoneallavage bestimmt. In den ersten 24 h nach der SID und zum 6 h- und 24 h-Zeitpunkt nach Laparotomie zeigten sich signifikant weniger B-Zellen als in der Kontrolle. Drei Stunden nach SID gab es überdies signifikant weniger B-Zellen als nach der Laparotomie. Eine deutliche Vermehrung der B-Zellen nach Laparotomie im Vergleich zu den anderen Gruppen wurde zum 72 h-Zeitpunkt sichtbar (**H**). Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Kontrolle. +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ ; ++++  $p \leq 0,0001$  zwischen Laparotomie und Kontrolle. #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$ ; ####  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Laparotomie.  $n \geq 20$  pro Gruppe und Zeitpunkt.

### 5.4.3 CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind Teil der adaptiven Immunantwort und üben durch verschiedene Subtypen unterschiedliche Funktionen aus wie zum Beispiel die Unterstützung der humoralen Immunantwort durch Zytokinproduktion oder die Regulation der Immunantwort.

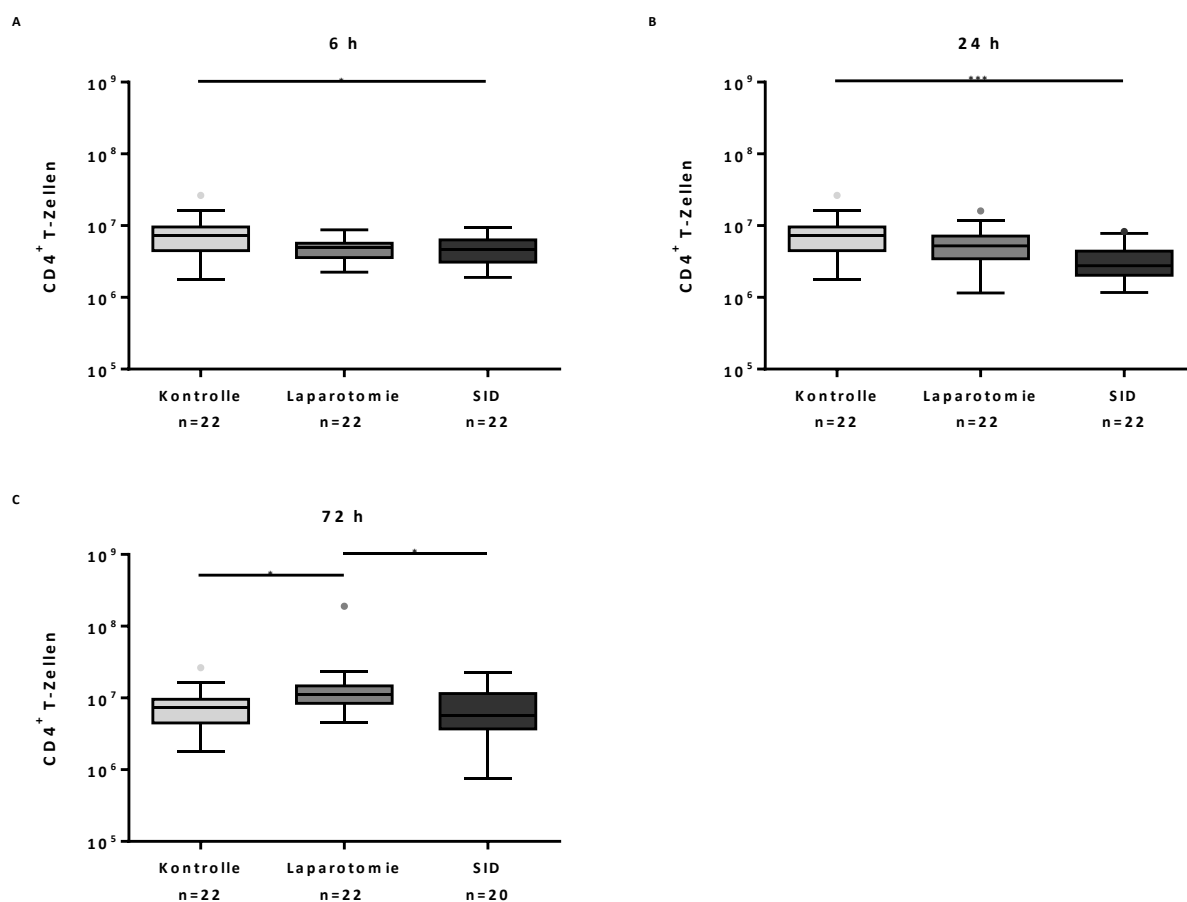
Sie wurden durchflusszytometrisch anhand des Oberflächenmarkers CD4 in der Milz identifiziert und weiter in CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Effektorzellen (T<sub>eff</sub>) und CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) unterteilt. Außerdem wurde ihr Aktivierungszustand mittels CD69, CD25 und CTLA-4 untersucht (4.2.4.2 und 4.2.4.4).

#### 5.4.3.1 CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Milz

Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz waren zum 3 h-Zeitpunkt in allen Versuchsgruppen auf gleichem Niveau (nicht dargestellt).

Dies änderte sich zum 6 h- und 24 h-Zeitpunkt, an dem signifikant weniger CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach SID beobachtet werden konnten als in der Kontrollgruppe, wohingegen die Anzahl nach Laparotomie konstant blieb (Abbildung 24A und B).

Zum 72 h Zeitpunkt kam es nach Laparotomie zu einem signifikanten Anstieg der T-Zellen im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen (Abbildung 24C).



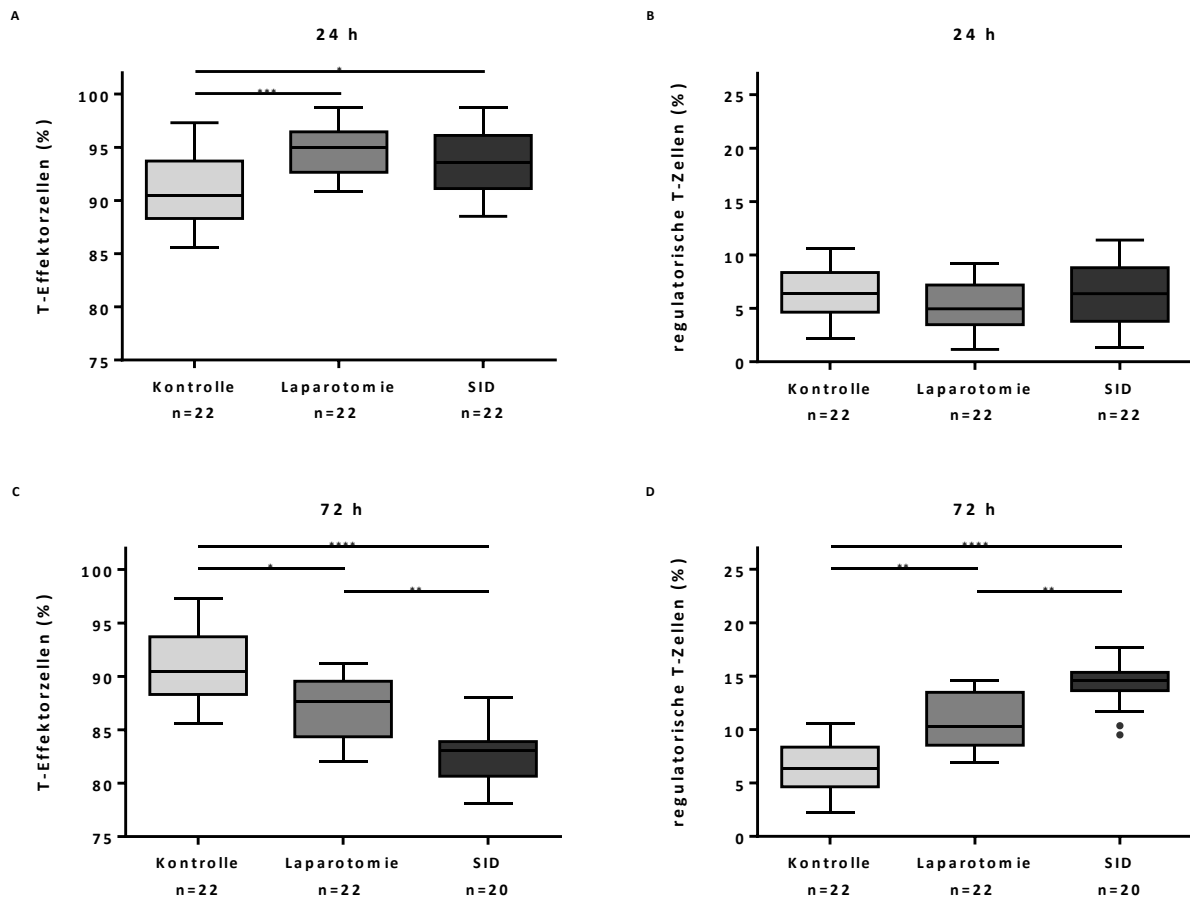
**Abbildung 24 CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz**

Die Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Zu den Zeitpunkten 6 h und 24 h gab es nach SID signifikant weniger T-Zellen als in der Kontrollgruppe (A und B). Die Anzahl der T-Zellen blieb nach Laparotomie in den ersten 24 h auf Kontrollniveau, aber stieg zum 72 h-Zeitpunkt signifikant über die Werte, die in den anderen Gruppen erreicht wurden (C). Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in Box Plots mit Whiskers nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

#### 5.4.3.2 Differenzierung in T-Effektorzellen und regulatorische T-Zellen

Die weitere Differenzierung erfolgte durch FoxP3, einem Transkriptionsfaktor. Im Folgenden ist die prozentuale Verteilung der FoxP3<sup>-</sup> T-Effektorzellen und FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen zum 24 h- und 72 h-Zeitpunkt dargestellt, da hier signifikante Gruppenunterschiede auftraten.

Zum 24 h-Zeitpunkt führten beide operativen Eingriffe zu einer signifikanten Zunahme der T-Effektorzellen, wobei sich der Anteil an regulatorischen T-Zellen durch die Operationen nicht veränderte (Abbildung 25A und B). Der 72 h-Zeitpunkt zeigte, dass die operativen Eingriffe zu einer signifikanten Abnahme der T-Effektorzellen und gleichzeitiger signifikanten Zunahme der regulatorischen T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle führte (Abbildung 25C und D). Darüber hinaus zeigten die SID-operierten Tiere auch signifikant weniger T-Effektorzellen und signifikant mehr regulatorische T-Zellen als die laparotomierten Tiere (Abbildung 25C und D).



**Abbildung 25** Verteilung der T-Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen der Milz

Dargestellt ist der Anteil der T-Effektorzellen ( $T_{eff}$ ) und regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) an den  $CD4^+$  T-Zellen der Milz. 24 h nach den Operationen stieg der Anteil der  $T_{eff}$  signifikant im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen die Verteilung der  $T_{reg}$  konstant blieb (**A** und **B**). Zum 72 h-Zeitpunkt beobachtete man eine signifikante Reduktion des Anteils der  $T_{eff}$  nach SID und nach Laparotomie im Vergleich zur Kontrolle, wobei nach SID der Anteil auch signifikant kleiner war als in der Laparotomiegruppe (**C**). Dementsprechend konnte eine signifikante Zunahme der  $T_{reg}$  durch die Operationen im Vergleich zur Kontrolle gefunden werden. Nach SID sind auch signifikant mehr  $T_{reg}$  vorhanden als nach der Laparotomie (**D**). Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

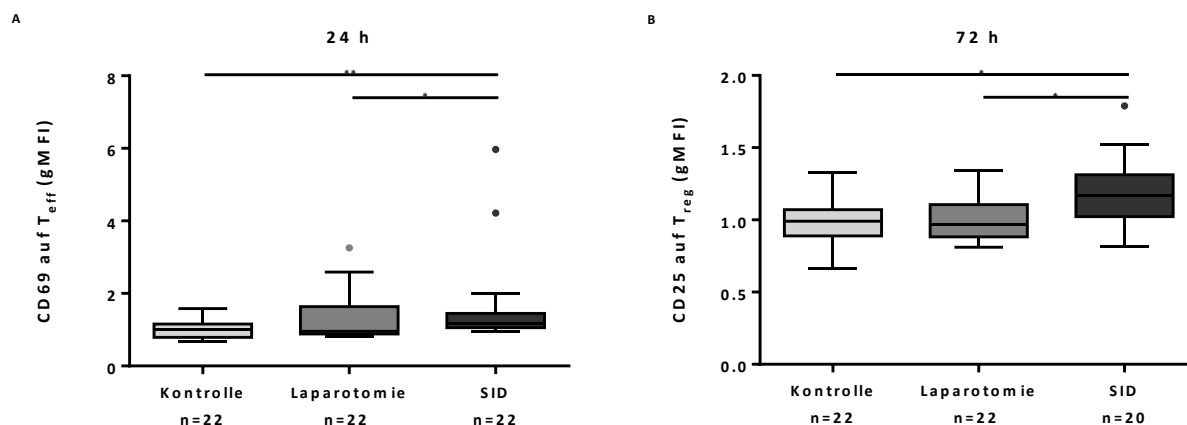
### 5.4.3.3 Aktivierungsstatus von T-Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen

Um die Aktivierung von  $CD4^+$  T-Zellen zu untersuchen, wurden die Aktivitätsmarker CD25, CD69 und CTLA-4 bestimmt.

Die Expression von CD69 auf  $T_{eff}$  war 24 h nach SID signifikant höher als in den anderen beiden Gruppen (Abbildung 26A). Außerdem sah man zu diesem Zeitpunkt auch eine signifikant höhere Expression von CTLA-4 auf  $T_{eff}$  nach SID als in der Kontrollgruppe (Abbildung 27A). Die erhöhte CTLA-4-Expression auf  $T_{eff}$  konnte man auch noch zum 72 h-Zeitpunkt beobachten (Abbildung 27C).

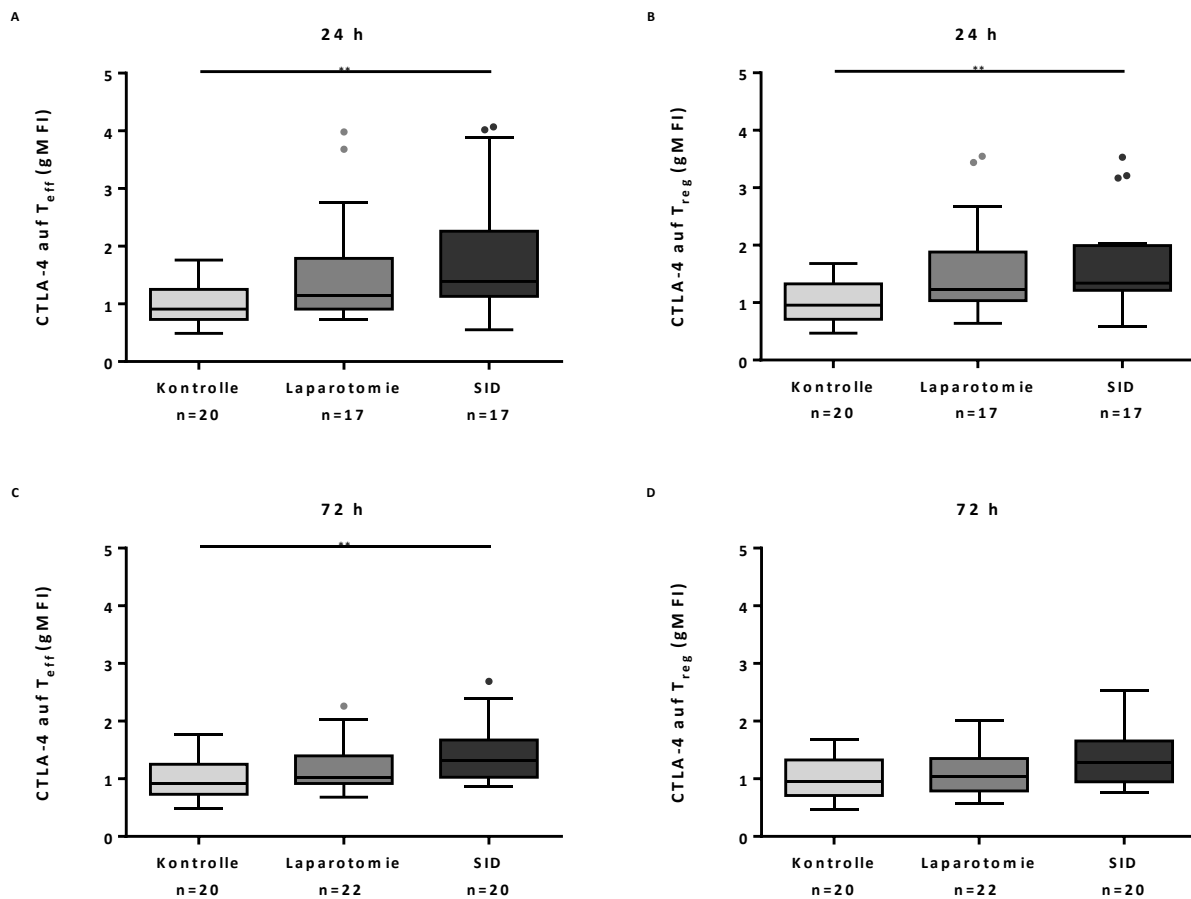
Die regulatorischen T-Zellen wiesen nach SID zum 24 h-Zeitpunkt ebenfalls eine erhöhte Expression von CTLA-4 im Vergleich zur Kontrolle auf (Abbildung 27B). Zum 72 h-Zeitpunkt war diese Erhöhung nicht mehr signifikant (Abbildung 27D), aber dafür wurde eine signifikante Aktivierung mittels CD25 nach SID im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen deutlich (Abbildung 26B).

Alle nicht gezeigten Zeitpunkte wiesen keine signifikanten Gruppenunterschiede auf.



**Abbildung 26** Aktivierungsstatus der CD4+ T-Zellen anhand von CD69 und CD25

Dargestellt ist die CD69- und CD25-Expression anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (gMFI) auf T-Effektorzellen (T<sub>eff</sub>) bzw. regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>). Während es nach SID zum 24 h-Zeitpunkt zu einer signifikanten Zunahme der CD69-Expression auf T<sub>eff</sub> im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen kam (**A**), wurde auf T<sub>reg</sub> 72 h nach SID signifikant mehr CD25 exprimiert als in den anderen Gruppen (**B**). Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$



**Abbildung 27 Aktivierungsstatus der CD4+ T-Zellen anhand von CTLA-4**

Die CTLA-4-Expression auf T-Effektorzellen ( $T_{eff}$ ) und regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) ist als geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität (gMFI) dargestellt. Zum 24 h-Zeitpunkt ließ sich sowohl auf  $T_{eff}$  als auch auf  $T_{reg}$  eine signifikant höhere CTLA-4-Expression nach SID feststellen als in der Kontrollgruppe (**A** und **B**). Dies war bei den  $T_{eff}$  auch zum 72 h-Zeitpunkt der Fall (**C**). 72 h nach SID war die CTLA-4-Expression auf  $T_{reg}$  nicht signifikant verändert. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

## 5.5 Zytokine im Serum

Die Zytokinkonzentration im Serum wurde mit Hilfe eines CBA bestimmt. Die untersuchten Zytokine waren IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-17A und IFN- $\gamma$  wurden nicht im biologisch relevanten Bereich detektiert, weswegen im Folgenden nicht weiter auf diese eingegangen wird.

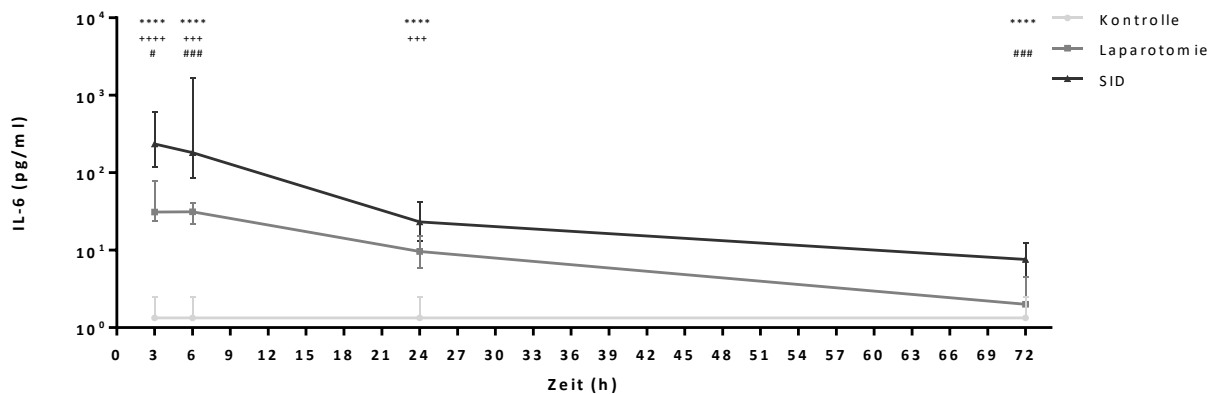
### 5.5.1 Interleukin-6 im Serum

IL-6, ein bedeutsamer Aktivator der Akut-Phase-Reaktion und der Lymphozytenaktivierung, zeigte einen deutlichen Anstieg nach den operativen Eingriffen was in Abbildung 28 dargestellt ist.

Zum 3 h-Zeitpunkt hat sich die IL-6-Konzentration von einem medianen Wert der Kontrolltiere von 1,26 pg / nl auf 30,60 pg / nl nach Laparotomie bzw. auf 234,7 pg / nl nach SID erhöht, sodass die



Unterschiede sowohl zur Kontrollgruppe als auch zwischen SID und Laparotomie signifikant wurden. Ein vergleichbares Bild zeigt sich zum 6 h-Zeitpunkt. Im Vergleich zur Kontrolle ist die IL-6-Konzentration 24 h nach Laparotomie bzw. SID signifikant erhöht, aber es lässt sich kein Unterschied mehr zwischen den Operationsgruppen beobachten. Die IL-6-Konzentration ist zum 72 h-Zeitpunkt bei SID-operierten Tieren immer noch signifikant erhöht im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Laparotomierte Tiere weisen einen vergleichbaren Wert wie die Kontrolltiere auf.

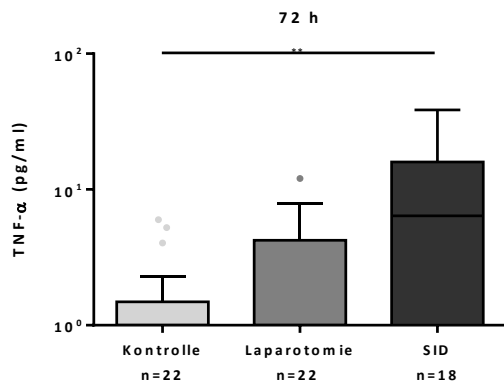


**Abbildung 28 IL-6-Konzentration im Serum**

Nach SID war zu allen Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung der IL-6-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle messbar. Abgesehen vom 24 h-Zeitpunkt, war diese Zunahme auch signifikant gegenüber den laparotomierten Tieren. Nach Laparotomie beobachtete man für 24 h auch eine Erhöhung der IL-6-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Kontrolle. +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ ; ++++  $p \leq 0,0001$  zwischen Laparotomie und Kontrolle. #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$ ; ####  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Laparotomie.  $n \geq 18$  pro Gruppe und Zeitpunkt.

### 5.5.2 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ im Serum

Ein weiteres, vor allem proinflammatorisches Zytokin, welches die Akut-Phase-Reaktion auslösen kann, ist TNF- $\alpha$ . In den ersten 24 h konnte weder nach SID noch nach Laparotomie ein signifikanter Anstieg der TNF- $\alpha$ -Konzentration beobachtet werden (nicht dargestellt). Zum 72 h-Zeitpunkt kam es zu einer signifikanten Zunahme der TNF- $\alpha$ -Konzentration bei den SID-operierten Tieren verglichen mit den Kontrolltieren (Abbildung 29).

