

Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf

**Untersuchungen zur Rolle von Phagozytose und der Bildung
reaktiver Sauerstoffspezies in neutrophilen Granulozyten
nach schwerem Trauma**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Katharina Coletta Stein

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü

Zweitgutachterin: PD Dr. med. Judith Strapatsas

Zusammenfassung

In Deutschland und weltweit stellen Unfälle eine der häufigsten Todesursachen dar. Dabei sterben die Menschen nicht nur an den direkten Folgen ihrer Verletzungen, sondern auch an den Komplikationen im Verlauf. Nach schweren Traumata kann es zu einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) kommen. Hauptakteure in der Entstehung des SIRS sind neutrophile Granulozyten (PMN). Sie verfügen über verschiedene Mechanismen zum Schutz des Körpers vor schädlichen Einflüssen von außen. Dazu gehört zum einen die Fähigkeit zur Phagozytose und zum anderen die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die damit verbundene Freisetzung proteolytischer Enzyme. Vermittler der Immunantwort sind Zytokine, inflammationsfördernd sind hierbei unter anderem IL-1 β und IL-8. Sie locken PMN zum Ort der Entzündung, *primen* und aktivieren sie.

In dieser Arbeit wurde die Aktivität der PMN im Verlauf an drei Zeitpunkten bis zu zehn Tage nach Polytrauma gemessen. Die Zellen wurden aus dem Blut von 18 polytraumatisierten Patienten isoliert und die Fähigkeit zur Phagozytose sowie zur Bildung von ROS bestimmt. Weiterhin wurde die Genexpression von IL-1 β und IL-8 mittels *Real-time PCR* quantifiziert. Als Vergleich dienten PMN gesunder Probanden.

Die Expression von IL-8 in PMN war am Tag 1, 5 und 10 nach Trauma signifikant erniedrigt. Die Genexpression von IL-1 β als Initiator der Entzündungsreaktion dagegen war am Tag 1 nach Trauma signifikant erhöht. Eine deutlich verminderte Expression beider Zytokine am fünften Tag nach dem Trauma deutet auf eine zwischenzeitlich abklingende Inflammation hin. Bei der ROS-Bildung konnte ebenfalls ein Anstieg durch das endogene *priming* der Zellen am Tag 1 bestätigt werden. In Bezug auf die Phagozytose-Aktivität konnten nach Trauma keine signifikanten Unterschiede zu PMN aus gesunden Probanden ausgemacht werden. Ein Zusammenhang zwischen der PMN-Aktivität in der Zirkulation und dem klinischen SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) ließ sich nicht erkennen. Zusammenfassend lassen sich durch Bestimmung der Aktivität zirkulierender PMN keine Rückschlüsse auf den Inflammationsstatus und das Outcome polytraumatisierter Patienten ziehen.

Summary

In Germany and around the world accidents are one of the most common causes of death. The patients not only die from direct consequences of their injuries, but also from the complications that accompany them. After a severe trauma, a Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) can occur. The polymorph nuclear neutrophils (PMN) play a major role in this context. They have different mechanisms to protect the human body from harmful external influences. These include the ability to phagocytosis and the production of reactive oxygen species (ROS) as well as the associated release of proteolytic enzymes. The immunological reaction is mediated by cytokines, for example IL-1 β and IL-8 act pro-inflammatory. They recruit PMN to the site of the inflammation, prime and activate them.

In this work, PMN activity was measured at three time points up to ten days after a polytrauma. The cells were isolated from the blood of 18 polytraumatized patients and the ability to phagocytose as well as the formation of ROS were determined. Furthermore, gene expression of IL-1 β and IL-8 was quantified by real-time PCR. PMN of healthy subjects served as a comparison.

The expression of IL-8 in PMN was significantly decreased on day 1, 5 and 10 after trauma. However, gene expression of IL-1 β as an initiator of the inflammatory response was significantly increased on day 1 after trauma. A distinctly reduced expression of both cytokines on day 5 after the trauma indicates a temporary remission of the inflammation. ROS formation was also confirmed to increase on day 1 after trauma due to endogenous cell priming. In terms of phagocytic activity, no significant differences to PMN from healthy volunteers could be identified after trauma. A correlation between activity of circulating neutrophils and the clinical SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score was not recognized. In summary, by determining the activity of circulating PMN, no conclusions can be drawn about the inflammatory status and the outcome of polytraumatized patients.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
0,9-%-ige NaCl	Physiologische Kochsalzlösung (0,9 %)
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
AIS	<i>Abbreviated Injury Scale</i>
ANOVA	Einfaktorielle <i>between-subjects</i> Varianzanalyse
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARDS	Akutes Lungenversagen
Arp	<i>Actin-related protein</i>
BAUA	Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin
BE	Blutentnahme
bzw.	beziehungsweise
C	Komplementfaktor
ca.	circa
CARS	Kompensatorisches Antiinflammatorisches <i>Response</i> -Syndrom
cDNA	Komplementäre DNA
CLO ⁻	Hypochlorid-Anionen
CR	Komplementrezeptor
Ct	Zyklusschwelle
d	Tag(e)
DAG	Diacylglycerol
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DC	Dendritische Zelle(n)
DHR	Dihydrorhodamin
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence activated cell scan</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBS	<i>Foetal Bovine Serum</i>
FcR	Fc-Rezeptor
FcαR	Fcα-Rezeptor

FcγR	Fcγ-Rezeptoren
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
fMLP	N-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Gramm
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i>
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
ggf.	gegebenenfalls
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDGF	<i>Human mobility box group-1</i>
HES	Hydroxyethylstärke
HOCl	Hypochloridsäure
Ig	Immunglobulin
IL-1R	IL1-Rezeptor
IL-n	Interleukin-n
ISS	<i>Injury Severity Score</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
K	Kalium
kg	Kilogramm
LAT	<i>Linker of activated T-cells</i>
Lsg.	Lösung
MAC	Membranangriffskomplex
MAP	Arterieller Mitteldruck
MBL	Mannose-bindendes Lektin
mg	Milligramm
min	Minuten
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

MODS	<i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i>
MOF	<i>Multiple Organ Failure</i>
MOV	Multiorganversagen
MPO	Myeloperoxidase
MR	Mannoserezeptor
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinaminadeninindinukleotidphosphat
NET	<i>Nuclear extracellular trap</i>
NLR	<i>NOD-like-Rezeptor</i>
NLRP3	<i>NACHT-LRR-PYD-containing protein 3</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
Nr.	Nummer
NTC	<i>Non template control</i>
O ₂	Molekularer Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
O ₃	Ozon
OH·	Hydroxyl-Radikal
OP	Operation
PA	Phosphatidsäure
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PaO ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS w/o Mg/Ca	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Magnesium und Calcium
PC	Phosphatidylcholin
PCA	<i>Procoagulant activity</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pen	Penicillin
PI(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI4P-5K	Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKW	Personenkraftwagen

PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMN	Neutrophile Granulozyten
PRM	<i>Pattern recognition molecules</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PS	Phosphatidylserin
PTBS	Posttraumatische Belastungsstörung
R	Rhodamin
RAGE	<i>Receptors for advanced glycation end-products</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SAP	Serum Amyloid P
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SHIP	<i>Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase</i>
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIRS	Systemisches Inflammatorisches <i>Response</i> -Syndrom
SOFA	<i>Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment</i>
SR	<i>Scavenger-Rezeptor</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
Strep	Streptomycin
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TSP	Thrombospondin
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
VU	Verkehrsunfall
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WAVE	WASP