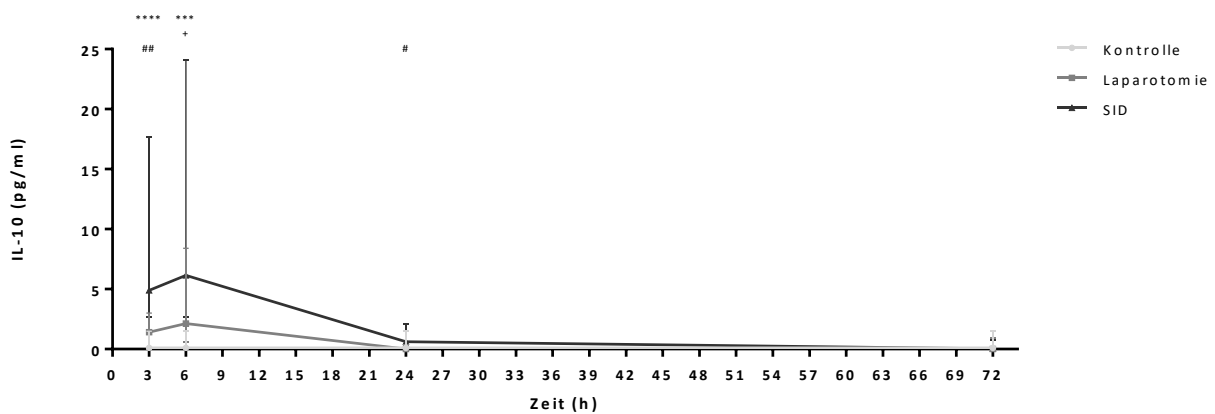


**Abbildung 29 TNF- $\alpha$ -Konzentration im Serum**

Die TNF- $\alpha$ -Konzentration zeigte eine signifikante Zunahme 72 h nach SID im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

### 5.5.3 Interleukin-10 im Serum

IL-10, ein primär antiinflammatorisches Zytokin, was zum Beispiel die Makrophagenfunktion inhibiert, steigt vor allem in der Frühphase nach dem operativen Trauma an (Abbildung 30). Nach SID war es zum 3 h-Zeitpunkt signifikant gegenüber der Kontrolle und der Laparotomie erhöht. SID-operierte Tiere zeigten 6 h nach dem Eingriff ihre maximale IL-10-Konzentration mit im Median 6,15 pg/ml, womit sie eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu Kontrolltieren aufwiesen. Zu diesem Zeitpunkt war die IL-10-Konzentration in der Laparotomiegruppe ebenfalls signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Auffallend war die große Streuung der IL-10-Konzentrationen nach SID. Vierundzwanzig Stunden nach SID ist die IL-10-Konzentration im Vergleich zu den laparotomierten Tieren erhöht. Zum 72 h Zeitpunkt waren keine Gruppenunterschiede feststellbar.



**Abbildung 30 IL-10-Konzentration im Serum**

Die IL-10-Konzentration im Serum stieg 3 h nach SID signifikant gegenüber den anderen Gruppen an. Zum 6 h-Zeitpunkt führten beide Operationen zu einer signifikanten Elevation des IL-10 verglichen zur Kontrolle. Vierundzwanzig Stunden nach SID wiesen die Mäuse eine erhöhte IL-10-Konzentration auf als nach Laparotomie. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Kontrolle. +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ ; ++++  $p \leq 0,0001$  zwischen Laparotomie und Kontrolle. #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$ ; ####  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Laparotomie.  $n \geq 18$  pro Gruppe und Zeitpunkt.

## 5.6 Zytokinsekretion von murinen Splenozyten

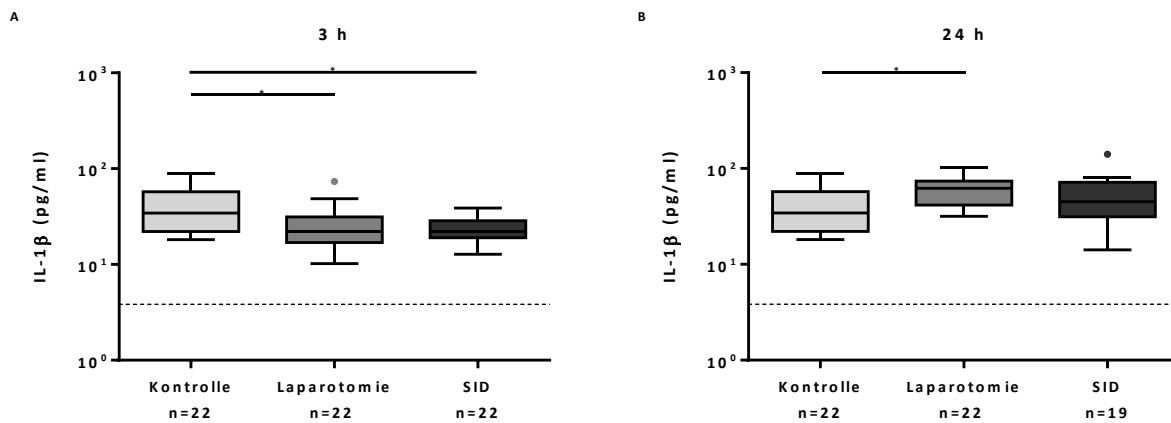
Um zu untersuchen, ob murine Splenozyten nach einem operativen Trauma noch adäquat auf einen weiteren Reiz reagieren können, wurde ein sogenanntes *second-hit* Modell verwendet. Der *first-hit* wird hierbei durch das Operationstrauma repräsentiert und der *second-hit* durch eine *ex vivo* Stimulation mit E.coli-LPS. Anschließend wurde die Zytokinkonzentration im Überstand der Splenozyten durchflusszytometrisch mit Hilfe des *Cytometric Bead Arrays* bestimmt. Untersuchte Zytokine waren: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ .

Da IL-2, IL-4, IL-12p70 und IL-17A auch nach Stimulation mit E.coli-LPS nicht im bedeutsamen Maße messbar waren, wird auf diese im Folgenden nicht weiter eingegangen.

### 5.6.1 Interleukin-1 $\beta$ im Splenozytenüberstand

IL-1 $\beta$ , ein proinflammatorisches Zytokin, wurde nach Stimulation mit E.coli-LPS vermehrt von den Splenozyten ausgeschüttet. Als Vergleichswert ist die mediane IL-1 $\beta$ -Konzentration aus dem Überstand unstimulierter Splenozyten der Kontrollgruppe als gestrichelte Linie dargestellt, welche 3,84 pg / ml betrug (Abbildung 31).

Drei Stunden nach einem operativen Stimulus sankt die IL-1 $\beta$ -Konzentration signifikant im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Abbildung 31A). Zum 24 h-Zeitpunkt wurde nach Laparotomie eine deutlich höhere IL-1 $\beta$ -Konzentration gemessen als bei Kontrolltieren (Abbildung 31B). Zum 6 h- und 72 h-Zeitpunkt waren keine Gruppenunterschiede nachweisbar (nicht dargestellt).



**Abbildung 31 IL-1 $\beta$ -Konzentration im Splenozytenüberstand**

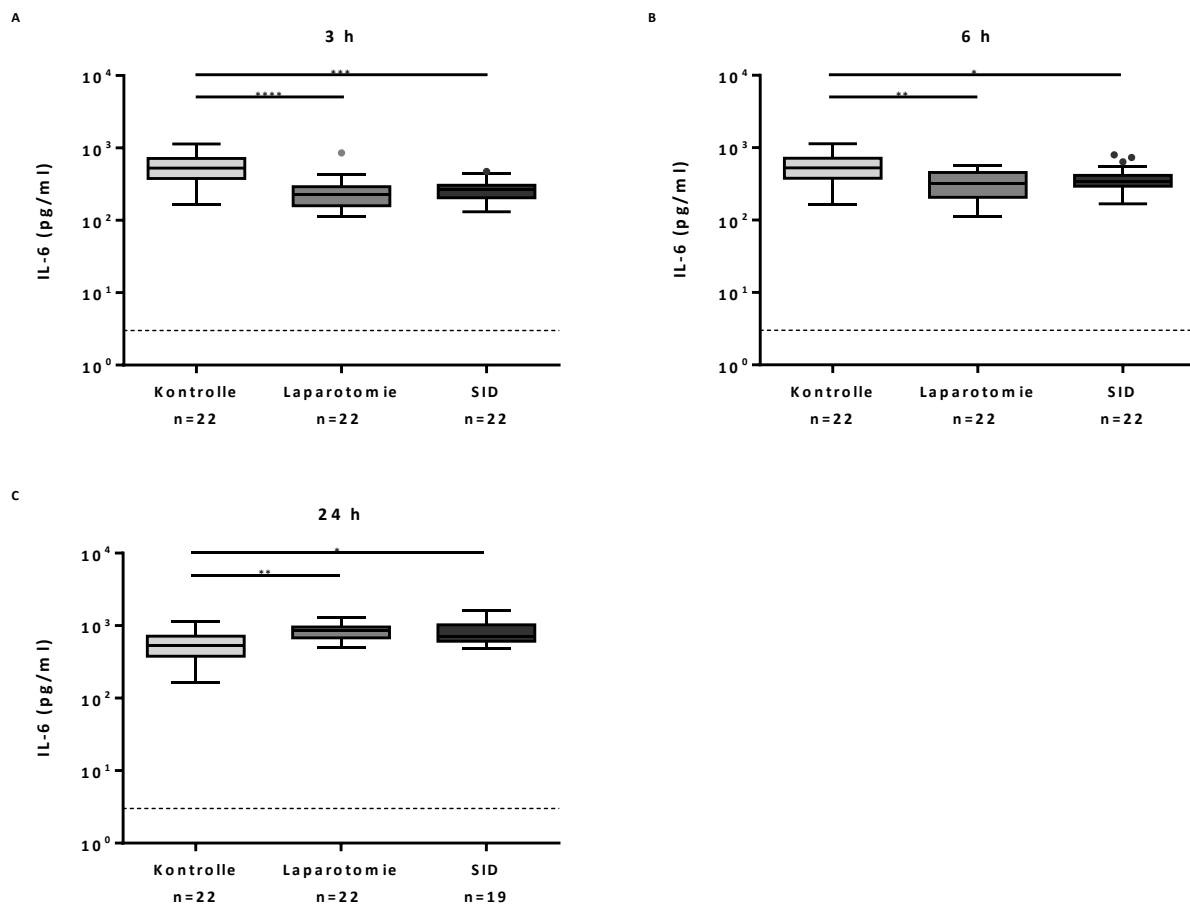
Drei Stunden nach einem operativen Stimulus wurde signifikant weniger IL-1 $\beta$  ausgeschüttet als in der Kontrollgruppe (A). Dieser Effekt kehrte 24 h nach Laparotomie um und es wurde eine signifikant höhere IL-1 $\beta$ -Konzentration im Vergleich zur Kontrolle gemessen (B). Die gestrichelte Linie entspricht der medianen IL-1 $\beta$ -Konzentration im unstimulierten Splenozytenüberstand der Kontrolltiere, welche 3,84 pg / ml betrug. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

### 5.6.2 Interleukin-6 im Splenozytenüberstand

Durch die Stimulation der Splenozyten mit LPS wurden erhöhte IL-6-Konzentrationen im Überstand gemessen, weswegen als Vergleichswert die mediane IL-6-Konzentration von 3,00 pg / ml von unstimulierten Splenozyten der Kontrolltiere als gestrichelte Linie dargestellt ist (Abbildung 32).

Nach beiden operativen Eingriffen war sowohl zum 3 h- als auch zum 6 h-Zeitpunkt eine signifikant geringere IL-6-Konzentration als bei den Kontrolltieren messbar (Abbildung 32A und B).

Dieses kehrte sich allerdings zum 24 h-Zeitpunkt um und es wurden sowohl nach Laparotomie als auch nach SID signifikant erhöhte IL-6-Konzentrationen im Splenozytenüberstand beobachtet (Abbildung 32D). Der 72 h-Zeitpunkt wies keine Gruppenunterschiede mehr auf (nicht gezeigt).



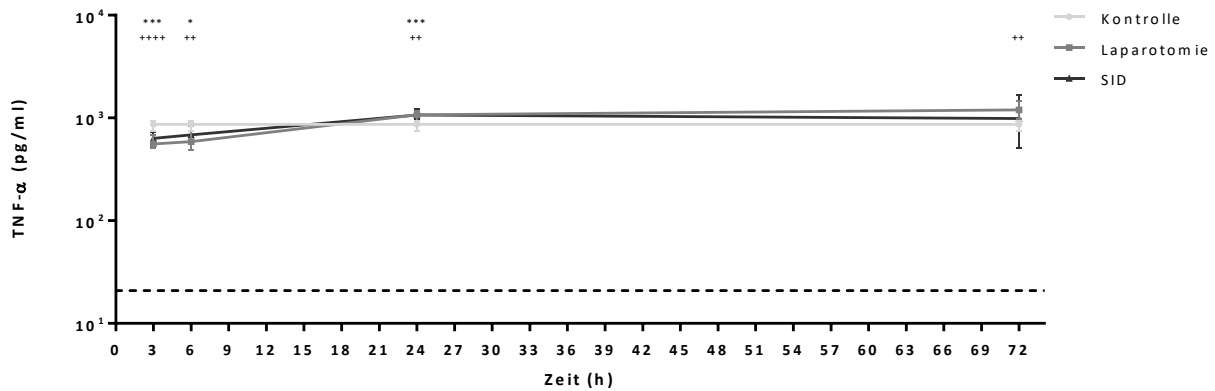
**Abbildung 32 IL-6-Konzentration im Splenozytenüberstand**

Die IL-6-Konzentration war sowohl nach SID als auch nach Laparotomie zum 3 h- und 6 h-Zeitpunkt signifikant gegenüber der Kontrolle vermindert (A und B). Vierrundzwanzig Stunden nach den operativen Eingriffen beobachtete man das genaue Gegenteil, nämlich eine signifikant erhöhte IL-6-Konzentration durch die Eingriffe (C). Die gestrichelte Linie bei 3,00 pg / ml entspricht der medianen IL-6-Konzentration im unstimulierten Splenozytenüberstand der Kontrolltiere. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in Box Plots mit Whiskers nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließend dem Dunn's multiple comparisons test auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

### 5.6.3 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ im Splenozytenüberstand

Die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Medium von unstimulierten Splenozyten von Kontrolltieren war im Median 20,86 pg / ml (gestrichelte Linie Abbildung 33).

Die Kinetik der TNF- $\alpha$ -Konzentration, dargestellt in Abbildung 33, entspricht weitgehend der, die schon bei IL-6 beobachtet wurde. In den ersten 6 h nach den operativen Eingriffen kam es zu einer signifikanten Reduktion der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Vergleich zu der Kontrolle. Dies hat sich zum 24 h-Zeitpunkt umgekehrt und die operierten Tiere zeigen eine signifikante Zunahme der TNF- $\alpha$ -Konzentration gegenüber der Kontrolle. Die elevierte TNF- $\alpha$ -Konzentration ist nach Laparotomie, im Gegensatz zur SID, auch noch zum 72 h-Zeitpunkt messbar.



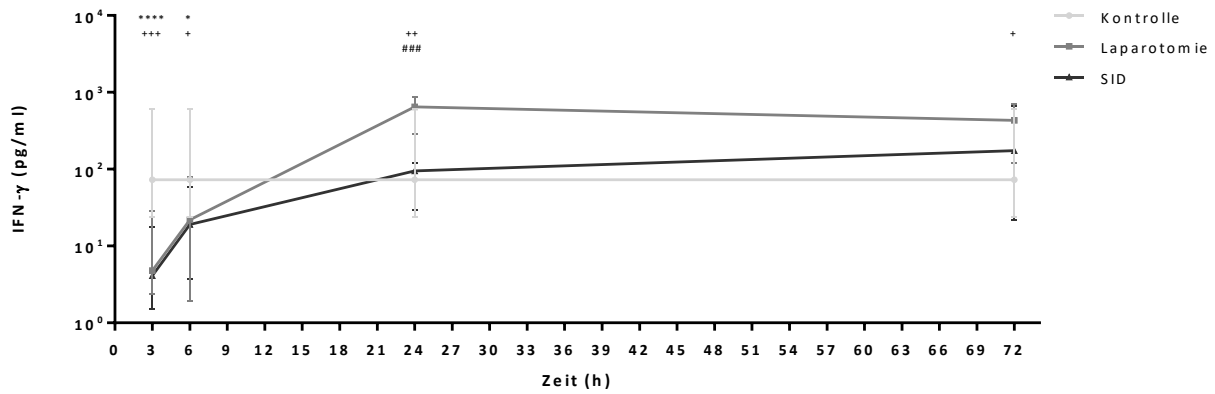
**Abbildung 33 TNF- $\alpha$ -Konzentration im Splenozytenüberstand**

Zum 3 h- und 6 h-Zeitpunkt sind die TNF- $\alpha$ -Spiegel nach den Operationen signifikant niedriger als bei der Kontrolle. Dahingegen ist 24 h nach den operativen Eingriffen eine signifikante Zunahme der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Vergleich zur Kontrolle auffällig. Diese Zunahme lässt sich bei laparotomierten Tieren auch noch zum 72 h-Zeitpunkt beobachten. Die gestrichelte Linie bei 20,86 pg / ml entspricht der medianen TNF- $\alpha$ -Konzentration im unstimulierten Splenozytenüberstand der Kontrolltiere. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließend dem Dunn's multiple comparisons test auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Kontrolle. +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ ; ++++  $p \leq 0,0001$  zwischen Laparotomie und Kontrolle. #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$ ; ####  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Laparotomie.  $n \geq 19$  pro Gruppe und Zeitpunkt.

#### 5.6.4 Interferon- $\gamma$ im Splenozytenüberstand

IFN- $\gamma$ , ein weiteres vorwiegend proinflammatorisches Zytokin, wurde im Überstand von unstimulierten Splenozyten der Kontrolltiere nicht gefunden. Nach Simulation mit LPS kam es aber zu einer deutlichen IFN- $\gamma$ -Ausschüttung, was in Abbildung 34 dargestellt ist.

Nach beiden Operationen war die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen zu den Zeitpunkten 3 h und 6 h signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe. Am 24 h-Zeitpunkt beobachtete man, dass die IFN- $\gamma$ -Konzentration nach Laparotomie deutlich zunahm und damit signifikant gegenüber Kontrolle und SID erhöht war. Die Konzentration war auch 72 h nach Laparotomie im Bezug zur Kontrolle signifikant erhöht.



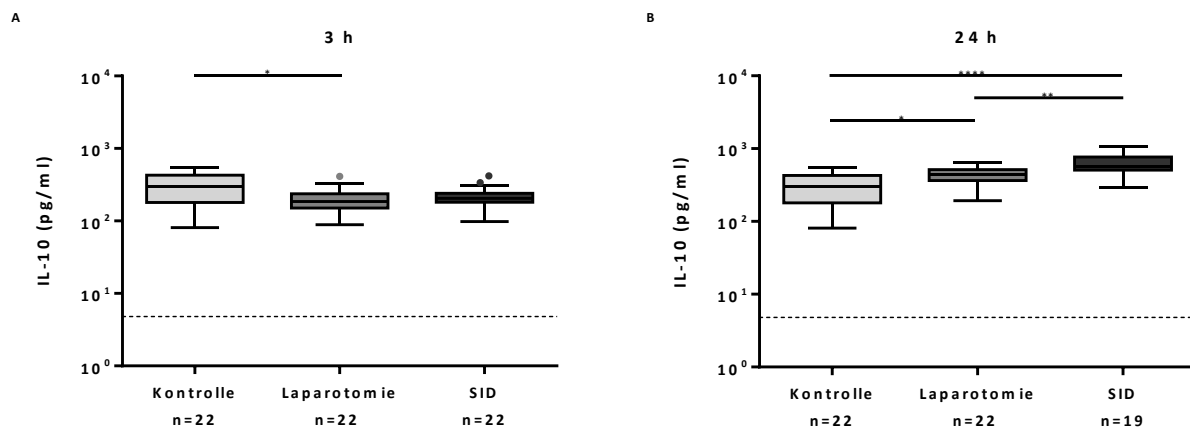
**Abbildung 34 IFN- $\gamma$ -Konzentration im Splenozytenüberstand**

Nach den operativen Eingriffen ließen sich signifikant reduzierte IFN- $\gamma$ -Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe zum 3 h- und 6 h-Zeitpunkt feststellen. Ab dem 24 h-Zeitpunkt kehrt sich dieses nach der Laparotomie um und es wurde signifikant mehr IFN- $\gamma$  gemessen als in der Kontrollgruppe. Zum 24 h-Zeitpunkt ist die IFN- $\gamma$ -Konzentration bei laparotomierten Tieren auch deutlich höher als bei SID-operierten Tieren. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Kontrolle. +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ ; ++++  $p \leq 0,0001$  zwischen Laparotomie und Kontrolle. #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$ ; ####  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Laparotomie.  $n \geq 19$  pro Gruppe und Zeitpunkt.

### 5.6.5 Interleukin-10 im Splenozytenüberstand

IL-10 zeigte eine mediane Konzentration von 4,81 pg / ml bei unstimulierten Splenozyten von Kontrolltieren (gestrichelte Linie in Abbildung 35).

Nach Laparotomie reduzierte sich die IL-10-Konzentration zum 3 h-Zeitpunkt signifikant zur Kontrolle (Abbildung 35A). Zum 24 h-Zeitpunkt lies sich hingegen ein signifikanter Anstieg der IL-10-Konzentration sowohl nach Laparotomie als auch nach SID feststellen, wenn man diese mit der Kontrollgruppe vergleicht. Des Weiteren war die IL-10-Konzentration nach SID deutlich höher als nach Laparotomie (Abbildung 35B). Zum 6 h- und 72 h-Zeitpunkt gab es keine Gruppenunterschiede (nicht dargestellt).



**Abbildung 35 IL-10-Konzentration im Splenozytenüberstand**

Die IL-10-Konzentration sank nach Laparotomie zum 3 h-Zeitpunkt signifikant gegenüber der Kontrolle ab (A). Zum 24 h-Zeitpunkt lies sich ein signifikanter Anstieg der IL-10-Konzentration nach Laparotomie im Vergleich zur Kontrolle beobachten. Ebenfalls zeigten SID-operierte Tiere zu diesem Zeitpunkt eine signifikant höhere IL-10-Konzentration als Kontrolltiere bzw. laparotomierte Tiere (B). Die gestrichelte Linie bei 4,81 pg / ml entspricht der medianen IL-10-Konzentration im unstimulierten Splenozytenüberstand der Kontrolltiere. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

## 5.7 Tryptophan-Metabolismus

Tryptophan (TRP) ist eine essentielle Aminosäure und wird, wenn nicht für die Proteinbiosynthese genutzt, vornehmlich zu Nikotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) abgebaut. Der primäre Schritt ist der Abbau zu Kynurenin (KYN) durch das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO). Dieses Enzym wird durch proinflammatorische Zytokine, Glukokortikoide und bakterielle Produkte induziert und hat immunmodulierende, primär immunsuppressive, Eigenschaften [3]. Die Abbauwege des Tryptophans sind in Abbildung 3 (Modifiziert nach [3]) dargestellt.

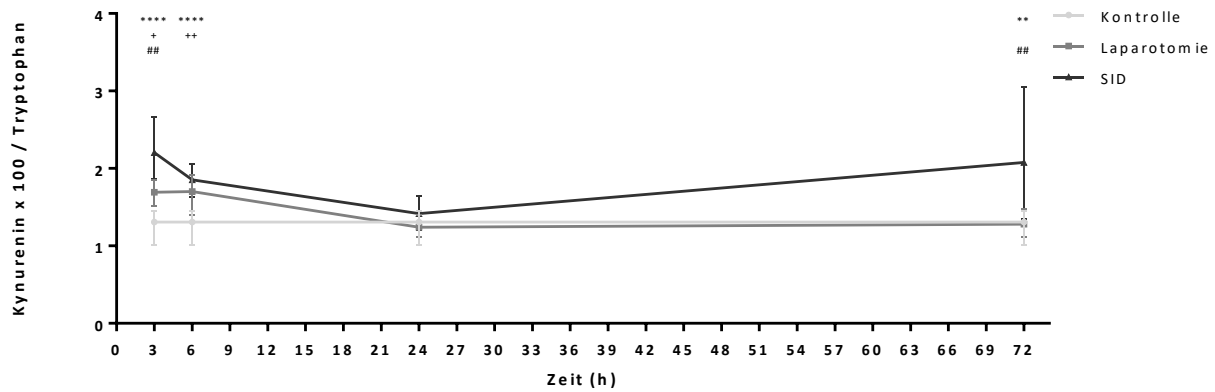
Massenspektrometrisch wurden in dieser Arbeit Tryptophan, Kynurenin, Kynureninsäure, Quinolinsäure, Xanthurensäure und Picolinsäure bestimmt.

### 5.7.1 Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase

Die Aktivität der IDO, dem Schlüsselenzym des Tryptophanmetabolismus, lässt sich aus dem Verhältnis des Produktes Kynurenin zum Substrat Tryptophan bestimmen und wird in Abbildung 36 gezeigt.

Sowohl 3 h als auch 6 h nach den operativen Eingriffen kam es zu einer signifikanten Zunahme der IDO-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle, wobei zusätzlich 3 h nach SID die IDO-Aktivität signifikant größer war als in der Laparotomiegruppe. Zum 24 h-Zeitpunkt waren keine Gruppenunterschiede erkennbar. Zweiundsiebzig Stunden nach SID fand man eine deutlich erhöhte IDO-Aktivität im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen.



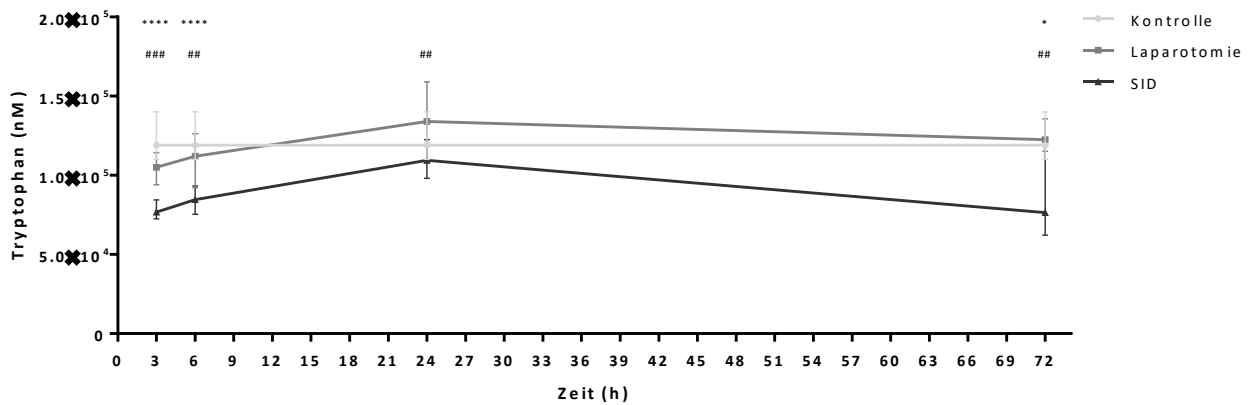


**Abbildung 36 Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase**

Die Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) lässt sich über das Verhältnis des Produkts Kynurenin und des Substrats Tryptophan bestimmen. Sowohl 3 h als auch 6 h nach SID und nach Laparotomie kam es zu einer Zunahme der IDO-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle, wobei sie 3 h nach SID noch signifikant höher war als nach Laparotomie. Eine erhöhte IDO-Aktivität war auch 72 h nach SID im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen feststellbar. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Kontrolle. +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ ; ++++  $p \leq 0,0001$  zwischen Laparotomie und Kontrolle. #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$ ; ####  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Laparotomie.  $n \geq 20$  pro Gruppe und Zeitpunkt.

Zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h und 72 h sah man eine deutliche Reduktion der Tryptophankonzentration bei SID-operierten Tieren im Vergleich zu den anderen Gruppen (Abbildung 37). Vierundzwanzig Stunden nach SID war die Tryptophankonzentration signifikant geringer als nach Laparotomie (Abbildung 37).

Die Kynureninkonzentration zeigte keine signifikanten Gruppenunterschiede (nicht dargestellt).

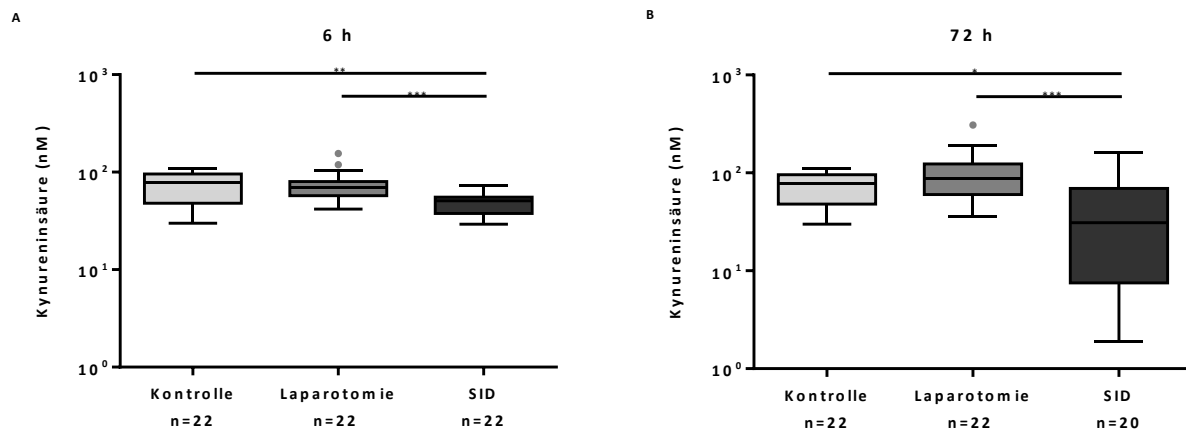


**Abbildung 37 Tryptophan-Konzentration im EDTA-Plasma**

Die Tryptophan-Konzentration wurde tandem-massenspektrometrisch im EDTA-Plasma bestimmt. Zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h und 72 h nach SID kam es zu einem signifikanten Abfall im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. 24 h nach SID war die Tryptophan-Konzentration nur im Vergleich zu laparotomierten Tieren erniedrigt. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Kontrolle. +  $p \leq 0,05$ ; ++  $p \leq 0,01$ ; +++  $p \leq 0,001$ ; ++++  $p \leq 0,0001$  zwischen Laparotomie und Kontrolle. #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$ ; ###  $p \leq 0,001$ ; ####  $p \leq 0,0001$  zwischen SID und Laparotomie.  $n \geq 20$  pro Gruppe und Zeitpunkt.

### 5.7.2 Weiterer Abbau des Kynurenins

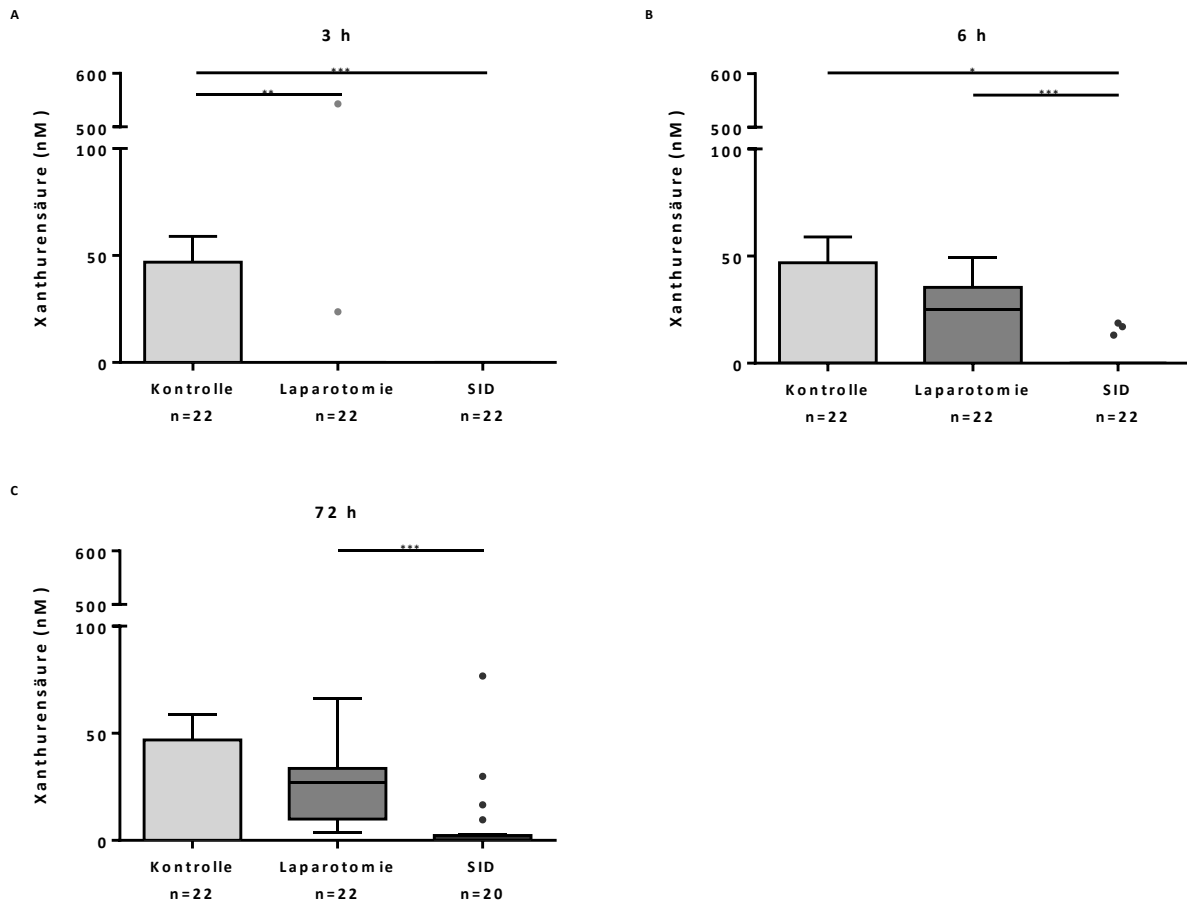
Das entstandene Kynurenin wird über verschiedene Stoffwechselwege weiter abgebaut, um für die Transamination, die Energiegewinnung oder  $\text{NAD}^+$ -Synthese genutzt zu werden (Abbildung 3). Betrachtet man die Kynureninsäure, fällt vor allem 6 h und 72 h nach SID auf, dass es zu einer signifikanten Reduktion ihrer Konzentration im Vergleich zu den anderen Gruppe kam (Abbildung 38). Dies war zu den anderen Zeitpunkten nicht nachweisbar (nicht dargestellt).



**Abbildung 38 Kynureninsäure-Konzentration im EDTA-Plasma**

Die Kynureninsäure-Konzentration war sowohl zum 6 h- (A) als auch zum 72 h-Zeitpunkt (B) nach SID signifikant niedriger als in beiden Vergleichsgruppen. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

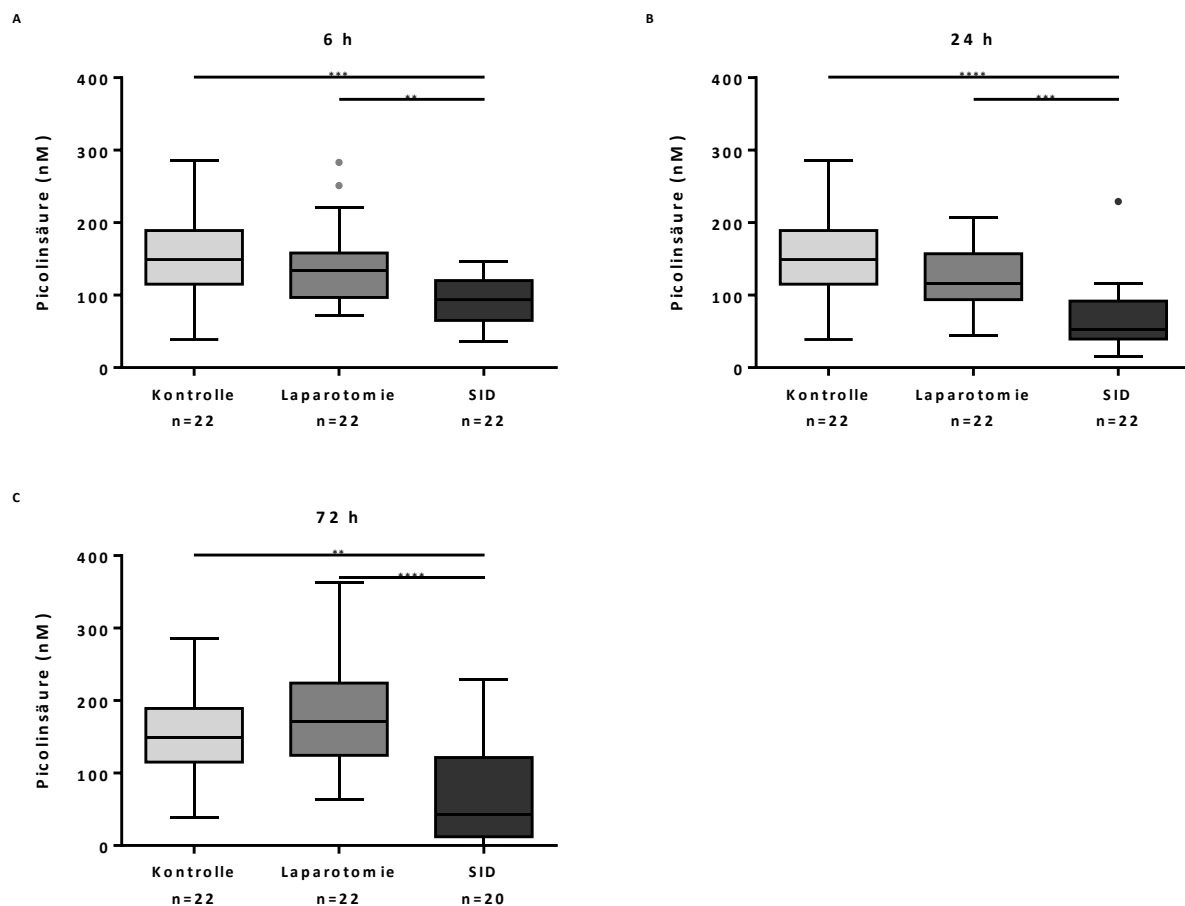
Ein weiteres Abbauprodukt ist die Xanthurensäure. Hier zeigt sich, dass ihre Konzentration 3 h nach beiden operativen Eingriffen signifikant geringer war als in der Kontrollgruppe (Abbildung 39A). Zum 6 h-Zeitpunkt war die Konzentration nach SID deutlich verringert im Vergleich zu den anderen Gruppen (Abbildung 39B). Diese Reduktion war auch zum 72 h-Zeitpunkt zu beobachten, wobei sie allerdings nur signifikant im Vergleich zur Laparotomiegruppe wurde (Abbildung 39C). Der 24 h-Zeitpunkt wies keine Gruppenunterschiede auf und ist daher nicht dargestellt.



**Abbildung 39 Xanthurensäure-Konzentration im EDTA-Plasma**

Dargestellt ist die Xanthurensäure-Konzentration im EDTA-Plasma zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h und 72 h. Der 3 h-Zeitpunkt zeigte eine signifikante Reduktion der Konzentration nach beiden chirurgischen Eingriffen im Vergleich zur Kontrollgruppe (**A**). Sechs Stunden nach SID wiesen die Tiere signifikant weniger Xanthurensäure auf als in den anderen Versuchsgruppen (**B**). Diese Reduktion war 72 h nach SID nur noch signifikant im Vergleich zu laparotomierten Tieren (**C**). Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Die Picolinsäure wurde ebenfalls bestimmt. Hierbei zeigte sich zum 6 h-Zeitpunkt, dass die Konzentration der Picolinsäure nach SID im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsgruppen signifikant erniedrigt war, was auch zu den späteren Zeitpunkten konstant blieb (Abbildung 40). Aufgrund von fehlenden Gruppenunterschieden ist der 3 h-Zeitpunkt nicht dargestellt.



**Abbildung 40 Picolinsäure-Konzentration im EDTA-Plasma**

Dargestellt ist die Picolinsäure-Konzentration im EDTA-Plasma zu den Zeitpunkten 6 h (A), 24 h (B) und 72 h (C). Auffällig ist, dass zu all diesen Zeitpunkten eine signifikante Reduktion der Konzentration nach SID zu beobachten war im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. Gezeigt sind der Median und Interquartilsabstände in *Box Plots* mit *Whiskers* nach Tukey. Die Gruppenunterschiede wurden mittels des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* auf Signifikanz geprüft. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$

Der letzte Parameter, der untersucht wurde, ist die Quinolinsäure, wobei hier allerdings keine Gruppenunterschiede gefunden werden konnten, sodass diese Daten nicht dargestellt sind.

Insgesamt kann man also sagen, dass es sowohl bei der Kynureninsäure, der Xanthurensäure und der Picolinsäure zu einer Reduktion der Konzentration nach SID im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen kam. Diese Reduktion ließ sich bei allen drei Parametern sowohl zum 6 h- als auch zum 72 h-Zeitpunkt nachweisen.

## 6 Diskussion

In Deutschland wurden im Jahr 2018 knapp 2,6 Millionen Operationen am Verdauungstrakt durchgeführt, was circa 15 % aller durchgeführten operativen Eingriffe entspricht [4]. Die daraus folgende Mortalität im Krankenhaus beträgt dabei in Deutschland 1,9 % [5], wobei die Hauptkomplikationen die Sepsis (4,3 %) und die Peritonitis (3,2 %) waren [5].

Die postoperative Sepsis verläuft zudem im Regelfall schwerer als eine spontan erworbene Sepsis, was aktuell durch eine vorbestehende Immunsuppression aufgrund des operative Traumas erklärt wird [32]. Da diese Trauma-induzierte Immunsuppression klinisch bedeutsam ist, aber bisher die grundlegenden Mechanismen dieser Immunsuppression nicht ausreichend verstanden sind, war Ziel dieser Arbeit, das postoperative Immunsystem nach viszeralchirurgischen Eingriffen im Tiermodell der *surgically-induced immune dysfunction* (SID) über einen Zeitraum von drei bis 72 Stunden genauer zu charakterisieren.

Da die SID ein ausgeprägtes Operationstrauma mit Darmmanipulation darstellt [33], wurden als Vergleichsgruppen sowohl Tiere mit geringer ausgeprägtem Operationstrauma ohne Darmmanipulation (reine Laparotomie) als auch nicht operierte Kontrolltiere verwendet, um eine Aussage über die Kinetik der Immunreaktion in Abhängigkeit von der Traumastärke treffen zu können.

### 6.1 Operationsstress und dessen Einfluss auf den physiologischen Zustand des Tieres

Der Stress durch die Operationen wurde anhand des Corticosteron-Levels der Tiere und anhand eines Belastungsscores evaluiert.

Corticosteron stellt in Nagetieren das wichtigste Stresshormon dar und wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse reguliert, wobei Faktoren wie Stress, inflammatorische Zytokine oder die Tag-Nacht-Rhythmik eine Ausschüttung von Glucocorticoiden bewirken [34]. Drei Stunden postoperativ zeigten beide operativen Eingriffe eine Elevation des Corticosteron-Konzentration im Serum im Vergleich zu unbehandelten Tieren, welches am ehesten durch den perioperativen Stress erklärbar ist [13] und unabhängig vom durchgeführten Eingriff ist. Die laparotomierten Tiere zeigten daraufhin wieder eine Normalisierung der Glucocorticoid-Konzentration, wohingegen die SID-operierten Tiere eine weiterhin erhöhte Konzentration bis 24 h nach Operation zeigten. Da, neben Stress, auch proinflammatorische Zytokine die Produktion von Glucocorticoiden fördern [13, 34], wären vor allem die deutlich elevierten IL-6-Konzentrationen nach SID im Vergleich zur Laparotomie eine mögliche Ursache der länger erhöhten Glucocorticoid-Level [35, 36].

Limitierend bei der Betrachtung des Stresslevels mithilfe des Corticosterons ist die circadiane Rhythmik, die Glucocorticoide aufweisen [37, 38], da es aufgrund des Versuchdesigns nicht möglich war, zur gleichen Tageszeit die Corticosteronwerte zu bestimmen. Folglich ist der Gruppenvergleich zu einem definierten Zeitpunkt gut möglich, aber die Kinetik der Glucocorticoid-Konzentration innerhalb einer Gruppe ist mit Einschränkungen zu bewerten. Eine Analyse der Corticosteron-Konzentrationen im Tagesverlauf durch Gong *et al.* [38] zeigte bei Mäusen zwischen 03:00 Uhr und 15:00 Uhr konstante Werte, sodass bei unseren Versuchen, welche in diesem Zeitrahmen stattfanden, die circadiane Rhythmik eine untergeordnete Rolle zu haben scheint.

Als weiterer Stressparameter wurde ein Belastungsscore herangezogen, welcher durchweg eine höhere Belastung der SID-operierten Tiere aufzeigte verglichen mit den laparotomierten Tieren. Dieses ist am ehesten auf das größere operative Trauma zurückzuführen.

Eine Möglichkeit zur Objektivierung des Traumas ist der Nachweis der Freisetzung von sogenannten *damage-associated molecular patterns* (DAMP), also Proteine, die bei Stress oder Zelltod ausgeschüttet werden [39]. Zu diesen DAMP gehört das *high-mobility group box protein* (HMGB1), welches ein nukleär lokalisiertes, DNA-bindendes Protein ist [40]. Es dient der Transkriptionsregulation, der interzellulären Kommunikation und wirkt als proinflammatorisches Zytokin [40]. HMGB1 korreliert unter anderem im Rahmen eines Traumas [41], eines hämorrhagischen Schocks [42], einer Sepsis [43] und bei einer akuten Appendizitis [44] mit dem Schweregrad der Erkrankung. In Vorarbeiten unsere Arbeitsgruppe wurde die HMGB1-Konzentration nach SID im Vergleich zur Laparotomie evaluiert, wobei zum 6 h-Zeitpunkt beide Versuchsgruppen erhöhte Level aufwiesen. Nach 24 h waren signifikant erhöhte HMGB1-Konzentrationen in der SID-Gruppe verglichen zur Laparotomie auffällig [33], sodass auch hier die HMGB1-Konzentration als Marker für die Schwere des Operationstraumas und der damit einhergehenden Belastung genutzt werden kann.

Infolge der durchweg signifikant erhöhten Belastung nach SID im Vergleich zur Laparotomie zeigten die Tiere einen ausgeprägteren Abfall des Körpergewichts im Rahmen des chirurgisch ausgelösten Stressstoffwechsels mit Neigung zum Katabolismus [2, 45].

Die laparotomierten Tiere gelang es, nach einem initialen Gewichtsverlust, ihr Gewicht ab 12 h postoperativ zu stabilisieren und ab 36 h postoperativ wieder zuzunehmen, wohingegen die SID-operierten Tiere auch bis zum Ende der Beobachtungszeit von 72 h weiterhin Gewicht verloren. Aus einer Weiterführung des Projektes in der Arbeitsgruppe ließ sich zeigen, dass die SID-Tiere ihr Gewicht ab circa dem dritten postoperativen Tag stabilisieren können und am siebten postoperativen Tag das Ausgangsgewicht erreichten [46]. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass es zu einer Verringerung der Belastung nach 72 h kam.

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung des physiologischen Zustandes des Tieres ist die Messung der Körpertemperatur. Dieser Parameter ist Teil der Kriterien um ein *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) zu diagnostizieren, wobei entweder eine Körpertemperatur größer oder gleich 38° C oder kleiner oder gleich 36° C eingeht [8]. Das SIRS ist die systemische Reaktion des Körpers auf einen inflammatorischen Reiz jedweden Ursprungs, also zum Beispiel aufgrund einer Infektion, eines Traumas, eines Schocks oder auch aufgrund einer ausgeprägten Pankreatitis [8]. Die operierten Tiere zeigten postoperativ eine Hypothermie mit dem Erreichen der minimalen Körpertemperatur nach 6 h, wobei die SID-operierten Tiere im Vergleich zu den laparotomierten Tieren eine signifikant niedrigere Körpertemperatur aufwiesen. Da bei beiden Operationsmethoden die Operationszeit gleich war und auch die gleiche Menge Flüssigkeit intraperitoneal substituiert wurde, sind dies keine Erklärungsansätze für die ausgeprägtere Hypothermie. Im Folgenden stabilisierte sich die Körpertemperatur bei den laparotomierten Tieren wieder, wohingegen die SID-operierten Tiere nur eine vorübergehende Stabilisation zeigten und nach 36 h eine signifikant niedrigere Körpertemperatur aufwiesen als laparotomierte Tiere. Die Körpertemperatur zeigte sich ab diesem Zeitpunkt nach SID weiter fallend.

Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, dass Hypothermie aus der Kombination von Verhaltensänderungen mit Bevorzugung einer kalten Umgebung, einer Reduktion der Thermogenese und einer Vasodilatation entsteht [47]. Des Weiteren konnten Liu *et al.* zeigen, dass Ratten nach Induktion eines SIRS mittels LPS oder E.coli ein signifikant verbessertes Überleben zeigten, wenn diese eine Hypothermie anstatt eines Fiebers entwickelten [48]. Sie stellten die Hypothese auf, dass sowohl Hypothermie als auch Fieber zu unterschiedlichen Zeiten eines SIRS eine wichtige Rolle in der Bewältigung dessen spielen, da das Fieber bei geringgradigen Infektionen der Pathogenelemination dient, wohingegen bei stark ausgeprägtem SIRS eher die Hypothermie den Erhalt der Körperfunktionen sicherstellt [48]. Dem scheinbar widersprechend scheinen Studien am Menschen zu sein, die eine erhöhte Mortalität von Sepsis-Patienten mit Hypothermie im Vergleich zu Fieber herausfanden [49]. Eine Meta-Analyse von Rumbus *et al.* zeigt allerdings, dass zwar Hypothermie ein prognostisch schlechter Faktor bei einer Sepsis ist, allerdings ist die Ursache dafür nicht die Hypothermie per se, da diese selbst nur ein Ausdruck einer schwerwiegenderen Erkrankung ist [50]. In der Zusammenschau dieser Daten lässt sich schließen, dass die SID mit einem SIRS einhergeht, was bei einer reinen Laparotomie nicht der Fall ist, sodass die Tiere zur Sicherung der Organfunktion nach SID eine Hypothermie entwickeln. In diesem Zusammenhang sollte aber dennoch erwähnt werden, dass trotz scheinbarer Intensität der postoperativen Reaktion im Untersuchungszeitraum keine Todesfälle nach SID aufgetreten sind.



Insgesamt legen die oben genannten Befunde nahe, dass die SID im Vergleich zur Laparotomie zu ein stärkeres Trauma darstellt und somit eine ausgeprägtere Veränderungen des Organismus im Sinne eines SIRS induziert, wobei im Weiteren genauer auf die Reaktion des Immunsystems auf diese Herausforderung eingegangen wird.

## **6.2 SID – Tiermodell zur Induktion eines abakteriellen oder doch bakteriell ausgelösten *systemic inflammatory response syndrome*?**

Der Begriff SIRS wurde in der ersten Sepsisdefinition 1991 eingeführt als eine schwere Allgemeinreaktion des Organismus auf eine Vielzahl von Schädigungen, unter anderem auch durch Infektionen, die dann als Sepsis zu werten sind [8]. Ziel war es, einfache klinische Parameter zu finden, die Patienten identifizieren mit erhöhtem Risiko für eine Sepsisentwicklung.

Ein Ziel der Arbeit war herauszufinden, ob das SID-Modell ein SIRS-ähnliches Krankheitsbild aufgrund einer Infektion oder alleine aufgrund des Operationstraumas auslöst. Um diese Frage zu klären, wurde die Anzahl der bakteriellen koloniebildenden Einheiten in Blut, Peritoneallavage, Leber, Niere, Milz und Lunge bestimmt.

Die Bedeutung von Blutkulturen beim Verdacht auf eine Sepsis wird durch die „*Surviving Sepsis Campaign*“ betont. Die Initiatoren haben in ihren 2018 erneuerten Leitlinien die Gewinnung von Blutkulturen als essentiellen Bestandteil der ersten Stunde der Sepsisbehandlung hervorgehoben [51]. In den gewonnenen Blutproben in unserem Versuch ließ sich zu keinem Versuchszeitpunkt eine signifikant größere bakterielle Belastung der SID-operierten Tiere nachweisen als in den anderen Versuchsgruppen. Diese Versuchsergebnisse sollten einen allerdings keinesfalls dazu verleiten die SID unverzüglich als steriles Modell für ein SIRS anzusehen, da auch bei einer schweren Sepsis bei circa 40–60 % der Patienten keine Bakteriämie durch Blutkulturen nachgewiesen werden kann [52]. Dies wird in der neuen Sepsisdefinition auch hervorgehoben, da dort die Sepsis als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion durch eine dysregulierte Immunantwort aufgrund einer vermuteten Infektion definiert wird [9], also der Erregernachweis nicht mehr erforderlich ist. Darüber hinaus haben Alqarni *et al.* in einer prospektiven Studie Patienten der Intensivstation mit postoperativen intraabdominellen Infektionen untersucht und fanden keinen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer Bakteriämie und der Morbidität und Mortalität der Patienten [53]. Außerdem wiesen nur 19 % der Patienten mit intraabdominellen Infektionen eine Bakteriämie auf [53].

Da die alleinige Gewinnung von Blutkulturen also nicht abschließend klären kann, ob wirklich eine Infektion vorliegt, wurden auch Leber, Lunge, Milz, Niere und die Peritoneallavage analysiert. Nach Durchführung der SID lag bei diesen Proben jeweils zum 24 h- und 72 h-Zeitpunkt eine signifikant höhere bakterielle Belastung vor im Vergleich zur Laparotomiegruppe und zur Kontrollgruppe.

Verschiedene Theorien zur Entwicklung dieser bakteriellen Belastung sind denkbar. Zum einen kann es sich entweder um Bakterien der Außenwelt handeln, die durch den operativen Eingriff in das Tier gelangen und aufgrund der SID nicht mehr suffizient bekämpft werden. Eine weitere Theorie ist, dass die SID eine Perforation des Darms auslöst und somit Darminhalt in die Bauchhöhle gelangt. Zuletzt sollte die Möglichkeit der bakteriellen Translokation über die Darmwand durch die SID in Betracht gezogen werden.

Um den Ursprung der Bakterien genauer zu bestimmen, müsste im vorgegebenen Setting nicht nur die gesamte bakterielle Belastung untersucht werden, sondern eine Speziesbestimmung vorgenommen werden. Diese Spezies müssten dann mit dem bakteriellen Mikrobiom des Darms verglichen werden zur Bestimmung von Übereinstimmungen. Da allerdings zu den frühen Zeitpunkten bei den Tieren keine bakterielle Belastung der Peritonealflüssigkeit nachzuweisen war, scheint die Kontamination während der Operation eher unwahrscheinlich.

Eine Darmperforation zur Auslösung einer intraabdominellen Infektion mit konsekutiver Sepsis wird in verschiedenen Tiermodellen genutzt wie zum Beispiel dem Modell der *cecal ligation and puncture* [54] oder der *colon ascendens stent peritonitis* [55]. Diese Modelle weisen innerhalb von 24 h eine erhöhte Mortalität auf [56]. Da diese Mortalität nach SID nicht beobachtet wurde, scheint durch die Darmmanipulation keine relevante Perforation ausgelöst worden zu sein.

Reddy *et al.* konnten nachweisen, dass die intraoperative Darmmanipulation zu einer bakteriellen Translokation führt indem sie mesenteriale Lymphknoten untersuchten [57]. Ergänzend konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass auch ein postoperativer Ileus zu einer Translokation von Bakterien in mesenteriale Lymphknoten und Leber 24 h nach Ileusinduktion führt [58]. Beide Faktoren haben wahrscheinlich auch in unserem Tiermodell zum Nachweis von Bakterien in Leber, Lunge, Milz, Niere und Peritonealflüssigkeit geführt, da eine ausgeprägte Manipulation durchgeführt wurde und die SID eine Abwandlung eines Ileusmodells ist.

Darüber hinaus kann aber auch eine Operation, ein Trauma oder auch eine Verbrennungen zur Störung der Barrierefunktion des Darms führen und damit zur bakteriellen Translokation [59, 60]. Das führte zu der Theorie des Darms als Ursache der Sepsis, die besagt, dass eine Translokation von Darmbakterien eine Infektion an verschiedenen Organen bedingen kann [61]. Dabei gibt es zwei Theorien wie die Darmbakterien die anderen Organe erreichen: Zum einen ist bei einer Schädigung der Darmwand eine bakterielle Translokation über die Portalvene in die Leber möglich, dieses konnte aber bisher nicht durch ausreichende Daten belegt werden [62]. Die heutzutage anerkannte Theorie ist, dass es aus den mesenterialen Lymphknoten über das lymphatische System zu einer Ausbreitung der Bakterien und vor allem bakterieller Bestandteile kommt, die ein SIRS auslösen [62].

Es konnte gezeigt werden, dass das SIRS selbst durch proinflammatorische Zytokine wie INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  die interstitielle Barrierefunktion, durch eine Störung der Zellverbindungen, mindert [63], sodass ein *circulos vitiosus* aus bakterieller Translokation und SIRS entsteht [62].

Zusammenfassend scheint die SID eine Kombination der unterschiedlichen Mechanismen der SIRS-Induktion aufzuweisen. Aufgrund des anfänglich fehlenden Bakteriennachweises, wird das SIRS vornehmlich durch DAMP ausgelöst. Daraufhin schwächt das SIRS selbst und der postoperative Ileus die interstitielle Barriere weiter und es kommt zur vermehrten bakteriellen Translokation mit Unterhaltung des SIRS und der Möglichkeit einer Sepsisentwicklung bei einer andauernden oder erneuten bakteriellen Belastung.

### **6.3 Reaktionen des Immunsystems auf ein operatives Trauma**

Schon im Jahr 1995 stellten Moore und Moore die Theorie auf, dass nach einem Trauma eine zweiphasige Immunantwort mit initialer hyper- und späterer hypoinflammatorischen Phase entsteht [64]. Dieses Konzept, dargestellt in Abbildung 1, wurde weiterentwickelt, die Begriffe des SIRS und CARS wurden eingeführt und die Gültigkeit für chirurgische Traumata wurde ergänzt [1]. Dieses Modell bietet eine Erklärung dafür, dass Patienten nach operativen Eingriffen in der Regel eine erhöhte Anfälligkeit für infektiöse Komplikationen zeigen und bei Entwicklung einer Sepsis eine höhere Morbidität und Mortalität aufweisen [1, 32].

Bei der Analyse des Immunstatus nach SID wiesen wir in Grundzügen einen gleichartigen Verlauf auf mit einer primär hauptsächlich proinflammatorischen Aktivität, die zwischen dem 6 h- und 24 h-Zeitpunkt in eine eher antiinflammatorische Reaktion überging, was im Folgenden als Gerüst genutzt wird, um die Immunreaktion nach SID zu erläutern.

#### **6.3.1 Frühe, primär proinflammatorische Reaktion des Immunsystems**

##### **6.3.1.1 Zellen des angeborenen Immunsystems dominieren die frühe Reaktion**

Die erste Reaktion des Immunsystems wird durch das angeborene Immunsystem initiiert [1], welches vor allem Erreger eliminieren soll und die Antigenpräsentation ermöglicht.

Zunächst betrachteten wir die neutrophilen Granulozyten, die essentielle Aufgaben bei der Initiation einer proinflammatorischen Reaktion einnehmen, aber auch den Entzündungsprozess begrenzen und die Gewebsreparatur positiv beeinflussen [65]. Neutrophile werden durch pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP: *pathogen-associated molecular patterns*) und DAMP, sowie ortsansässige Makrophagen stimuliert. Ihre Aufgabe ist die Einwanderung ins Gewebe zur Pathogenbeseitigung [65, 66], die Herstellung wichtiger proinflammatorischer Zytokine wie zum Beispiel IL-6 oder TNF- $\alpha$  [18] und die Rekrutierung weiterer Immunzellen [65].

Sowohl im Blut als auch in der Milz kam es primär zum 3 h- und 6h-Zeitpunkt zur signifikanten Zunahme der neutrophilen Granulozyten nach SID im Vergleich zur Kontrolle und Laparotomie bzw. nur zur Kontrolle. Laparotomierte Tiere wiesen keinen Anstieg ihrer neutrophilen Granulozyten im Blut auf, wohingegen eine anfängliche Zunahme in der Milz zu beobachten war.

In der Peritoneallavage wurde durch beide Operationen ein dauerhafter Anstieg der Neutrophilen im Vergleich zur Kontrolle ausgelöst.

In unserer Arbeitsgruppe konnte weiterhin gezeigt werden, dass es zu einer Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Darmwand des Dünndarms nach SID kommt [33].

Die SID scheint, am ehesten aufgrund des größeren Traumas, eine verstärkte Immunantwort vor allem in den ersten 6 h zu verlangen, sodass es in allen untersuchten Kompartimenten zu einer deutlichen Zunahme der Neutrophilen kam. Bemerkenswert ist, dass ein geringeres Trauma, wie es bei der Laparotomie vorliegt, die Neutrophilenanzahl im Blut nicht beeinflusst, wohingegen es zu einer Zunahme in der Peritoneallavage, also der Abdominalhöhle als Ort des Traumas, und der Milz als lymphatisches Organ kam.

Begrenzend muss man aber sagen, dass die Zahl der Neutrophilen zwar einen Hinweis auf eine höhere proinflammatorische Aktivität geben kann, aber letztlich keine Aussage über die Funktionsfähigkeit der Neutrophilen erlaubt. Kovtun *et al.* fassten in einem Review die Veränderungen von Neutrophilen durch ein Trauma zusammen, wobei vor allem deutlich wurde, dass die exzessive Freisetzung von neutrophilen Granulozyten zu einer Erschöpfung des Knochenmarks führt [67]. Auf weitere bakterielle Stimuli kann nicht mehr adäquat reagiert werden [67]. Des Weiteren verändern sich die Neutrophilen und bilden vermehrt reaktive Sauerstoffspezies, die zusätzliche Gewebeschäden verursachen [67]. Ob die deutliche Zunahme der Neutrophilen nach SID letztlich eine nötige Anpassung an größere traumatische Schäden ist oder doch schon Ausdruck einer dysregulierten Immunantwort, ließe sich nur mithilfe von Funktionsassays klären.

Weitere Zellen des angeborenen Immunsystems mit überwiegend proinflammatorischen Eigenschaften sind Monozyten und Makrophagen, die der Pathogenelimination dienen, eine adaptive Immunantwort auslösen und Hauptproduzent von proinflammatorischen Zytokinen sind [18, 68].

Das Monozyten-Makrophagen-System reagierte in den untersuchten Kompartimenten unterschiedlich. Im Blut war zu den frühen Zeitpunkten nach SID (3 h und 6 h) eine Zunahme der Monozyten im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Die Laparotomie hatte keinen signifikanten Effekt auf die Monozyten im Blut und auch spätere Zeitpunkte zeigten keine Gruppenunterschiede. In der Milz war zum 3 h-Zeitpunkt eine signifikante Zunahme der

Makrophagen nach den operativen Verfahren zu sehen, wobei hier das Maß des operativen Traumas keine Auswirkungen zeigte.

Die Reaktionen in Blut und Milz lassen sich am ehesten durch die Mobilisation von Monozyten aus dem Knochenmark erklären, welche durch das Zytokin CC-Chemokinligand 2 (CCL2) entsteht, das am Ort einer Entzündung nach IL-6-Stimulation gebildet wird [69]. Interessanterweise scheint der entzündliche Stimulus, der durch eine Laparotomie ausgelöst wird, nicht ausreichend zur Monozytenmobilisation zu sein. Dieses deckt sich mit der signifikant höheren IL-6-Ausschüttung nach SID im Vergleich zur Laparotomie zu den frühen Zeitpunkten.

In der Peritoneallavage war, im Gegensatz zu den beiden anderen Kompartimenten, von Beginn an eine signifikante Suppression der Makrophagen durch die Operationen zu sehen, wobei 3 h nach SID auch signifikant weniger Makrophagen zu beobachten waren als nach der Laparotomie. Die Makrophagenanzahl blieb nach SID über den gesamten Versuchsverlauf gegenüber der Kontrollbeziehungsweise Laparotomiegruppe erniedrigt. In Folgeprojekten konnten wir in einem kombinierten Modell aus SID und CASP zeigen, dass bei diesem, im Gegensatz zu der Kombination aus Laparotomie und CASP, ein erhöhter Makrophagenanteil in der Darmwand nachweisbar war (eingereicht bei Scientific Reports [70]). Daher wäre eine Erklärung für die verringerte Makrophagenanzahl in der Peritoneallavage, dass diese in die Darmwand als Ort der Schädigung einwandern. Kalff *et al.* fanden in ihrem Ileusmodell, an welches die SID angelehnt ist, ebenfalls vermehrt Makrophagen in der Darmwand, die sie durch die Rekrutierung von Monozyten über aktivierte ortsständige Makrophagen erklären [28]. Zur Stützung dieser Theorie müsste Studien zum Migrationsverhalten von peritonealen Makrophagen *in vivo* folgen.

Ein weiterer Ansatz wäre, dass das operative Trauma zur vermehrten Apoptose der peritonealen Makrophagen führt. Zhu *et al.* zeigten, dass HMGB1 *in vitro* eine Apoptose von Makrophagen auslöste [71]. Ob dieses *in vivo* auch möglich ist, ist aktuell nicht bekannt.

Zuletzt sollte man die Peritonealmakrophagen der Maus nicht nur als eine einheitliche Entität begreifen. Ghosn *et al.* änderten das Verständnis von Peritonealmakrophagen, indem sie zwei Subpopulationen unterschieden [72]. Sie fanden große Peritonealmakrophagen, welche CD11b stark exprimieren, in der Peritonealhöhle von unbehandelten Tieren. Nach Stimulation mit LPS oder Thioglykolat hingegen waren kleine Peritonealmakrophagen, die wenig CD11b exprimieren, die Hauptpopulation. Diese kleinen Peritonealmakrophagen entstanden aus Blutmonozyten und nicht aus den großen Peritonealmakrophagen, weswegen die Autoren proklamierten, dass die Stimulation entweder zum Untergang der großen Peritonealmakrophagen führte, deren Migration bedingte oder zu einer Adhärenz am Peritoneum beitrug [72]. Insgesamt zeigten die Subtypen allerdings keine Funktionsunterschiede [72]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Makrophagen

anhand ihrer starken CD11b-Expression definiert, sodass die kleinen Peritonealmakrophagen nicht mit erfasst wurden.

Weitere Antigen-präsentierende Zellen und Aktivatoren der T-Zellen sind die dendritischen Zellen (DC), die damit eine wichtige Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem darstellen [73]. Wir haben erwartet, dass nach SID auch bei diesen Zellen eine frühzeitige Hochregulation in der Milz stattfindet, allerdings zeigte sich bereits zum 3 h-Zeitpunkt eine verminderte Anzahl von DC im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die dendritischen Zellen allerdings noch einen normalen MHCII-Besatz auf, sodass die Antigenpräsentation wahrscheinlich intakt war. Kawasaki *et al.* zeigten in einem Trauma-Tiermodell durch Blutungen, dass es bereits frühzeitig zu einem Abfall der DC der Milz kam, wobei diese allerdings auch zu Beginn eine Reduktion der MHCII-Expression aufwiesen [22]. Die Sepsisforschung ergab ebenfalls, dass dendritische Zellen bei einer Sepsis in der Milz und im Blut vermindert vorkommen [74-76], wobei die Hauptursache eine vermehrte Apoptose der DC ist [74]. Unsere Arbeitsgruppe konnten in der Milz keine vermehrte Apoptose nach SID nachweisen [77], sodass die Ursache des Verlusts der DC noch weiter untersucht werden muss.

Die meisten Zellen des adaptiven Immunsystems, mit Ausnahme der peritonealen B-Zellen, auf die im Rahmen der späten antiinflammatorischen Reaktion näher eingegangen wird, waren zu den frühen Zeitpunkten durch die operativen Interventionen nicht beeinflusst.

### **6.3.1.2 Zytokine in der frühen Phase der Immunreaktion**

Zytokine sind die Botenstoffe, die eine Immunreaktion beeinflussen, regulieren und die Zell-Zell-Kommunikation ermöglichen, wobei eine Immunreaktion immer mit sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Zytokinen einhergeht [18].

In unserem Modell gab es zu den frühen Zeitpunkten Veränderungen der Serumzytokine Interleukin-6 und Interleukin-10.

Interleukin-6 wird häufig als das klassische Zytokin der Akut-Phase-Reaktion angesehen mit pro- und teilweise antiinflammatorischen Funktionen [18]. Gerade in der Sepsis- und Traumaforschung wird IL-6 genutzt, da es mit der Mortalität, der Morbidität und dem chirurgischen Trauma korreliert [19, 78-80]. In der vorliegenden Arbeit lösten beide Operationen bis zum 24 h-Zeitpunkt einen signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle aus, wobei in den ersten 6 h nach SID signifikant mehr IL-6 als nach der Laparotomie beobachtet wurden. Die maximale IL-6-Konzentration wurde nach der SID zum 3 h-Zeitpunkt erreicht, während dies nach der Laparotomie erst zum 6 h-Zeitpunkt der Fall war. Auch im Weiteren blieb das IL-6 nach SID erhöht, während es zum 72 h- Zeitpunkt nach Laparotomie wieder auf Kontrollniveau war. Dies war für uns nicht überraschend, da wir in Vorarbeiten bereits einen raschen IL-6-Anstieg

nachweisen konnten [33], interessant war allerdings, dass die hohen IL-6-Werte bis zu 72 h persistierten. Im Vorfeld erreichte das IL-6 24 h nach SID erneut das Kontrollniveau [33]. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede ist, dass der Grad des Traumas der SID abhängig vom Operateur ist und wahrscheinlich in dieser Arbeit größer als in den Vorarbeiten war. Zwar wurde das Maximum der IL-6-Antwort bereits zum 3 h-Zeitpunkt erreicht, was für eine frühe proinflammatorische Reaktion spricht, aber die persistierende Erhöhung scheint hinweisend darauf zu sein, dass pro- und antiinflammatorische Reaktionen nicht linear aufeinander folgen, sondern zeitgleich im unterschiedlichen Ausmaß stattfinden. Dies zeigte auch das 2011 von *Xiao et al.* publizierte Modell, welches auf Genexpressionsdaten von Leukozyten basiert, da sie eine schnelle und zeitgleiche Hochregulation sowohl von pro- als auch antiinflammatorisch wirkenden Genen bewiesen [12]. Das Modell wurde von *Gentile et al.* noch weiterentwickelt und es entstand das Modell des Syndroms der persistierenden Entzündung, Immunsuppression und des persistierenden Katabolismus (*PICS – persistent inflammation/immunosuppression catabolism syndrome*), das nach einer initialen Immunreaktion mit pro- und antiinflammatorischen Anteilen bei einigen Patienten eine chronische Erkrankung mit weiterbestehender Immundysfunktion beschreibt [2].

Das würde auch erklären, wieso IL-10, ein antiinflammatorisches Zytokin welches die Lymphozytenfunktion hemmt und die Antigen-Präsentation negativ beeinflusst [81], bereits ab dem 3 h-Zeitpunkt nach SID signifikant erhöht war gegenüber der Kontrolle und dies bis zum 6 h-Zeitpunkt blieb. Die späten Zeitpunkte wiesen darüber hinaus keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle auf. Verschiedene Traumamodelle zeigten einen ähnlichen frühzeitigen Anstieg der IL-10-Konzentration [82, 83], was in humanen Studien ebenfalls beobachtet werden konnte und mit Mortalität und Komplikationsraten assoziiert war [84-86]. Daraus wurde geschlossen, dass ein früher IL-10-Anstieg eine überschießende Proinflammation verhindern soll, was ein Nebeneinander von pro- und antiinflammatorischen Reaktionen bestätigt.

### **6.3.1.3 Funktionsstatus der murinen Splenozyten in der frühen postoperativen Phase**

Neben der Ausschüttung der Zytokine durch das operative Trauma ist vor allem wichtig, ob das Immunsystem noch adäquat auf einen weiteren Insult reagieren kann. Dieser weitere Insult könnte nach einer viszeralchirurgischen Operation beispielsweise die Entwicklung einer Peritonitis aufgrund einer Anastomoseninsuffizienz sein, die bei bis zu 10 % der gastrointestinalen Eingriffe auftritt [5]. Der zweite Insult wurde in der vorliegenden Arbeit *in vitro* durchgeführt, indem die Splenozyten mit LPS inkubiert wurden, das primär eine Stimulation der Monozyten auslöst.

Die von den Splenozyten freigesetzten Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  und IL-10 zeigten signifikante Veränderungen in ihren Konzentrationen durch die operativen Eingriffe. Zum 3 h-

Zeitpunkt war die Konzentration fast aller oben genannten Zytokine auf einen LPS-Stimulus hin durch beide operativen Eingriffe signifikant reduziert. Die Ausnahme stellt der IL-10-Gehalt dar, da die SID zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Veränderung auslöste. Überdies ist interessant, dass die Art des operativen Eingriffs keinen Effekt auf das Ausmaß der Suppression der Zytokine hatte. Die Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  zeigten auch noch zum 6 h-Zeitpunkt eine signifikante Reduktion nach den operativen Eingriffen im Vergleich zur Kontrolle.

Dass die Zytokinproduktion durch die operativen Eingriffe in der frühen Phase eingeschränkt ist, spricht für eine gewisse Anergie des Immunsystems. Diese Anergie ließ sich in unterschiedlichen klinischen Bereichen zeigen: Polytraumatisierte Patienten wiesen eine geringere Stimulationsfähigkeit der mononukleären Zellen des Blutes auf mit verminderten TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Spiegeln [87]. Patienten nach viszeralchirurgischen Eingriffen zeigten ebenfalls eine verminderte Stimulationsfähigkeit der Monozyten mit verringerten TNF- $\alpha$ - und IL-10-Konzentrationen und eine verminderte Ausschüttung von INF- $\gamma$  durch Lymphozyten [21]. Auch Sepsispatienten wiesen eine verminderte Stimulierbarkeit der Immunzellen des Blutes mit geringerer Produktion von IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  auf [88]. Vor allem die verringerte Produktion von TNF- $\alpha$  durch Monozyten wurde in mehreren Studien untersucht und war mit erhöhter Morbidität und Mortalität assoziiert [89, 90]. Zwar ist der Mechanismus der Anergie der Monozyten noch nicht ausreichend verstanden, aber insgesamt ist die Funktionseinschränkung der Monozyten ein früh einsetzender Faktor der Immunsuppression nach beiden Operationen.

### **6.3.2 Späte, primär antiinflammatorische Reaktion des Immunsystems**

Wie oben beschrieben ist nach einem operativen Trauma die Immunreaktion in der zweiten Phase vor allem antiinflammatorisch geprägt [1]. Im Folgenden werden die Veränderungen genauer beschrieben und eingeordnet.

Als einfacher Parameter, der einen groben Überblick über die Funktionsfähigkeit des Immunsystems gibt, wurde die Anzahl der Gesamtleukozyten im Blut betrachtet. Während zu den frühen Zeitpunkten (3 h und 6 h) keine Veränderungen in der Gesamtleukozytenzahl gesehen wurden, konnte zu den späten Zeitpunkten (24 h und 72 h) nach SID eine Reduktion der Leukozyten im Vergleich zu den anderen Gruppen beobachtet werden. Eine postoperative Immunsuppression wird als ein Verlust der zellulären Immunantwort beschrieben [21], worüber die Gesamtleukozytenzahl einen Überblick gibt. Dieser Verlust der zellulären Immunantwort wird, zumindest teilweise, über eine erhöhte Apoptoserate der Immunzellen erklärt. Ein Beispiel dafür zeigten Delogu *et al.*, die darstellten, dass chirurgische Eingriffe zur vermehrten Apoptose der T-Zellen führten [16]. Erwähnenswert ist, dass wir in eigenen Vorarbeiten in der Milz und im Thymus



von Mäusen keine erhöhte Apoptoserate nachweisen konnten [77], sodass es nach SID eher zu einer Apoptose der Lymphozyten im Blut kommen könnte wie sie von Oka *et al.* beschrieben wurde [77].

### 6.3.2.1 Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der antiinflammatorischen Phase

Die primär proinflammatorischen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zeigen zu den späteren Zeitpunkten keine Erhöhung mehr im Blut nach den operativen Eingriffen im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Darüber hinaus verringerte sich zum 24 h-Zeitpunkt die absolute Zahl der Makrophagen in der Milz nach beiden Operationen signifikant zur Kontrolle. Diese Makrophagen zeigen auch eine niedrigere MHCII-Expression als die Kontrollgruppe. Die MHCII-Expression, bzw. das menschliche Pendant der HLA-DR-Expression konnte schon früh mit einer Immunsuppression nach chirurgischem Trauma und damit erhöhter Infektionsanfälligkeit in Zusammenhang gebracht werden [91, 92]. Weiterführend dient die HLA-DR-Expression auch im Rahmen einer Sepsis als negativer Prädiktor für die Mortalität [93], sodass die Tiere bei einem zweiten traumatischen oder infektiösen Insult wahrscheinlich eine erhöhte Mortalität aufweisen würden. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurde in einem weiterführenden Projekt eine Sepsis 72 h nach SID mittels CASP ausgelöst und das erwartete Ergebnis zeigte sich (eingereicht bei Scientific Reports [70]).

Interessanterweise scheint ein leichteres operatives Trauma zu einer schnelleren Normalisierung der Immunsuppression zu führen als ein schweres, da 72 h nach Laparotomie die Makrophagen der Milz und der Peritoneallavage im Vergleich SID-Gruppe signifikant erhöht waren.

Die natürlichen Killerzellen stehen besonders im Fokus bei malignen Erkrankungen, da sie zytotoxisch sind [94]. Operative Eingriffe sind häufig der einzig kurative Behandlungsansatz bei malignen Erkrankungen, auch wenn bekannt ist, dass diese die Funktionsfähigkeit von NK-Zellen einschränken, was eine potentielle Metastasierung begünstigt [95]. Nach der SID fanden wir zum 24 h-Zeitpunkt signifikant weniger NK-Zellen im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Um den Einfluss der SID bei einer malignen Erkrankung genauer zu untersuchen, wird in unserer Arbeitsgruppe mit einem Kombinationsmodell aus SID und Pankreaskarzinom geforscht. Bei diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Durchführung einer SID, nicht aber einer Laparotomie, das Überleben mit einem Pankreaskarzinom vermindert [96]. Die pathophysiologischen Grundlagen dessen werden aktuell noch erforscht, aber eine Dysfunktion der NK-Zellen könnte Teil der Antwort sein. Zum 72 h-Zeitpunkt wiesen die laparotomierten Tiere signifikant mehr NK-Zellen auf, wobei die Bedeutung aktuell unklar bleibt.

Wie bereits oben erwähnt waren die dendritischen Zellen in der Milz nach der SID signifikant gegenüber der Kontrolle verringert. Dies war auch zum 24 h-Zeitpunkt der Fall, wobei zusätzlich die DC nach der Laparotomie vermindert waren im Vergleich zur Kontrolle und sogar eine

verminderte MHCII-Expression aufwiesen. Entgegengesetzt waren die DC 72 h nach der Laparotomie erhöht im Gruppenvergleich, aber wiesen eine normale MHCII-Expression auf. Die SID führte allerdings nach 72 h zu einer deutlich geringeren MHCII-Expression als in der Kontroll- und Laparotomiegruppe. Insgesamt scheinen also operative Eingriffe zu einer Störung der DC zu führen, die sich entweder durch eine verringerte Anzahl oder eine gestörte MHCII-Expression äußert. Die Veränderungen liefen durch das geringere Laparotomietrauma schneller ab und hielten nicht so lange an wie nach der SID. Mehr noch, scheint die initiale Immunsuppression durch die Laparotomie von einer überschießenden Gegenreaktion begleitet zu sein. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass kleine chirurgische Eingriffe, in einem gewissen Zeitfenster eine positive Immunmodulation auslösen. Dies konnten Kessler *et al.* in einem Sepsismodell zeigen, da Tiere nach der Implantation eines alloplastischen Materials bei einer unabhängig induzierten Sepsis ein verbessertes Überleben zeigten [97].

In der Peritoneallavage zeigte sich zu den frühen Zeitpunkten eine Suppression der DC nach den operativen Eingriffen im Vergleich zur Kontrolle, die dann aber zum 72 h-Zeitpunkt in eine deutliche Elevation nach beiden Operationen im Vergleich zur Kontrolle umschlug. Dies ist bisher in der Literatur nicht beschrieben und bedarf weiterer Untersuchungen, um die Rolle der DC in der Peritoneallavage eindeutig zu klären.

### **6.3.2.2 Zellen des adaptiven Immunsystems als Korrelat der Immunsuppression**

Die bereits oben vermutete Hypothese, dass die Zellen des adaptiven Immunsystems vor allem die späte Verringerung der Gesamtleukozyten im Blut verursachen, wird durch unsere Daten bestätigt. Die Lymphozyten waren ab 6 h nach SID signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert und zum 24 h- und 72 h-Zeitpunkt auch verringert im Vergleich zu laparotomierten Tieren. Die laparotomierten Tiere wiesen nur zum 6 h-Zeitpunkt signifikant weniger Lymphozyten als die Kontrolltiere auf.

Ein Subtyp der Lymphozyten sind die B-Zellen, deren Hauptaufgabe die Produktion von spezifischen Antikörpern ist und die über MHCII Antigene den T-Zellen präsentieren [98].

In der Milz konnte 24 h nach SID eine reduzierte Zahl der B-Zellen im Vergleich zu den anderen Gruppen festgestellt werden. Diese wiesen überdies auch eine geringere MHCII-Expression auf als die Kontrolltiere. Die Laparotomie veränderte zu diesem Zeitpunkt zwar nicht die Anzahl der B-Zellen im Vergleich zur Kontrolle, aber auch ihre MHCII-Expression war vermindert. Der 72 h-Zeitpunkt zeigte eine signifikante Erhöhung der B-Zellen bei laparotomierten Tieren gegenüber den anderen Gruppen bei normaler MHCII-Expression. Die Anzahl der B-Zellen 72 h nach SID war nicht verändert, aber sie wiesen eine signifikant niedrigere MHCII-Expression als die anderen Gruppen auf. Auch hier zeigte sich also das schon mehrfach gesehene Bild, dass Laparotomie und

SID prinzipiell ähnliche Immunantworten auslösen, diese nach SID aber deutlicher und länger nachweisbar sind.

Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Daten fanden eine Reihe von Studien, dass ein Trauma die Anzahl der B-Zellen nicht beeinflusst [21, 99, 100], sondern nur ihre Funktionsfähigkeit eingeschränkt, da eine erniedrigte HLA-DR-Expression gefunden wurde. Diese korrelierte mit der Wahrscheinlichkeit einer Sepsisentwicklung [100]. Eine mögliche Ursache für die Unterschiede zu unseren Daten könnte sein, dass es sich in den zitierten Studien um zirkulierende B-Zellen des Menschen handelt und nicht um murine B-Zellen der Milz.

In der Peritoneallavage waren die B-Zellen nach SID in den ersten 24 h signifikant geringer vorhanden als in der Kontrollgruppe, beziehungsweise zum 3 h-Zeitpunkt auch geringer als in der Laparotomiegruppe. Die laparotomierten Tiere wiesen zum 6 h- und zum 24 h-Zeitpunkt weniger B-Zellen als die Kontrolltiere auf, was sich zum 72 h-Zeitpunkt umkehrte, sodass nach Laparotomie deutlich mehr B-Zellen in der Peritoneallavage zu finden waren als nach SID oder in der Kontrolle.

Ein Mausmodell zur Zymosan-induzierten Peritonitis zeigte, dass nach Induktion der Peritonitis die anfänglich in der Peritonealhöhle enthaltenen Lymphozyten, vor allem B-Zellen, zeitweise nicht in der Peritonealhöhle zu finden sind und erst wieder bei Resolution der Inflammation die Peritonealhöhle bevölkern [101]. Zudem zeigen sie, dass eine verlängerte Inflammation mit einer verspäteten Wiederbevölkerung der Peritonealhöhle durch Lymphozyten einhergeht. Ein ähnlicher Mechanismus könnte nach einem operativen Trauma angenommen werden, wobei ein geringeres Trauma zu einer schnelleren Resolution der Entzündung und schnelleren Wiederbevölkerung der Peritonealhöhle führt. Was exakt mit den Lymphozyten der Peritonealhöhle passiert und wie die Wiederbevölkerung stattfindet bedarf weiterer Forschung.

Weitere Subtypen der Lymphozyten sind die CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die sich weiter in T-Effektorzellen und regulatorische T-Zellen einordnen lassen.

Insgesamt kam es bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einer Abnahme nach SID zum 6 h- und 24 h-Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrolle. Die laparotomierten Tiere wiesen keine Abnahme auf und waren zum 72 h-Zeitpunkt gegenüber den anderen Gruppen sogar erhöht. Wie bereits oben erwähnt gelang es Delogu *et al.* nachzuweisen, dass operative Eingriffe eine Apoptose bei T-Lymphozyten induzieren [16]. Sie konnten darüber hinaus zeigen, dass die T-Zellen vermehrt proapoptotische Faktoren exprimierten und antiapoptotische Faktoren herunterreguliert wurden. Interessanterweise scheint dies in unserem Versuchsaufbau nur bei dem größeren operativen Trauma der Fall zu sein, wohingegen die Laparotomie sogar zu einer Erhöhung der T-Zellen führen konnte.

Vor allem die Verteilung der T-Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen ist bedeutsam, da diese beiden Unterformen verschiedene Funktionen haben. Die CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen können sich aufgrund des umgebenen Zytokinmilieus in verschiedene Subpopulationen entwickeln wie zum Beispiel Th1-, Th2-, Th17- oder regulatorische T-Zellen [102]. Da zwar jede Subpopulation ihre eigene Spezialisierung hat, aber grob gesagt die Th1-, Th2- und Th17-Zellen für die Pathogenabwehr bedeutend sind während die regulatorischen T-Zellen vor allem der Immunsystemhomöostase dienen und primär antiinflammatorische Effekte haben [102], haben wir uns dazu entschieden, die regulatorischen T-Zellen den allgemeinen T-Effektorzellen gegenüber zu stellen.

Nachdem die Operationen zum 24 h-Zeitpunkt eine Zunahme der T-Effektorzellen im Vergleich zur Kontrolle herbeiführten, wurde zum 72 h-Zeitpunkt eine deutliche Umkehr ersichtlich: Der Anteil der regulatorischen T-Zellen nahm signifikant durch beide operativen Prozeduren zu, wobei es auch einen signifikanten Unterschied zwischen den operativen Gruppen gab mit mehr regulatorischen T-Zellen nach der SID. Dementsprechend invers verhielten sich die T-Effektorzellen. Die regulatorischen T-Zellen erreichen durch verschiedene Mechanismen eine Immunsystemhomöostase. Sie produzieren immunsupprimierende Zytokine wie IL-10 oder TGF- $\beta$ , darüber hinaus könne sie auch direkt hemmend auf Antigen-präsentierende Zellen und T-Zellen wirken [103, 104]. Verschieden chirurgische und nicht chirurgische Traumamodelle und humane Studien haben gezeigt, dass ein Trauma in der Regel eine Erhöhung des Anteils der regulatorischen T-Zellen bewirkt, was der Verhinderung eines überschießenden SIRS dienen soll [17, 105, 106]. Dies lies sich auch in unseren Daten nachvollziehen, wobei erneut die Traumastärke einen Einfluss auf die Stärke der Immunantwort zeigte. Als mögliche Mechanismen der prozentualen Vermehrung der regulatorischen T-Zellen werden eine erhöhte Apoptoseresistenz [107] und gegebenenfalls eine Proliferation nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  diskutiert [108]. Neben der absoluten Zunahme zeigten MacConmara *et al.*, dass die regulatorischen T-Zellen von Traumapatienten auch potenter in der Suppression von anderen T-Zellen waren als die von gesunden Probanden [104].

Weiterführend haben wir den Aktivierungsstatus der T-Zellen anhand der Marker CD25, CD69 und CTLA-4 beurteilt.

Ein früher und bereits zwei bis drei Stunden nach Stimulation nachweisbarer Aktivitätsmarker der T-Zellen ist CD69 [109]. Ein weiterer Aktivitätsmarker ist CD25, die Alphakette des Interleukin-2-Rezeptors, der auf aktivierten T-Zellen vermehrt exprimiert wird und auch auf regulatorische T-Zellen zu finden ist [110]. Die SID führte zum 24 h-Zeitpunkt zu einer vermehrten Expression von CD69 auf den T-Effektorzellen im Vergleich zu den anderen Gruppen. Zum 72 h-Zeitpunkt konnte

nach SID signifikant mehr CD25 auf den regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden als in den anderen Gruppen. Da die regulatorischen T-Zellen zum 72 h-Zeitpunkt nach SID vermehrt CD25 exprimierten liegt es nah, dass diese aktiver waren als in den anderen Gruppen. Zu diesem Zeitpunkt gelang die Immunsuppression durch zwei Mechanismen der T-Zellen: Zum einen erfolgte eine Umverteilung in Richtung regulatorischer T-Zellen und des Weiteren wurden die T<sub>reg</sub> aktiviert.

Vor allem interessant ist, dass die T-Effektorzellen nach SID zum 24 h-Zeitpunkt nur CD69 vermehrt exprimierten und zu keinem Zeitpunkt vermehrt CD25 aufwiesen. Aus der Sepsisforschung ist bekannt, dass T-Zellen, beispielsweise durch Interferone, aktiviert werden und CD69 aufweisen [111, 112]. Sofern diese aktivierten T-Zellen kein weiteres antigenspezifisches Signal erhalten, gehen sie frühzeitig in Apoptose [111, 112]. Dieser Mechanismus wäre wahrscheinlich auch durch ein postoperatives Trauma auslösbar und daher eine Erklärung für die Abnahme des Anteils der T-Effektorzellen an den gesamten T-Zellen zum 72 h-Zeitpunkt.

CTLA-4 ist ein Rezeptor, der inhibitorisch auf die T-Zell-Aktivierung wirkt [113]. Um dessen Funktion zu verstehen, muss man sich zunächst die Schritte der klassischen T-Zell-Aktivierung vergegenwärtigen [114]. Die T-Zell-Aktivierung läuft zweischrittig ab, wobei der T-Zell-Rezeptor ein Antigen bindet, welches ihm mittels MHC-Molekülen präsentiert wird. Dies reicht allerdings zur Aktivierung nicht aus, sodass noch ein co-stimulatorisches Signal der Antigen-präsentierenden Zellen benötigt wird. Dieses Signal ist die Bindung von CD80 oder CD86 auf aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen an CD28, welches von T-Zellen exprimiert wird. CTLA-4 wird von aktivierten T-Zellen gebildet und ist ähnlich dem CD28 aufgebaut, aber zeigt eine höhere Affinität gegenüber CD80 und CD86 und verhindert somit die weitere Aktivierung von T-Zellen [113]. Zudem kann CTLA-4 über Transendozytose auch die Expression von CD80 und CD86 auf Antigen-präsentierenden Zellen vermindern [115].

Sowohl die T-Effektorzellen als auch die regulatorischen T-Zellen zeigten 24 h nach SID eine signifikante Zunahme der CTLA-4-Expression im Vergleich zur Kontrolle, was den immunsuppressiven Status unterstreicht. Der 72 h-Zeitpunkt zeigte für die T-Effektorzellen das gleiche Ergebnis, aber die regulatorischen T-Zellen zeigten keine signifikante Zunahme von CTLA-4. Zusammenfassend sind die T-Zellen nach SID zu den späten Zeitpunkten in einem immunregulatorischen bis immunsuppressiven Zustand.

### **6.3.2.3 Zytokine in der späten Phase der Immunreaktion**

In der späten Phase konnten, wie bereits oben beschrieben, anhaltend elevierte IL-6-Level und zum 24 h-Zeitpunkt auch erhöhte IL-10-Konzentrationen nach SID beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte sich zum 72 h-Zeitpunkt eine signifikant erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration nach SID im

Vergleich zur Kontrolle. In Patientenseren nach viszeralchirurgischen Operationen konnte ebenfalls eine signifikante Zunahme der TNF- $\alpha$ -Konzentration festgestellt werden und zwar zum 24 h-Zeitpunkt [86]. Überdies konnten die Autoren auch eine Korrelation zwischen dem Quotienten aus IL-10 und TNF- $\alpha$  mit der Komplikationsrate zeigen und eine Korrelation der TNF- $\alpha$  Werte mit der Operationsdauer [86]. Nach Operationen an Hüftfrakturen fanden Saribal *et al.* 48 h postoperativ ebenfalls eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration [116]. Ein Faktor, der wahrscheinlich bedingt, dass zu den frühen postoperativen Zeitpunkten TNF- $\alpha$  nicht signifikant erhöht messbar war, ist dessen kurze Halbwertszeit von nur 14 Minuten [87], sodass wir den wahrscheinlichen initialen Anstieg nicht messen konnten. Dass ein proinflammatorisches Zytokin auch verzögert nach einem Trauma zu finden ist, spricht erneut für ein Nebeneinander von pro- und antiinflammatorischer Antwort.

### 6.3.2.4 Funktionsstatus der murinen Splenozyten in der späten postoperativen Phase

Im Gegensatz zur oben beschriebenen Unfähigkeit der Splenozyten auf einen zweiten Insult mit einer adäquaten Zytokinausschüttung in den ersten 6 h nach den Operationen zu antworten, scheint die Laparotomie und in Teilen auch die SID ab dem 24 h-Zeitpunkt einen fördernden Effekt auf die Zytokinproduktion zu haben. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  und IL-10 zeigten 24 h nach der Laparotomie eine erhöhte Konzentration im Vergleich zur Kontrolle und INF- $\gamma$  auch im Vergleich zu SID-operierten Tieren. Dieser Effekt hielt bei TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  auch bis zu 72 h nach der Laparotomie an. SID-operierte Tiere wiesen 24 h nach dem Eingriff signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 im Vergleich zur Kontrollgruppe und für IL-10 auch geltend im Vergleich zur Laparotomiegruppe auf. 72 Stunden nach SID waren alle Zytokin-Konzentrationen auf Kontrollniveau. Ob die vermehrte Stimulierbarkeit der Splenozyten *in vitro* durch eine Laparotomie, und zu einem gewissen Teil auch durch die SID, einen Überlebensvorteil bei einem zweiten Insult *in vivo* bringt, verbleibt aktuell unklar. Wie schon von Kessler *et al.* publiziert, scheint ein kleiner operativer Eingriff einen gewissen Überlebensvorteil in einem Sepsismodell auszulösen [97]. Hervorzuheben ist jedoch, dass dieser Effekt zeitabhängig ist und deshalb schwer nutzbar, da anfangs auch immunsupprimierende Effekte auftreten.

## 6.4 Immunsuppressive Wirkung über die Indolamin-2,3-Dioxygenase

Das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist das Schlüsselenzym des Tryptophankatabolismus und wirkt über dreierlei Mechanismen immunsuppressiv [23]. Der Review von Wu *et al.* fasst diese Mechanismen zusammen [23]: Zum einen bewirkt die Aktivierung der IDO einen Tryptophan-Mangel, der eine T-Zell-Anergie auslöst und die Bildung von T<sub>reg</sub> bedingt. Des Weiteren zeigen Abbaustoffe des Tryptophans immunsuppressive Eigenschaften und zuletzt bewirkt IDO in T<sub>reg</sub> eine

Aktivitätssteigerung. Während IDO vor allem in der Krebsforschung und auch schon im Bereich der Sepsis erforscht wurde, gibt es nach unserem Kenntnisstand bisher keine Daten zur Rolle von IDO in der postoperativen Immunreaktion.

Nach den operativen Eingriffen kam es zu den frühen Zeitpunkten zu einer Aktivitätszunahme der IDO gegenüber der Kontrolle, wobei zum 3 h-Zeitpunkt diese nach SID signifikant größer war als nach der Laparotomie. Bei den SID-behandelten Tieren ließ sich überdies auch zum 72 h-Zeitpunkt eine signifikant höhere Enzymaktivität nachweisen als in den anderen beiden Gruppen. Diese erhöhte Aktivität führte dazu, dass die Tryptophan-Konzentration abnahm, wobei aber die Kynurenin-Konzentration konstant blieb. Interessanterweise zeigten die weiteren Metabolite Kynureninsäure, Xanthurensäure und Picolinsäure einen Konzentrationsabfall nach der SID und zum Teil auch nach der Laparotomie zu den verschiedenen Zeitpunkten. Sowohl bei einem Trauma als auch bei einer Sepsis fand man eine Zunahme der IDO-Aktivität, die mit der Überlebensrate korrelierte [117-119]. Die Induktion von IDO wird durch Zytokine wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bedingt [120]. Wir konnten zu den frühen Zeitpunkten keine signifikante Zunahme dieser Zytokine finden, dies ist aber wahrscheinlich durch die kurze Halbwertszeit der Zytokine bedingt [87], sodass wir dennoch diese proinflammatorischen Zytokine für die IDO-Induktion verantwortlich machen. Die erhöhte IDO-Aktivität lässt eine Zunahme der Metabolite des Tryptophan-Katabolismus erwarten, doch war dies in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall. Eine mögliche Theorie wäre, dass die Metabolite sehr schnell verstoffwechselt werden, um NAD<sup>+</sup> und ATP zu produzieren, da in der postoperativen Phase ein erhöhter Energiebedarf vorliegt.

Neben dem Enzym IDO gibt es auch das Enzym Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TPO), welches in der Leber produziert wird und unter normalen Bedingungen den Metabolismus des Tryptophans katalysiert [118, 121]. Dieses Enzym wird durch Glucocorticoide induziert und es ist nicht auszuschließen, dass die sinkende Tryptophan-Konzentration durch eine erhöhte TPO-Aktivität mitbedingt ist, auch wenn es bei Aktivierung des Immunsystems an Bedeutung verliert [118, 121]. In unserer Arbeit konnte eine erhöhte IDO-Aktivität, ein Tryptophan-Mangel und vermehrte T<sub>reg</sub> nach der SID nachgewiesen werden, sodass zwei der drei von Wu *et al.* [23]beschriebenen Möglichkeiten der Immunsuppression durch IDO vorlagen. Die immunsuppressiven Eigenschaften der Tryptophan-Metabolite nehmen nach der SID keine bedeutende Rolle ein, da diese sogar vermindert vorliegen.

## 6.5 Überblick über die Immunreaktion nach viszeralchirurgischen Traumata

Die anfänglich proklamierte, zweiphasig ablaufende Immunreaktion scheint nur einen Teil der Vorgänge im Rahmen der Veränderungen nach viszeralchirurgischen Eingriffen abzubilden. Vielmehr gibt es von Beginn an sowohl pro- als auch antiinflammatorische Reaktionen mit

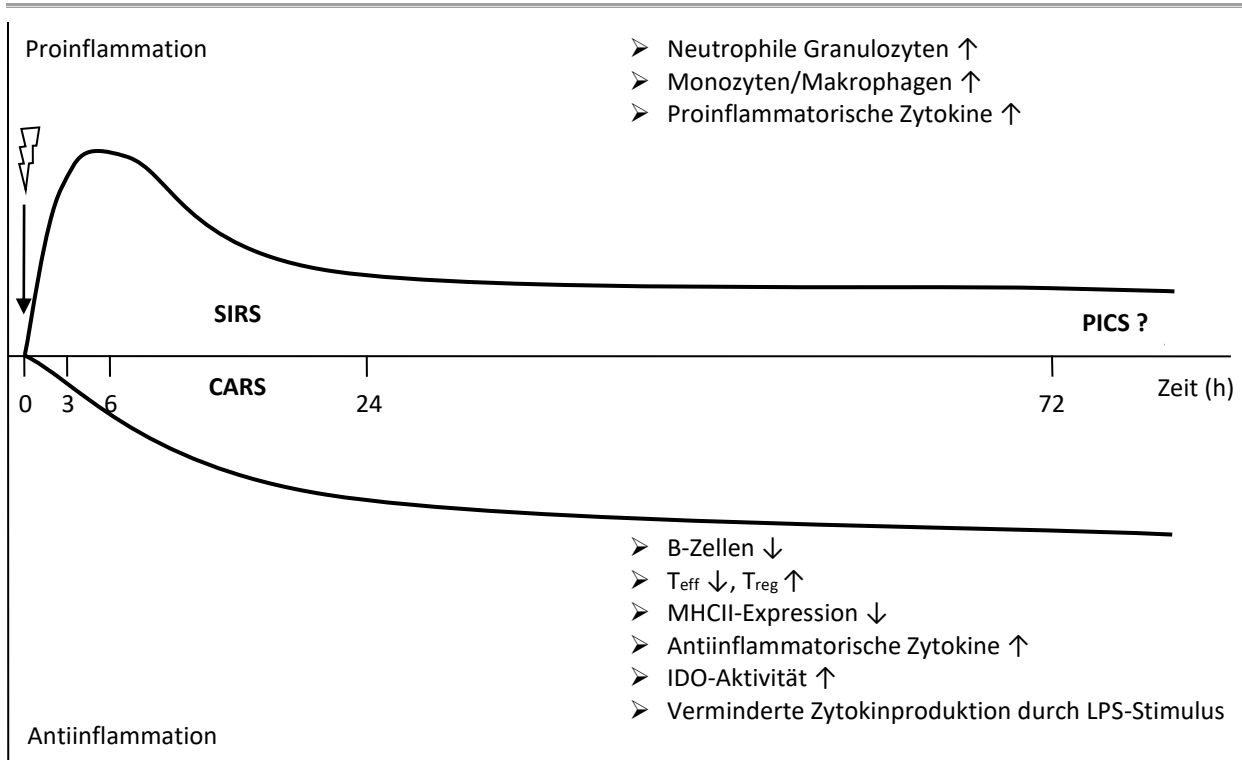
unterschiedlicher Kinetik und Ausprägung. Insgesamt kann die postoperative Reaktion anlehnd an das von Gentile *et al.* [2] aufgestellten Modells des Syndroms der persistierenden Entzündung, Immunsuppression und des persistierenden Katabolismus besser charakterisiert werden (Abbildung 41).

In den ersten 6 h überwiegt eine primär proinflammatorische Reaktion, die von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen und proinflammatorischen Zytokinen getragen wird. Zwischen dem 6 h- und 24 h-Zeitpunkt wird die Immunreaktion primär antiinflammatorisch durch einen Rückgang der Lymphozyten mit verringerter MHCII-Expression auf B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, einer Verschiebung von T-Effektorzellen zu regulatorischen T-Zellen, einer erhöhtenIDO-Aktivität, antiinflammatorischen Zytokinen und verminderter Reaktion auf einen LPS-Stimulus. Ob dieses operative Trauma ein PICS auslösen kann, können Langzeitbeobachtungen zeigen.

In der Peritonealhöhle war ein Anstieg der neutrophilen Granulozyten mit Abfall der Makrophagen und B-Zellen zu verzeichnen, wobei die Rolle der peritonealen Immunzellen und ihr Migrationsverhalten noch nicht abschließend geklärt ist.

Auch wenn zu den späteren Zeitpunkten nach SID eine signifikante bakterielle Belastung in verschiedenen Organen nachweisbar ist, scheint dies ein sekundäres Phänomen zu sein und nicht der Auslöser der vorliegenden Immunantwort.





**Abbildung 41 Schematische Darstellung der systemischen Immunreaktion durch die chirurgisch-induzierte Immundefizienz**

Das chirurgische Trauma (Dargestellt durch den Blitz) führt zu einer Immunantwort mit sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Komponenten. Während in den ersten 6 h nach der Operation zu einer überwiegenden proinflammatorischen Reaktion im Sinne eines *systemic inflammatory response syndroms* (SIRS) kommt, schlägt dieses zum 24 h–Zeitpunkt in eine primär antiinflammatorische Reaktion, dem *compensatory antiinflammatory response syndrome* (CARS) um. Ob darüber hinaus ein *persistent inflammation/immunosuppression catabolism syndrome* (PICS) entsteht, bedarf weiterer Forschung. Die verantwortlichen Mechanismen des SIRS und CARS sind ergänzend dargestellt. *Major Histocompatibility Complex Class II* (MHCII), T-Effektorzellen (Teff), regulatorische T-Zellen (Treg), Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), Lipopolysaccharid (LPS). Abgewandelt nach Gentile *et al.* [2].

In vielen Bereichen löst eine reine Laparotomie eine ähnlich ablaufende Immunreaktion aus, die allerdings nicht das Ausmaß wie nach der SID erreicht und schneller abläuft. Interessanterweise scheint eine gewisse Vorbereitung des Immunsystems durch die Laparotomie stattzufinden, wobei dessen Bedeutung auf Morbidität und Mortalität noch weitgehend unklar bleibt.

Trotz der überzeugenden Ergebnisse unseres Modells, sollte auf ein paar Limitationen dessen eingegangen. Zum einen trat bei den Tieren eine deutliche Hypothermie auf, die, durch ein besseres Temperaturmanagement, verhindert werden könnte. Des Weiteren erhielten die Tiere keine perioperative Antibiose, was häufig Standard bei viszeralchirurgischen Eingriffen ist und es wurde nur ein intraoperatives Flüssigkeitsmanagement durchgeführt. Der Versuchszeitraum von 72 h war möglicherweise noch nicht ausreichend, um die Entstehung eines PICS zu beurteilen, sodass längere Beobachtungen nötig wären. Eine Limitation von Tiermodellen generell ist die oft in Frage gestellte Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus, was die Entwicklung von Behandlungsstrategien erschweren könnte.

Bei Menschen ist ein viszeralchirurgischer operativer Eingriff immer noch ein bedeutender Einschnitt, der mit Komplikationen einhergeht und Morbidität und Mortalität bedingt [122]. Um dieses zu verändern ist ein genaues Verständnis der postoperativen pathophysiologischen Vorgänge nötig, damit mögliche Interventionspunkte gefunden werden können.

Heutzutage wird an verschiedenen Strategien geforscht, um die postoperative Immunantwort positiv zu beeinflussen. Bekannt ist, dass das chirurgische Trauma möglichst gering sein sollte [123], eine Hypothermie vermieden werden sollte [124] und regionalanästhetische Verfahren vorteilhaft sind [125]. Darüber hinaus gibt es verschiedene Ansätze mit noch kontroversen Ergebnissen wie die Gabe von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor, INF- $\gamma$  oder einer speziellen Immunnutrition, um die Immundysfunktion zu verhindern [6, 126].

Das hier vorliegende Modell kann, unserer Meinung nach, dabei helfen die postoperativen Immunreaktionen besser zu verstehen und weitere mögliche Ansätze zu finden, um das postoperative Ergebnis zu verbessern. Anhand der Kinetik vermuten wir, dass in der ersten postoperativen Phase immunsupprimierende Medikamente vorteilhaft sein könnten, wohingegen die spätere Phase immunstimulierende Substanzen verlangt.

Die vielen Parallelen zwischen unserem murinen Modell und der Immunreaktion nach operativen Ereignissen werden ein weiteres Nutzen dieses Modells legitimieren.

## 7 Zusammenfassung der Arbeit

Jedes Jahr werden alleine in Deutschland circa 2,6 Millionen viszeralchirurgische Operationen durchgeführt, die insgesamt gesehen eine Mortalität von fast 2 % aufweisen. Ein häufiges Problem bei der Durchführung dieser Eingriffe ist, dass die Patienten eine Dysfunktion des Immunsystems entwickeln, die die Anfälligkeit gegenüber infektiösen Komplikationen erhöht.

Die Faktoren der Immundysfunktion sind zwar in Teilen bekannt, aber die Pathophysiologie dahinter bleibt unbekannt. Das Verständnis der Pathophysiologie ist unerlässlich, um gute therapeutische Optionen zu finden. Überdies werden Tiermodelle benötigt, die die klinische Situation widerspiegeln.

Mit dem murinen Modell der *surgically-induced immune dysfunction* werden die Reaktionen des humanen Immunsystems in weiten Teilen nachempfunden, wobei ein wesentliches Ziel der Arbeit war, die Kinetik der Immunveränderungen über einen 72 h-Zeitraum zu untersuchen.

Die Operation löst deutlichen Stress bei den Tieren aus und führt von Beginn an sowohl zu pro – als auch antiinflammatorischen Prozessen, die vor allem abakteriell ausgelöst werden.

Dennoch überwiegt in der frühen postoperativen Phase die proinflammatorische Reaktion mit Anstieg der neutrophilen Granulozyten, Anstieg der Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems und der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Zwischen dem 6 h- und 24 h-Zeitpunkt gewinnt die antiinflammatorische Reaktion die Oberhand. Dieses zeigt sich durch eine Lymphozytopenie mit Zunahme des Anteils der regulatorischen T-Zellen, durch eine verminderte MHCII-Expression auf Antigen-präsentierenden Zellen, durch eine Zunahme der Aktivität des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase, durch die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen und durch eine verminderte Stimulierbarkeit von murinen Splenozyten.

Diese Immunreaktionen werden nicht nur durch die SID sondern auch durch eine einfache Laparotomie ausgelöst, wobei sie dann weniger deutlich ausgeprägt sind und schneller ablaufen.

Von dieser Kinetik ausgehend, kann an diesem Modell der Nutzen von potentiellen Therapien geprüft werden, wobei bis zum 6 h-Zeitpunkt antiinflammatorisch wirkende Substanzen vorteilhaft sein könnten, die im Weiteren von immunstimulierenden Medikamente abgelöst werden.

Insgesamt weist dieses Modell viele Parallelen mit der humanen postoperativen Immundysfunktion auf, sodass es der Grundlagenforschung viele Möglichkeiten eröffnet.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Kimura, F., et al., *Immunosuppression following surgical and traumatic injury*. Surg Today, 2010. **40**(9): p. 793-808.
2. Gentile, L.F., et al., *Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care*. J Trauma Acute Care Surg, 2012. **72**(6): p. 1491-501.
3. Wirthgen, E. and A. Hoeflich, *Endotoxin-Induced Tryptophan Degradation along the Kynurenine Pathway: The Role of Indolamine 2,3-Dioxygenase and Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Immunosuppressive Effects in Endotoxin Tolerance and Cancer and Its Implications for Immunoparalysis*. J Amino Acids, 2015. **2015**: p. 973548.
4. Bonn, S.B.Z., *DRG-Statistik PEPP-Statistik, Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern*. 2020.
5. Baum, P., et al., *Mortality and Complications Following Visceral Surgery: A Nationwide Analysis Based on the Diagnostic Categories Used in German Hospital Invoicing Data*. Dtsch Arztebl Int, 2019. **116**(44): p. 739-746.
6. Shankar Hari, M. and C. Summers, *Major surgery and the immune system: from pathophysiology to treatment*. Curr Opin Crit Care, 2018. **24**(6): p. 588-593.
7. Zindel, J. and P. Kubes, *DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation*. Annu Rev Pathol, 2020. **15**: p. 493-518.
8. Bone, R.C., et al., *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*. Chest, 1992. **101**(6): p. 1644-55.
9. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. Jama, 2016. **315**(8): p. 801-10.
10. Simpson, S.Q., *SIRS in the Time of Sepsis-3*. Chest, 2018. **153**(1): p. 34-38.
11. Bone, R.C., C.J. Grodzin, and R.A. Balk, *Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process*. Chest, 1997. **112**(1): p. 235-43.
12. Xiao, W., et al., *A genomic storm in critically injured humans*. J Exp Med, 2011. **208**(13): p. 2581-90.
13. Gibbison, B., G.D. Angelini, and S.L. Lightman, *Dynamic output and control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in critical illness and major surgery*. Br J Anaesth, 2013. **111**(3): p. 347-60.
14. Hsing, C.H. and J.J. Wang, *Clinical implication of perioperative inflammatory cytokine alteration*. Acta Anaesthesiol Taiwan, 2015. **53**(1): p. 23-8.
15. O'Dwyer, M.J., H.C. Owen, and H.D.T. Torrance, *The perioperative immune response*. Current Opinion in Critical Care, 2015. **21**(4): p. 336-342.
16. Delogu, G., et al., *Apoptosis and surgical trauma: dysregulated expression of death and survival factors on peripheral lymphocytes*. Arch Surg, 2000. **135**(10): p. 1141-7.
17. Hefele, F., et al., *Trauma Induces Interleukin-17A Expression on Th17 Cells and CD4+ Regulatory T Cells as Well as Platelet Dysfunction*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2389.
18. Kany, S., J.T. Vollrath, and B. Relja, *Cytokines in Inflammatory Disease*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(23).
19. Gouel-Cheron, A., et al., *Early interleukin-6 and slope of monocyte human leukocyte antigen-DR: a powerful association to predict the development of sepsis after major trauma*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33095.
20. Sint, A., et al., *Monocytic HLA-DR Expression for Prediction of Anastomotic Leak after Colorectal Surgery*. J Am Coll Surg, 2019. **229**(2): p. 200-209.
21. Lachmann, G., et al., *Innate immunity recovers earlier than acquired immunity during severe postoperative immunosuppression*. Int J Med Sci, 2018. **15**(1): p. 1-9.

22. Kawasaki, T., et al., *Trauma-Hemorrhage Induces Depressed Splenic Dendritic Cell Functions in Mice*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(7): p. 4514-4520.
23. Wu, H., J. Gong, and Y. Liu, *Indoleamine 2, 3-dioxygenase regulation of immune response (Review)*. Mol Med Rep, 2018. **17**(4): p. 4867-4873.
24. Dobson, G.P., *Trauma of major surgery: A global problem that is not going away*. Int J Surg, 2020. **81**: p. 47-54.
25. Galbraith, N., et al., *Past, Present, and Future of Augmentation of Monocyte Function in the Surgical Patient*. Surg Infect (Larchmt), 2016. **17**(5): p. 563-9.
26. Venet, F., T. Rimmelé, and G. Monneret, *Management of Sepsis-Induced Immunosuppression*. Crit Care Clin, 2018. **34**(1): p. 97-106.
27. Probst, P., et al., *Meta-analysis of immunonutrition in major abdominal surgery*. Br J Surg, 2017. **104**(12): p. 1594-1608.
28. Kalff, J.C., et al., *Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus*. Ann Surg, 1998. **228**(5): p. 652-63.
29. Zantl, N., et al., *Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis*. Infect Immun, 1998. **66**(5): p. 2300-9.
30. Riess, C., et al., *Activation of the Kynurenine Pathway in Human Malignancies Can Be Suppressed by the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Dinaciclib*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 55.
31. Fuertig, R., et al., *LC-MS/MS-based quantification of kynurenine metabolites, tryptophan, monoamines and neopterin in plasma, cerebrospinal fluid and brain*. Bioanalysis, 2016. **8**(18): p. 1903-17.
32. Maier, S., et al., *[Special aspects of abdominal sepsis]*. Chirurg, 2005. **76**(9): p. 829-36.
33. Koerner, P., et al., *Postoperative immune suppression in visceral surgery: characterisation of an intestinal mouse model*. Eur Surg Res, 2011. **47**(4): p. 260-6.
34. Cain, D.W. and J.A. Cidlowski, *Immune regulation by glucocorticoids*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(4): p. 233-247.
35. Bethin, K.E., S.K. Vogt, and L.J. Muglia, *Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 9317-22.
36. Páth, G., et al., *Interleukin-6 and the interleukin-6 receptor in the human adrenal gland: expression and effects on steroidogenesis*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(7): p. 2343-9.
37. Oster, H., et al., *The Functional and Clinical Significance of the 24-Hour Rhythm of Circulating Glucocorticoids*. Endocr Rev, 2017. **38**(1): p. 3-45.
38. Gong, S., et al., *Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0117503.
39. Pandolfi, F., et al., *Key Role of DAMP in Inflammation, Cancer, and Tissue Repair*. Clin Ther, 2016. **38**(5): p. 1017-28.
40. Yang, H., et al., *The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis*. Journal of Leukocyte Biology, 2013. **93**(6): p. 865-873.
41. Cohen, M.J., et al., *Early release of high mobility group box nuclear protein 1 after severe trauma in humans: role of injury severity and tissue hypoperfusion*. Crit Care, 2009. **13**(6): p. R174.
42. Horst, K., et al., *Impact of haemorrhagic shock intensity on the dynamic of alarmins release in porcine poly-trauma animal model*. Eur J Trauma Emerg Surg, 2016. **42**(1): p. 67-75.
43. Ueno, T., et al., *HMGB-1 as a useful prognostic biomarker in sepsis-induced organ failure in patients undergoing PMX-DHP*. J Surg Res, 2011. **171**(1): p. 183-90.

44. Wu, C., et al., *Evaluation of high mobility group box 1 protein as a presurgical diagnostic marker reflecting the severity of acute appendicitis*. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2012. **20**: p. 61.
45. Finnerty, C.C., et al., *The surgically induced stress response*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2013. **37**(5 Suppl): p. 21s-9s.
46. Zeun, J., *Charakterisierung der Immunsuppression nach chirurgischem Trauma im Mausmodell*, in *Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin – Abteilung für Immunologie*, 2017, Universität Greifswald.
47. Garami, A., A.A. Steiner, and A.A. Romanovsky, *Fever and hypothermia in systemic inflammation*. Handb Clin Neurol, 2018. **157**: p. 565-597.
48. Liu, E., et al., *Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and Escherichia coli-induced systemic inflammation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012. **302**(12): p. R1372-83.
49. Drewry, A.M., et al., *The presence of hypothermia within 24 hours of sepsis diagnosis predicts persistent lymphopenia*. Crit Care Med, 2015. **43**(6): p. 1165-9.
50. Rumbus, Z., et al., *Fever Is Associated with Reduced, Hypothermia with Increased Mortality in Septic Patients: A Meta-Analysis of Clinical Trials*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0170152.
51. Levy, M.M., L.E. Evans, and A. Rhodes, *The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update*. Intensive Care Med, 2018. **44**(6): p. 925-928.
52. Long, B. and A. Koyfman, *Best Clinical Practice: Blood Culture Utility in the Emergency Department*. J Emerg Med, 2016. **51**(5): p. 529-539.
53. Alqarni, A., et al., *Clinical characteristics and prognosis of bacteraemia during postoperative intra-abdominal infections*. Crit Care, 2018. **22**(1): p. 175.
54. Wichterman, K.A., A.E. Baue, and I.H. Chaudry, *Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal*. J Surg Res, 1980. **29**(2): p. 189-201.
55. Traeger, T., et al., *Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis*. J Vis Exp, 2010(46).
56. Maier, S., et al., *Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis*. Shock, 2004. **21**(6): p. 505-11.
57. Reddy, B.S., et al., *Surgical manipulation of the large intestine increases bacterial translocation in patients undergoing elective colorectal surgery*. Colorectal Dis, 2006. **8**(7): p. 596-600.
58. Stein, K., et al., *Intestinal manipulation affects mucosal antimicrobial defense in a mouse model of postoperative ileus*. PLoS One, 2018. **13**(4): p. e0195516.
59. MacFie, J., et al., *Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years*. Br J Surg, 2006. **93**(1): p. 87-93.
60. Nieves, E., et al., *Bacterial translocation in abdominal trauma and postoperative infections*. J Trauma, 2011. **71**(5): p. 1258-61.
61. MacFie, J., et al., *Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity*. Gut, 1999. **45**(2): p. 223-8.
62. Assimakopoulos, S.F., et al., *Gut-origin sepsis in the critically ill patient: pathophysiology and treatment*. Infection, 2018. **46**(6): p. 751-760.
63. Bruewer, M., et al., *Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6164-72.
64. Moore, F.A. and E.E. Moore, *Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure*. Surg Clin North Am, 1995. **75**(2): p. 257-77.
65. Jones, H.R., et al., *The role of neutrophils in inflammation resolution*. Semin Immunol, 2016. **28**(2): p. 137-45.
66. Papayannopoulos, V., *Neutrophil extracellular traps in immunity and disease*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(2): p. 134-147.

67. Kovtun, A., et al., *Neutrophils in Tissue Trauma of the Skin, Bone, and Lung: Two Sides of the Same Coin*. J Immunol Res, 2018. **2018**: p. 8173983.
68. Zhang, X. and D.M. Mosser, *Macrophage activation by endogenous danger signals*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 161-78.
69. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 762-74.
70. Hundt, L., Menz, J., Schmoeckel, K., Schulze, T., Domanska, G., Menges, P., *Increased mortality and altered local immune response in secondary peritonitis after previous visceral operations in mice*. Eingereicht bei Scientific Reports, 2021, noch unveröffentlicht.
71. Zhu, X.M., et al., *Effect of high mobility group box-1 protein on apoptosis of peritoneal macrophages*. Arch Biochem Biophys, 2009. **492**(1-2): p. 54-61.
72. Ghosn, E.E., et al., *Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(6): p. 2568-73.
73. Worbs, T., S.I. Hammerschmidt, and R. Förster, *Dendritic cell migration in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(1): p. 30-48.
74. Fan, X., et al., *Alterations of dendritic cells in sepsis: featured role in immunoparalysis*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 903720.
75. Ding, Y., et al., *Polymicrobial sepsis induces divergent effects on splenic and peritoneal dendritic cell function in mice*. Shock, 2004. **22**(2): p. 137-44.
76. Grimaldi, D., et al., *Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock*. Intensive Care Med, 2011. **37**(9): p. 1438-46.
77. Klöcker, C., *Charakterisierung und Etablierung eines Mausmodells zur Evaluation von Ursachen und Mechanismen der postoperativen Immundysfunktion*. 2018.
78. Miyaoka, K., et al., *Clinical evaluation of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels after surgery-induced inflammation*. J Surg Res, 2005. **125**(2): p. 144-50.
79. Rettig, T.C., et al., *Postoperative Interleukin-6 Level and Early Detection of Complications After Elective Major Abdominal Surgery*. Ann Surg, 2016. **263**(6): p. 1207-12.
80. Haasper, C., et al., *Prognostic value of procalcitonin (PCT) and/or interleukin-6 (IL-6) plasma levels after multiple trauma for the development of multi organ dysfunction syndrome (MODS) or sepsis*. Technol Health Care, 2010. **18**(2): p. 89-100.
81. Geginat, J., et al., *The light and the dark sides of Interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2016. **30**: p. 87-93.
82. Welborn, M.B., 3rd, et al., *Role of endogenous interleukin-10 in local and distant organ injury after visceral ischemia-reperfusion*. Shock, 2003. **20**(1): p. 35-40.
83. Schneider, C.P., M.G. Schwacha, and I.H. Chaudry, *The role of interleukin-10 in the regulation of the systemic inflammatory response following trauma-hemorrhage*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1689**(1): p. 22-32.
84. Stensballe, J., et al., *The early IL-6 and IL-10 response in trauma is correlated with injury severity and mortality*. Acta Anaesthesiol Scand, 2009. **53**(4): p. 515-21.
85. Sapan, H.B., et al., *Interleukin-6 and interleukin-10 plasma levels and mRNA expression in polytrauma patients*. Chin J Traumatol, 2017. **20**(6): p. 318-322.
86. Dimopoulou, I., et al., *Tumour necrosis factor-alpha (TNFalpha) and interleukin-10 are crucial mediators in post-operative systemic inflammatory response and determine the occurrence of complications after major abdominal surgery*. Cytokine, 2007. **37**(1): p. 55-61.
87. van Griensven, M., *[Cytokines as biomarkers in polytraumatized patients]*. Unfallchirurg, 2014. **117**(8): p. 699-702.
88. Arens, C., et al., *Sepsis-induced long-term immune paralysis - results of a descriptive, explorative study*. Crit Care, 2016. **20**(1): p. 93.

89. Heagy, W., et al., *Lower levels of whole blood LPS-stimulated cytokine release are associated with poorer clinical outcomes in surgical ICU patients*. Surg Infect (Larchmt), 2003. **4**(2): p. 171-80.
90. Winkler, M.S., et al., *Human leucocyte antigen (HLA-DR) gene expression is reduced in sepsis and correlates with impaired TNF $\alpha$  response: A diagnostic tool for immunosuppression?* PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0182427.
91. Menges, P., et al., *[Characterisation of Postoperative Immune Suppression by Validated Parameters in Visceral Surgery]*. Zentralbl Chir, 2013. **141**(1): p. 68-74.
92. Wakefield, C.H., et al., *Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery*. Br J Surg, 1993. **80**(2): p. 205-9.
93. Fumeaux, T. and J. Pugin, *Is the measurement of monocytes HLA-DR expression useful in patients with sepsis?* Intensive Care Med, 2006. **32**(8): p. 1106-8.
94. O'Brien, K.L. and D.K. Finlay, *Immunometabolism and natural killer cell responses*. Nat Rev Immunol, 2019. **19**(5): p. 282-290.
95. Angka, L., et al., *Natural Killer Cell IFN $\gamma$  Secretion is Profoundly Suppressed Following Colorectal Cancer Surgery*. Ann Surg Oncol, 2018. **25**(12): p. 3747-3754.
96. Menges, P., et al., *Surgical trauma leads to a shorter survival in a murine orthotopic pancreatic cancer model*. Eur Surg Res, 2015. **54**(1-2): p. 87-94.
97. Kessler, W., et al., *Implantation of alloplastic material increases survival of mice subsequently exposed to polymicrobial sepsis*. Langenbecks Arch Surg, 2010. **395**(2): p. 157-62.
98. Katikaneni, D.S. and L. Jin, *B cell MHC class II signaling: A story of life and death*. Hum Immunol, 2019. **80**(1): p. 37-43.
99. Bartal, I., et al., *Immune perturbations in patients along the perioperative period: alterations in cell surface markers and leukocyte subtypes before and after surgery*. Brain Behav Immun, 2010. **24**(3): p. 376-86.
100. Ditschkowski, M., et al., *Reduced B cell HLA-DR expression and natural killer cell counts in patients prone to sepsis after injury*. Eur J Surg, 1999. **165**(12): p. 1129-33.
101. Rajakariar, R., et al., *Novel biphasic role for lymphocytes revealed during resolving inflammation*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4184-92.
102. Brummelman, J., K. Pilipow, and E. Lugli, *The Single-Cell Phenotypic Identity of Human CD8(+) and CD4(+) T Cells*. Int Rev Cell Mol Biol, 2018. **341**: p. 63-124.
103. Georgiev, P., L.M. Charbonnier, and T.A. Chatila, *Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3*. J Clin Immunol, 2019. **39**(7): p. 623-640.
104. MacConmara, M.P., et al., *Increased CD4+ CD25+ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity*. Ann Surg, 2006. **244**(4): p. 514-23.
105. Zhou, L., et al., *Propranolol Attenuates Surgical Stress-Induced Elevation of the Regulatory T Cell Response in Patients Undergoing Radical Mastectomy*. Journal of Immunology, 2016. **196**(8): p. 3460-3469.
106. Hanschen, M., et al., *Injury induces early activation of T-cell receptor signaling pathways in CD4+ regulatory T cells*. Shock, 2011. **35**(3): p. 252-7.
107. Chen, X., et al., *Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 859-869.
108. Chen, X., et al., *Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 154-61.
109. Cibrián, D. and F. Sánchez-Madrid, *CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper*. Eur J Immunol, 2017. **47**(6): p. 946-953.
110. Wieland, E. and M. Shipkova, *Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers*. Clin Biochem, 2016. **49**(4-5): p. 347-54.



111. Jiang, J., L.L. Lau, and H. Shen, *Selective Depletion of Nonspecific T Cells During the Early Stage of Immune Responses to Infection*. The Journal of Immunology, 2003. **171**(8): p. 4352-4358.
112. Schmoeckel, K., et al., *Full activation of CD4+ T cells early during sepsis requires specific antigen*. Shock, 2015. **43**(2): p. 192-200.
113. Chikuma, S., *CTLA-4, an Essential Immune-Checkpoint for T-Cell Activation*, in *Emerging Concepts Targeting Immune Checkpoints in Cancer and Autoimmunity*, A. Yoshimura, Editor. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 99-126.
114. Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway Immunologie*. Vol. 9. 2018: Springer Spektrum.
115. Rowshanravan, B., N. Halliday, and D.M. Sansom, *CTLA-4: a moving target in immunotherapy*. Blood, 2018. **131**(1): p. 58-67.
116. Saribal, D., et al., *Inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  in patients with hip fracture*. Osteoporosis International, 2019. **30**(5): p. 1025-1031.
117. Pellegrin, K., et al., *Enhanced enzymatic degradation of tryptophan by indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the tryptophan-deficient state seen after major trauma*. Shock, 2005. **23**(3): p. 209-15.
118. Zeden, J.P., et al., *Excessive tryptophan catabolism along the kynurenine pathway precedes ongoing sepsis in critically ill patients*. Anaesth Intensive Care, 2010. **38**(2): p. 307-16.
119. Ploder, M., et al., *Tryptophan degradation in multiple trauma patients: survivors compared with non-survivors*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(7): p. 593-8.
120. Wirthgen, E., et al., *Activation of indoleamine 2,3-dioxygenase by LPS in a porcine model*. Innate Immun, 2014. **20**(1): p. 30-9.
121. Badawy, A.A., *Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects*. Int J Tryptophan Res, 2017. **10**: p. 1178646917691938.
122. Bassetti, M., et al., *Post-operative abdominal infections: epidemiology, operational definitions, and outcomes*. Intensive Care Med, 2020. **46**(2): p. 163-172.
123. Shibata, J., et al., *Surgical stress response after colorectal resection: a comparison of robotic, laparoscopic, and open surgery*. Tech Coloproctol, 2015. **19**(5): p. 275-80.
124. Boddu, C., J. Cushner, and G.R. Scuderi, *Inadvertent Perioperative Hypothermia During Orthopedic Surgery*. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2018. **47**(7).
125. Torrance, H.D., R.M. Pearse, and M.J. O'Dwyer, *Does major surgery induce immune suppression and increase the risk of postoperative infection?* Curr Opin Anaesthesiol, 2016. **29**(3): p. 376-83.
126. Lord, J.M., et al., *The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment*. Lancet, 2014. **384**(9952): p. 1455-65.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Immunreaktion durch ein chirurgisches Trauma .....	3
Abbildung 2 Ausstreichen des Darms während der <i>surgically-induced immune dysfunction</i> .....	13
Abbildung 3 Übersicht über den Tryptophanmetabolismus .....	25
Abbildung 4 Belastung nach Laparotomie und SID.....	27
Abbildung 5 Corticosteron-Konzentration nach operativen Eingriffen .....	28
Abbildung 6 Bakterielle Last von Blut und Peritoneallavage .....	29
Abbildung 7 Bakterielle Last von Milz und Niere .....	30
Abbildung 8 Bakterielle Last von Leber und Lunge.....	31
Abbildung 9 Leukozyten im Vollblut .....	32

Abbildung 10 Neutrophile Granulozyten im Vollblut .....	33
Abbildung 11 Neutrophile Granulozyten in der Milz .....	34
Abbildung 12 Neutrophile Granulozyten in der Peritoneallavage .....	35
Abbildung 13 Monozyten im Vollblut .....	36
Abbildung 14 Makrophagen in der Milz.....	37
Abbildung 15 MHCII-Expression auf Makrophagen der Milz.....	37
Abbildung 16 Makrophagen in der Peritoneallavage .....	38
Abbildung 17 Natürliche Killerzellen in der Milz.....	39
Abbildung 18 Dendritische Zellen in der Milz .....	40
Abbildung 19 MHCII-Expression der dendritische Zellen der Milz .....	40
Abbildung 20 Dendritische Zellen in der Peritoneallavage.....	41
Abbildung 21 Lymphozyten im Vollblut .....	42
Abbildung 22 B-Zellen in der Milz .....	43
Abbildung 23 B-Zellen in der Peritoneallavage .....	44
Abbildung 24 CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in der Milz.....	45
Abbildung 25 Verteilung der T-Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen der Milz.....	46
Abbildung 26 Aktivierungsstatus der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen anhand von CD69 und CD25 .....	47
Abbildung 27 Aktivierungsstatus der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen anhand von CTLA-4 .....	48
Abbildung 28 IL-6-Konzentration im Serum.....	49
Abbildung 29 TNF- $\alpha$ -Konzentration im Serum.....	50
Abbildung 30 IL-10-Konzentration im Serum.....	51
Abbildung 31 IL-1 $\beta$ -Konzentration im Splenozytenüberstand.....	52
Abbildung 32 IL-6-Konzentration im Splenozytenüberstand.....	53
Abbildung 33 TNF- $\alpha$ -Konzentration im Splenozytenüberstand .....	54
Abbildung 34 IFN- $\gamma$ -Konzentration im Splenozytenüberstand .....	55
Abbildung 35 IL-10-Konzentration im Splenozytenüberstand.....	56
Abbildung 36 Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase .....	57
Abbildung 37 Tryptophan-Konzentration im EDTA-Plasma.....	58
Abbildung 38 Kynureninsäure-Konzentration im EDTA-Plasma .....	59
Abbildung 39 Xanthurensäure-Konzentration im EDTA-Plasma.....	60
Abbildung 40 Picolinsäure-Konzentration im EDTA-Plasma .....	61
Abbildung 41 Schematische Darstellung der systemischen Immunreaktion durch die surgically- induced immune dysfunction .....	81
Abbildung 42 Gatingstrategie des Aktivierungsstatus der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen der Milz.....	XIV

Abbildung 43 Gatingstrategie der Analyse verschiedener Zellpopulationen in Milz und Peritoneallavage .....	XV
Abbildung 44 Gatingstrategie zur Analyse der NK-Zellen .....	XVI

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 SIRS-Kriterien nach Bone <i>et al.</i> [8] .....	2
Tabelle 2 Belastungsscore zur Beurteilung der Tiere nach operativen Eingriffen .....	14
Tabelle 3 Übersicht über die Färbung zur Bestimmung des Aktivierungsstatus von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	19
Tabelle 4 Antikörper der extrazellulären Färbung der CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung.....	19
Tabelle 5 Antikörper der intrazellulären Färbung der CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung .....	20
Tabelle 6 Sekundär- / Tertiärreagenz der Färbung 3 / 4 .....	20
Tabelle 7 Übersicht über die Färbungen zur Bestimmung verschiedener Zellpopulationen.....	21
Tabelle 8 Primärantikörper der extrazellulären Färbung verschiedener Zellpopulationen.....	21
Tabelle 9 Sekundärreagenz zur Analyse verschiedener Zellpopulationen und zur Analyse von NK – Zellen .....	21
Tabelle 10 Übersicht über die Färbung zur Analyse der NK-Zellen .....	22
Tabelle 11 Primärantikörper der Analyse von NK-Zellen .....	23
Tabelle 12 Übersicht über Mediane und erstes und drittes Quartil der vorliegenden Daten .....	XVI

## 11 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A. Bidest	<i>Aqua bidestillata</i>
Arm. Hamster	Armenischer Hamster
ATP	Adenosintriphosphat
ca.	Circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CARS	<i>Compensatory anti-inflammatory response syndrome</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular patterns</i>

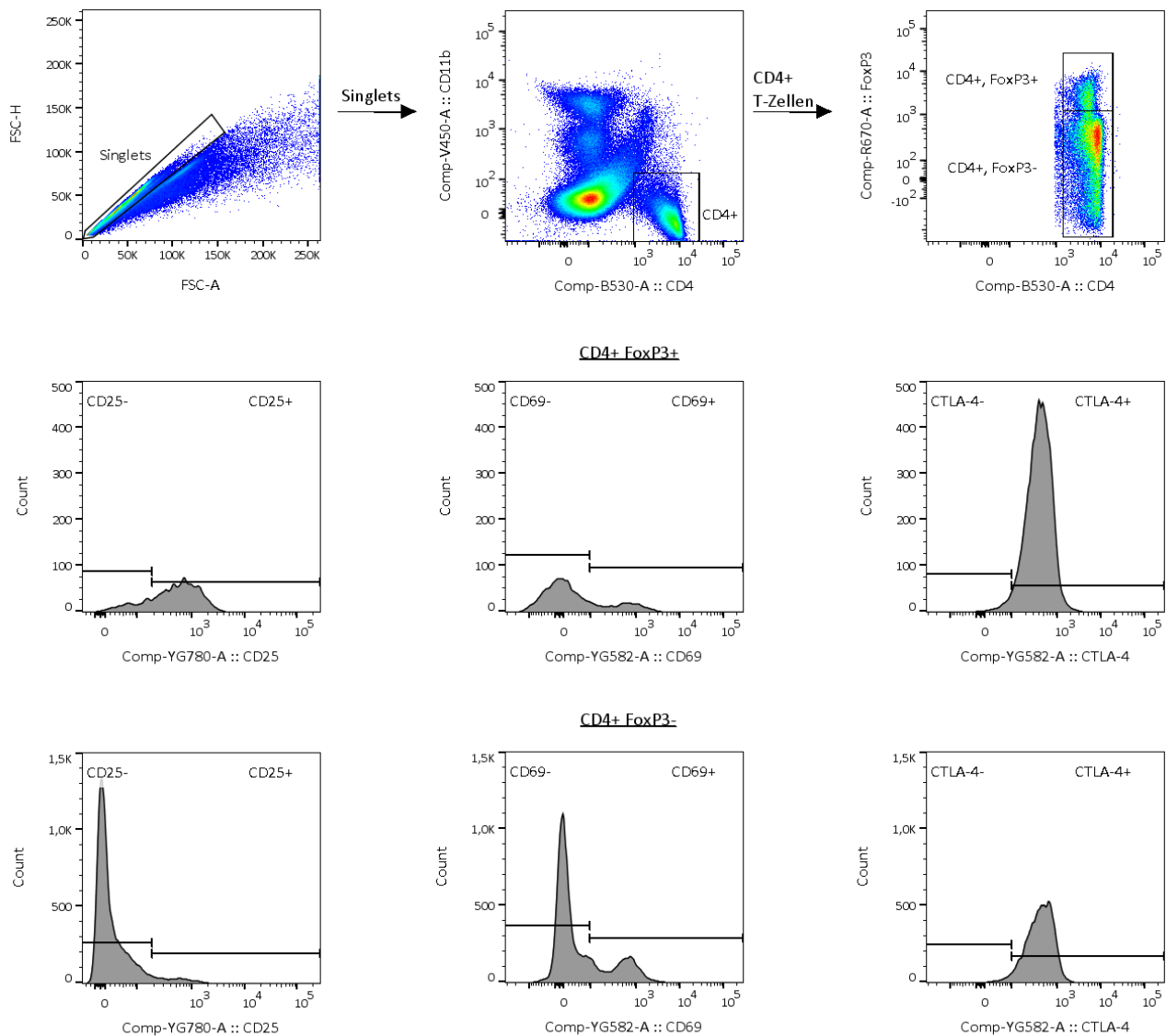
## Abkürzungsverzeichnis

---

DC	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> (und andere)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FoxP3	<i>Forkhea-Box Protein 3</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
g	Gramm
<i>g</i>	<i>Gravity</i> , Erdbeschleunigung
G	Gauge
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
gMFI	Geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität
h	Stunde(n)
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen-DR isotype</i>
HMGB1	<i>High-mobility-group-box-1 protein</i>
IDO	Indolamin-2,3-desoxygenase
IgG	Immunglobulin G
INF	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
mM	Millimolar
MHCII	<i>Major histocompatibility complex class II</i>
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
NaCl	Natrium-Chlorid
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid
NK	Natürliche Killerzellen

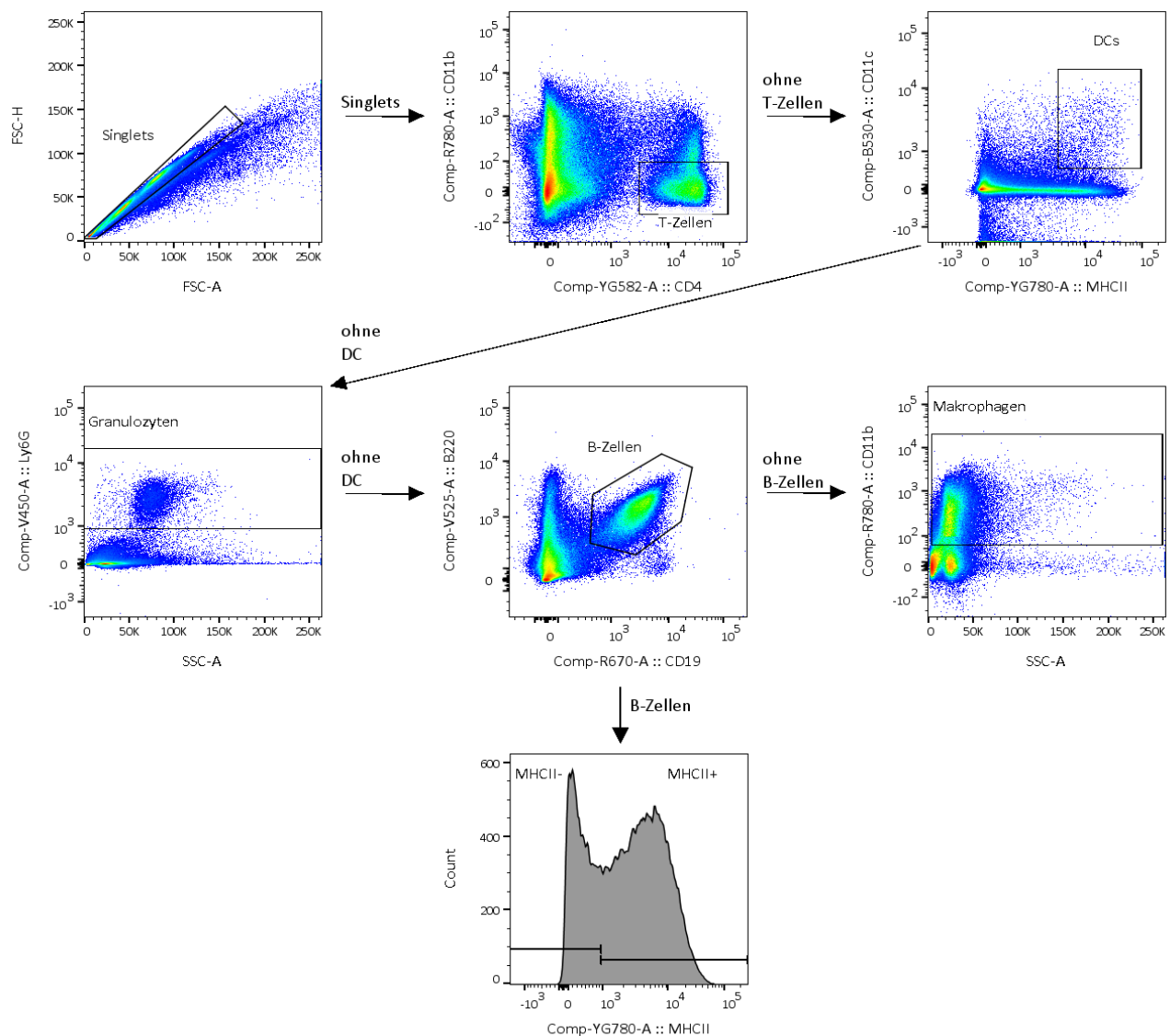
nM	Nanomolar
PAMP	<i>Pathogene-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PICS	<i>Persistent inflammation/immunosuppression catabolism syndrome</i>
RT	Raumtemperatur
RBC	<i>Red blood cells</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
SID	<i>Surgically-induced immune dysfunction</i>
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
TPO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
T <sub>eff</sub>	T-Effektorzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zellen

## Anhang



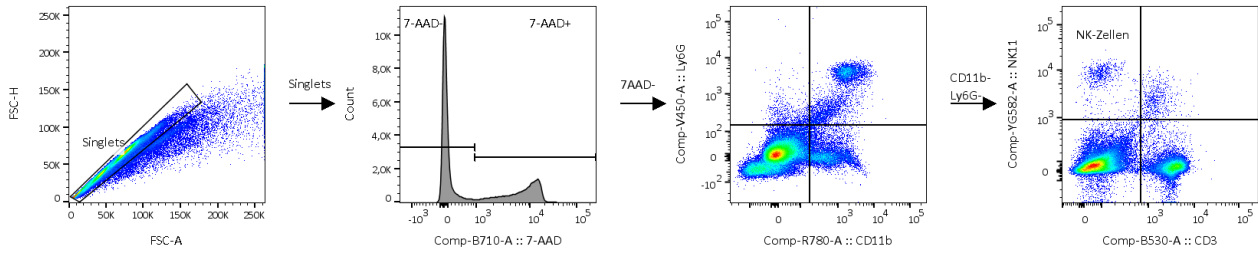
**Abbildung 42** Gatingstrategie des Aktivierungsstatus der CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Milz

Die Analyse des Aktivierungsstatus der CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch mit Hilfe von Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD4, CD11b, CD25, CD69, CTLA-4 und FoxP3. Eine Einzelzellsuspension der Splenozyten wurde in CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen und CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Effektorzellen unterteilt. Der Aktivitätsstatus dieser Zellen wurde anhand der Aktivitätsmarker CD25, CD69 und CTLA-4 untersucht.



**Abbildung 43 Gatingstrategie der Analyse verschiedener Zellpopulationen in Milz und Peritoneallavage**

Die Analyse unterschiedlicher Zellpopulationen in der Milz und Peritoneallavage erfolgte durchflusszytometrisch mit Hilfe von Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen B220, CD4, CD11b, CD11c, CD19, Ly6G und MHCII. T-Zellen sind  $CD4^+$  und  $CD11b^-$ , Dendritische Zellen sind  $MHCII^{high}$  und  $CD11c^{high}$ , Granulozyten sind  $Ly6G^+$ , B-Zellen sind  $CD19^+$  und  $B220^+$  und Makrophagen sind  $CD11b^+$ . Die B-Zellen wurden zusätzlich auf das Tragen von MHCII untersucht.



**Abbildung 44 Gatingsstrategie zur Analyse der NK-Zellen**

Die Analyse der NK-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch durch Fluorochrom-markierte Antikörper gegen 7-AAD, CD3, CD11b, Ly6G und NK1.1. In einer Einzelzellsuspension der Splenozyten wurden zunächst mit 7-AAD die vitalen Zellen bestimmt. Die NK-Zellen sind NK1.1<sup>+</sup> und negativ für CD3, CD11b und Ly6G.

**Tabelle 12 Übersicht über Mediane und erstes und drittes Quartil der vorliegenden Daten**

Abbildung	Zeit (h)	Median (1. / 3. Quartil)		
		Kontrolle	Laparotomie	SID
<b>4 – Belastung nach SID und Laparotomie</b>				
4A - relatives Körpergewicht (%)	0	100,0 (100,0 / 100,0)	100,0 (100,0 / 100,0)	100,0 (100,0 / 100,0)
	6	95,8 ( 94,5 / 98,2 )	97,0 (95,5 / 97,4)	97,6 (96,0 / 98,6)
	12	96,6 (94,7 / 97,4)	93,8 (91,9 / 95,6)	94,6 (93,4 / 95,5)
	24	99,0 (95,7 / 101,2)	94,6 (91,2 / 96,8)	90,2 (89,3 / 91,3)
	30	96,4 (94,9 / 101,4)	94,3 (92,0 / 96,6)	89,0 (88,6 / 90,9)
	36	96,4 (93,8 / 100,7)	93,1 (91,2 / 97,2)	88,2 (87,2 / 89,0)
	48	98,2 (97,0 / 101,7)	93,6 (91,3 / 97,3)	87,3 (86,2 / 88,2)
	54	96,5 (95,4 / 101,5)	94,3 (91,8 / 96,9)	86,9 (85,3 / 88,5)
	60	96,0 (92,8 / 102,7)	94,5 (92,2 / 97,3)	86,2 (85,1 / 87,9)
	72	100,0 (97,2 / 104,5)	96,4 (94,3 / 98,9)	85,3 (84,7 / 87,5)
4B – Körpertemperatur (°C)	0	37,9 (37,5 / 38,3)	37,8 (37,6 / 38,0)	37,9 (37,7 / 38,1)
	6	36,9 (36,4 / 37,7)	36,5 (35,9 / 36,8)	34,5 (33,0 / 35,4)
	12	37,5 (37,4 / 38,1)	37,5 (37,3 / 38,0)	37,2 (36,6 / 37,5)
	24	36,6 (35,9 / 37,5)	37,8 (37,0 / 38,1)	37,4 (37,1 / 37,6)
	30	36,1 (35,8 / 36,6)	37,1 (36,8 / 37,7)	36,9 (36,6 / 37,4)
	36	37,9 (37,4 / 38,3)	37,5 (37,1 / 37,7)	37,0 (36,4 / 37,2)
	48	36,9 (36,4 / 37,5)	37,4 (37,0 / 37,9)	36,9 (36,3 / 37,4)
	54	36,7 (36,0 / 37,1)	37,2 (37,0 / 37,4)	36,5 (35,4 / 37,1)
	60	37,0 (36,5 / 37,1)	37,8 (37,5 / 37,9)	36,6 (35,7 / 36,9)
	72	37,4 (37,3 / 37,8)	37,6 (37,3 / 37,9)	35,7 (34,7 / 36,4)



Abbildung	Zeit (h)	Median (1. / 3. Quartil)		
		Kontrolle	Laparotomie	SID
4C - Summenbelastungsscore	0	0,0 (0,0 / 0,0)	0,0 (0,0 / 0,0)	0,0 (0,0 / 0,0)
	6	0,0 (0,0 / 0,0)	3,5 (2,0 / 4,0)	5,0 (3,0 / 5,8)
	12	0,0 (0,0 / 0,0)	1,5 (0,8 / 3,0)	3,0 (2,0 / 4,8)
	24	0,0 (0,0 / 0,0)	1,0 (0,0 / 1,0)	4,0 (3,0 / 5,0)
	30	0,0 (0,0 / 0,0)	1,0 (0,0 / 1,0)	4,0 (3,3 / 5,0)
	36	0,0 (0,0 / 0,0)	1,0 (0,0 / 1,0)	4,0 (3,0 / 4,0)
	48	0,0 (0,0 / 0,0)	1,0 (0,0 / 1,0)	4,0 (2,0 / 4,8)
	54	0,0 (0,0 / 0,0)	0,5 (0,0 / 1,0)	3,5 (1,3 / 5,0)
	60	0,0 (0,0 / 0,0)	1,0 (0,0 / 1,0)	3,0 (1,0 / 5,0)
<b>5 – Corticosteron-Konzentration nach operativen Eingriffen (ng/ml)</b>				
5A	3	157,02 (130,99 / 180,81)	283,54 (234,07 / 311,30)	309,91 (252,32 / 326,80)
5B	6	157,02 (130,99 / 180,81)	143,85 (88,87 / 197,02)	232,71 (190,82 / 291,50)
5C	24	157,02 (130,99 / 180,81)	108,76 (60,62 / 157,77)	153,44 (112,07 / 259,33)
<b>6 – Bakterielle Last von Blut und Peritoneallavage</b>				
6A – Blut (KBE / ml)	24	0 (0 / 108)	0 (0 / 8)	0 (0 / 42)
6B – Blut (KBE / ml)	72	0 (0 / 108)	0 (0 / 179)	0 (0 / 721)
6C – Peritoneallavage (KBE / ml)	24	0 (0 / 83)	0 (0 / 0)	50,0 (0 / 20958)
6D – Peritoneallavage (KBE / ml)	72	0 (0 / 83)	0 (0 / 458)	83,34 (0 / 36167)
<b>7 – Bakterielle Last von Milz und Niere</b>				
7A – Milz (KBE / g)	24	0 (0 / 0)	0 (0 / 0)	0 (0 / 3324)
7B – Milz (KBE / g)	72	0 (0 / 0)	0 (0 / 0)	0 (0 / 2628)
7C – Niere (KBE / g)	24	0 (0 / 0)	0 (0 / 70)	0 (0 / 1698)
7D – Niere (KBE / g)	72	0 (0 / 0)	0 (0 / 0)	0 (0 / 14327)
<b>8 – Bakterielle Last von Leber und Lunge</b>				
8A – Leber (KBE / g)	24	0 (0 / 0)	0 (0 / 34)	79,6 (0 / 70575)
8B – Leber (KBE / g)	72	0 (0 / 0)	0 (0 / 0)	296,3 (0 / 12522)
8C – Lunge (KBE / g)	24	3679, (0 / 30909)	97 (0 / 2335)	42051 (1698 / 312707)

Abbildung	Zeit (h)	Median (1. / 3. Quartil)		
		Kontrolle	Laparotomie	SID
8D – Lunge (KBE / g)	72	3679 (0 / 30909)	105 (0 / 19223)	10683 (1600 / 379127)
<b>9– Leukozyten im Vollblut (x 10<sup>9</sup> / ml)</b>				
9A	24	4,9 (3,8 / 6,9)	5,5 (3,9 / 6,2)	2,9 (2,3 / 3,5)
9B	72	4,9 (3,8 / 6,9)	8,0 (5,0 / 9,5)	3,1 (1,9 / 4,4)
<b>10 – Neutrophile Granulozyten im Vollblut (x 10<sup>9</sup> / ml)</b>				
10A	3	0,8 (0,3 / 1,0)	0,7 (0,5 / 1,1)	1,4 (0,9 / 1,9)
10B	6	0,8 (0,3 / 1,0)	1,1 (0,7 / 1,6)	1,7 (1,2 / 2,1)
<b>11- Neutrophile Granulozyten in der Milz (x 10<sup>6</sup>)</b>				
	3	0,75 (0,47 / 1,19)	1,63 (1,21 / 2,16)	1,78 (1,35 / 2,41)
	6	0,75 (0,47 / 1,19)	1,24 (0,78 / 1,44)	1,43 (1,12 / 1,68)
	24	0,75 (0,47 / 1,19)	0,59 (0,38 / 0,72)	0,43 (0,23 / 0,65)
	72	0,75 (0,47 / 1,19)	1,54 (1,08 / 2,21)	0,95 (0,53 / 2,14)
<b>12 – Neutrophile Granulozyten in der Peritoneallavage (x 10<sup>6</sup>)</b>				
	3	0,08 (0,03 / 0,15)	1,84 (1,24 / 3,70)	1,49 (0,42 / 7,21)
	6	0,08 (0,03 / 0,15)	1,07 (0,35 / 3,01)	1,68 (0,72 / 4,88)
	24	0,08 (0,03 / 0,15)	1,08 (0,39 / 3,38)	2,33 (1,03 / 1,21)
	72	0,08 (0,03 / 0,15)	2,03 (0,85 / 3,52)	2,04 (0,40 / 4,82)
<b>13 – Monozyten im Vollblut (x 10<sup>9</sup> / ml)</b>				
13A	3	0,15 (0,06 / 0,35)	0,27 (0,15 / 0,47)	0,30 (0,27 / 0,46)
13B	6	0,15 (0,06 / 0,35)	0,27 (0,15 / 0,41)	0,27 (0,21 / 0,54)
<b>14 – Makrophagen in der Milz (x 10<sup>6</sup>)</b>				
	3	6,95 (5,50 / 10,70)	12,35 (8,02 / 14,68)	11,40 (8,11 / 15,00)
	6	6,95 (5,50 / 10,70)	5,87 (4,90 / 6,88)	6,52 (4,26 / 7,44)
	24	6,95 (5,50 / 10,70)	4,92 (3,65 / 6,28)	2,93 (2,19 / 4,98)
	72	6,95 (5,50 / 10,70)	9,60 (7,48 / 13,95)	5,20 (3,29 / 8,87)
<b>15 – MHCII-Expression auf Makrophagen der Milz (gMFI)</b>				
	24	0,95 (0,73 / 1,15)	0,49 (0,35 / 0,75)	0,56 (0,39 / 0,70)
<b>16 – Makrophagen in der Peritoneallavage (x 10<sup>6</sup>)</b>				
	3	7,14 (3,94 / 11,60)	1,36 (0,97 / 5,92)	0,46 (0,23 / 0,75)
	6	7,14 (3,94 / 11,60)	0,62 (0,26 / 1,10)	0,63 (0,25 / 1,68)
	24	7,14 (3,94 / 11,60)	2,14 (1,28 / 6,31)	2,18 (0,64 / 5,09)
	72	7,14 (3,94 / 11,60)	11,60 (7,57 / 19,10)	3,49 (0,77 / 6,68)

Abbildung	Zeit (h)	Median (1. / 3. Quartil)		
		Kontrolle	Laparotomie	SID
<b>17 – Natürliche Killerzellen in der Milz (<math>\times 10^5</math>)</b>				
17A	24	2,32 (1,45 / 3,60)	2,01 (1,49 / 2,82)	1,06 (0,64 / 1,40)
17B	72	2,32 (1,45 / 3,60)	3,84 (2,67 / 6,18)	2,83 (1,62 / 4,63)
<b>18 – Dendritische Zellen der Milz (<math>\times 10^5</math>)</b>				
	3	4,22 (1,92 / 4,98)	2,72 (0,69 / 3,85)	2,29 (0,77 / 3,25)
	6	4,22 (1,92 / 4,98)	2,75 (1,90 / 3,50)	2,80 (1,84 / 3,65)
	24	4,22 (1,92 / 4,98)	1,47 (0,79 / 2,58)	0,85 (0,60 / 1,67)
	72	4,22 (1,92 / 4,98)	10,92 (7,90 / 15,79)	4,75 (2,75 / 7,39)
<b>19 – MHCII-Expression der dendritischen Zellen der Milz (gMFI)</b>				
19A	24	0,92 (0,86 / 1,14)	0,84 (0,71 / 0,93)	0,86 (0,79 / 0,93)
19B	72	0,92 (0,86 / 1,14)	0,97 (0,86 / 1,05)	0,75 (0,66 / 0,80)
<b>20 – Dendritische Zellen der Peritoneallavage (<math>\times 10^5</math>)</b>				
20A	3	1,64 (0,85 / 2,53)	0,80 (0,44 / 1,34)	0,45 (0,27 / 0,82)
20B	6	1,64 (0,85 / 2,53)	0,43 (0,24 / 0,93)	0,56 (0,39 / 1,02)
20C	72	1,64 (0,85 / 2,53)	7,34 (4,32 / 15,28)	5,31 (2,13 / 13,38)
<b>21 – Lymphozyten im Vollblut (<math>\times 10^9</math> / ml)</b>				
	3	4,06 (2,92 / 5,47)	3,72 (3,22 / 4,20)	3,04 (2,29 / 4,13)
	6	4,06 (2,92 / 5,47)	2,35 (1,75 / 3,34)	2,77 (2,04 / 3,29)
	24	4,06 (2,92 / 5,47)	4,56 (3,10 / 5,21)	2,08 (1,70 / 2,49)
	72	4,06 (2,92 / 5,47)	6,80 (4,10 / 7,98)	1,67 (1,17 / 3,29)
<b>22 – B-Zellen in der Milz</b>				
22A B-Zellen ( $\times 10^6$ )	24	6,28 (3,37 / 9,80)	4,97 (1,86 / 8,05)	2,46 (1,58 / 3,66)
22B MHCII (gMFI)	24	0,83 (0,48 / 1,32)	0,21 (0,16 / 0,31)	0,22 (0,18 / 0,30)
22C B-Zellen ( $\times 10^6$ )	72	6,28 (3,37 / 9,80)	16,50 (7,86 / 20,71)	7,10 (0,85 / 10,69)
22D MHCII (gMFI)	72	0,83 (0,48 / 1,32)	1,05 (0,85 / 1,31)	0,47 (0,31 / 0,58)
<b>23 – B-Zellen der Peritoneallavage (<math>\times 10^6</math>)</b>				
	3	1,89 (0,90 / 4,04)	0,75 (0,47 / 1,21)	0,21 (0,09 / 0,58)
	6	1,89 (0,90 / 4,04)	0,24 (0,12 / 0,39)	0,12 (0,09 / 0,34)
	24	1,89 (0,90 / 4,04)	0,51 (0,28 / 0,96)	0,28 (0,04 / 0,85)
	72	1,89 (0,90 / 4,04)	8,19 (4,23 / 11,95)	2,06 (0,38 / 2,92)
<b>24 – CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Milz (<math>\times 10^6</math>)</b>				
24A	6	7,36 (4,47 / 9,62)	5,00 (3,59 / 5,68)	4,65 (3,11 / 6,33)
24B	24	7,36 (4,47 / 9,62)	5,23 (3,44 / 7,16)	2,77 (2,03 / 4,42)

Abbildung	Zeit (h)	Median (1. / 3. Quartil)		
		Kontrolle	Laparotomie	SID
24C	72	7,36 (4,47 / 9,62)	11,01 (8,44 / 14,77)	5,67 (3,69 / 11,50)
<b>25 – Verteilung der T-Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen der Milz (%)</b>				
25A	24	90,50 (88,30 / 93,70)	95,00 (92,65 / 96,45)	93,60 (91,13 / 96,13)
25B	24	6,36 (4,64 / 8,35)	4,95 (3,48 / 7,20)	6,37 (3,79 / 8,80)
25C	72	90,50 (88,30 / 93,70)	87,65 (84,35 / 89,55)	83,05 (80,65 / 83,90)
25D	72	6,36 (4,64 / 8,35)	10,28 (8,55 / 13,49)	14,60 (13,65 / 15,36)
<b>26 – Aktivierungsstatus der CD4<sup>+</sup> T-Zellen anhand von CD69 und CD25 (gMFI)</b>				
26A	24	1,01 (0,79 / 1,16)	0,96 (0,88 / 1,64)	1,18 (1,06 / 1,45)
26B	72	0,99 (0,89 / 1,07)	0,97 (0,88 / 1,10)	1,17 (1,02 / 1,31)
<b>27 – Aktivierungsstatus der CD4<sup>+</sup> T-Zellen anhand von CTLA-4 (gMFI)</b>				
27A	24	0,96 (0,71 / 1,33)	1,23 (1,04 / 1,88)	1,34 (1,22 / 2,00)
27B	24	0,91 (0,73 / 1,25)	1,15 (0,91 / 1,79)	1,39 (1,13 / 2,26)
27C	72	0,96 (0,71 / 1,33)	1,05 (0,79 / 1,35)	1,29 (0,95 / 1,66)
27D	72	0,91 (0,73 / 1,25)	1,02 (0,92 / 1,40)	1,32 (1,03 / 1,67)
<b>28 – IL-6-Konzentration im Serum (pg / ml)</b>				
	3	1,33 (0,52 / 2,45)	31,04 (23,82 / 79,23)	234,7 (117,50 / 602,10)
	6	1,33 (0,52 / 2,45)	31,29 (21,97 / 41,01)	182,0 (84,44 / 1683,00)
	24	1,33 (0,52 / 2,45)	9,62 (5,86 / 15,39)	23,20 (13,07 / 41,69)
	72	1,33 (0,52 / 2,45)	2,00 (2,32 / 4,57)	7,59 (4,52 / 12,39)
<b>29 – TNF-<math>\alpha</math>-Konzentration im Serum (pg / ml)</b>				
	72	0,00 (0,00 / 1,49)	0,00 (0,00 / 4,23)	6,40 (0,00 / 15,94)
<b>30 – IL-10-Konzentration im Serum (pg / ml)</b>				
	3	0,11 (0,00 / 1,49)	1,41 (0,00 / 3,00)	4,89 (2,69 / 17,64)
	6	0,11 (0,00 / 1,49)	2,14 (0,62 / 8,40)	6,15 (2,65 / 24,06)
	24	0,11 (0,00 / 1,49)	0,11 (0,00 / 1,49)	0,61 (0,00 / 2,14)

Abbildung	Zeit (h)	Median (1. / 3. Quartil)		
		Kontrolle	Laparotomie	SID
	72	0,11 (0,00 / 1,49)	0,00 (0,00 / 0,92)	0,03 (0,00 / 0,75)
<b>31 – IL-1<math>\beta</math>-Konzentration im Splenozytenüberstand (pg / ml)</b>				
31A	3	34,44 (22,08 / 57,41)	21,96 (16,92 / 31,40)	22,05 (18,97 / 28,63)
31B	24	34,44 (22,08 / 57,41)	62,26 (41,62 / 73,81)	45,00 (31,42 / 71,97)
<b>32 – IL-6-Konzentration im Splenozytenüberstand (pg / ml)</b>				
32A	3	525,30 (380,01 / 718,33)	229,10 (159,59 / 292,21)	266,34 (204,20 / 304,44)
32B	6	525,30 (380,01 / 718,33)	316,49 (207,15 / 453,96)	338,44 (293,65 / 414,55)
32C	24	525,30 (380,01 / 718,33)	851,64 (678,33 / 959,15)	710,58 (607,25 / 1027,80)
<b>33 – TNF-<math>\alpha</math>-Konzentration im Splenozytenüberstand (pg / ml)</b>				
	3	865,61 (747,54 / 940,35)	557,62 (505,56 / 686,16)	633,71 (545,27 / 725,22)
	6	865,61 (747,54 / 940,35)	587,44 (490,70 / 841,08)	683,45 (589,01 / 745,09)
	24	865,61 (747,54 / 940,35)	1074,60 (880,25 / 1167,50)	1070,10 (967,73 / 1219,40)
	72	865,61 (747,54 / 940,35)	1197,60 (967,17 / 1468,00)	985,14 (509,08 / 1683,10)
<b>34 – INF-<math>\gamma</math>-Konzentration im Splenozytenüberstand (pg / ml)</b>				
	3	72,66 (24,00 / 613,00)	4,78 (2,35 / 28,14)	4,10 (1,52 / 17,41)
	6	72,66 (24,00 / 613,00)	21,87 (1,94 / 79,58)	19,00 (3,74 / 58,37)
	24	72,66 (24,00 / 613,00)	646,73 (287,32 / 871,72)	95,20 (29,66 / 122,04)
	72	72,66 (24,00 / 613,00)	430,44 (121,68 / 703,11)	174,62 (21,93 / 663,72)
<b>35 – IL-10-Konzentration im Splenozytenüberstand (pg / ml)</b>				
35A	3	299,17 (179,34 / 426,74)	185,35 (150,98 / 236,55)	204,91 (181,23 / 241,07)

Abbildung	Zeit (h)	Median (1. / 3. Quartil)		
		Kontrolle	Laparotomie	SID
35B	24	299,17 (179,34 / 426,74)	439,18 (364,85 / 514,00)	571,40 (505,80 / 765,39)
<b>36 - Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase</b>				
	3	1,31 (1,02 / 1,45)	1,69 (1,52 / 1,85)	2,20 (1,87 / 2,67)
	6	1,31 (1,02 / 1,45)	1,70 (1,41 / 1,92)	1,85 (1,63 / 2,06)
	24	1,31 (1,02 / 1,45)	1,24 (1,11 / 1,40)	1,42 (1,21 / 1,65)
	72	1,31 (1,02 / 1,45)	1,28 (1,11 / 1,48)	2,08 (1,34 / 3,05)
<b>37 – Tryptophan-Konzentration im EDTA-Plasma (x 10<sup>4</sup> nM)</b>				
	3	11,90 (11,00 / 14,00)	10,50 (9,40 / 11,43)	7,68 (7,26 / 8,44)
	6	11,90 (11,00 / 14,00)	11,20 (9,22 / 12,63)	8,47 (7,54 / 9,32)
	24	11,90 (11,00 / 14,00)	13,40 (12,00 / 15,90)	10,95 (9,81 / 12,25)
	72	11,90 (11,00 / 14,00)	12,25 (11,53 / 13,58)	7,64 (6,21 / 11,93)
<b>38 – Kynureninsäure-Konzentration im EDTA-Plasma (nM)</b>				
38A	6	78,10 (48,00 / 95,60)	69,15 (57,45 / 80,00)	50,90 (37,65 / 55,38)
38B	72	78,10 (48,00 / 95,60)	86,80 (60,13 / 123,50)	30,95 (7,51 / 69,58)
<b>39 – Xanthurensäure-Konzentration im EDTA-Plasma (nM)</b>				
39A	3	0,00 (0,00 / 46,90)	0,00 (0,00 / 0,00)	0,00 (0,00 / 0,00)
39B	6	0,00 (0,00 / 46,90)	24,90 (0,00 / 35,45)	0,00 (0,00 / 0,00)
39C	72	0,00 (0,00 / 46,90)	27,10 (9,94 / 33,63)	0,00 (0,00 / 2,27)
<b>40 – Picolinsäure-Konzentration im EDTA-Plasma (nM)</b>				
40A	6	149,00 (115,00 / 189,00)	134,00 (96,85 / 158,00)	93,85 (65,23 / 120,25)
40B	24	149,00 (115,00 / 189,00)	116,50 (93,70 / 157,00)	52,65 (39,43 / 91,93)
49C	72	149,00 (115,00 / 189,00)	170,50 (124,50 / 224,00)	42,55 (12,28 / 121,55)

**Danksagungen**

Vor allem möchte ich Frau Dr. PD Pia Menges für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit und den thematischen und praktischen Hilfestellungen danken. Ganz besonders die Unterstützung bei der Bewerbung um das Gerhard-Domagk-Promotionsstipendium und das Mentoring-Programm der Universität Greifswald und Rostock haben mich persönlich und beruflich weit vorangebracht.

Beim Gerhard-Domagk-Nachwuchsförderprogramm möchte ich mich herzlich bedanken, da dieses mir die Promotion erst ermöglicht hat.

Ohne die tatkräftige Unterstützung durch mein Labor, insbesondere Christine Hackbarth, Julia Klauke und Antje Janetzko hätten die Versuche nicht stattfinden können, also danke für euren Beitrag an meiner Doktorarbeit und dem Spaß, den wir im Labor hatten.

Friederike Löning, danke für deine Hilfe, die ich auch spontan morgens um halb sieben bekommen konnte, den unzähligen Kaffeepausen und den vielen aufbauenden Worten. Das wir vom FELASA-Schein bis zur fertigen Doktorarbeit alles miteinander durchlaufen haben, hat mir viel Halt in der ganzen Zeit gegeben.

Bastian Wenke und Annabel Kleinwort, danke für die viele Einarbeitung, Hilfe und die unzähligen Stunden am FACS. Auch wenn es mal nicht gut lief, habt ihr immer gute Ideen gehabt und mich aufgemuntert.

Für die Mitarbeit am gemeinsamen Paper möchte ich außerdem Jonas Menz und PD Dr. Dr. med Tobias Schulze danken.

Ich bedanke mich bei der Abteilung für Immunologie für die gute Zusammenarbeit, wobei vor allem Grazyna Domanska und Katrin Schmoeckel hervorzuheben sind, die mir viele fachliche Hilfestellungen geboten haben.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden, die mich in verschiedensten Weisen bei meiner Doktorarbeit unterstützten und immer ein offenes Ohr hatten.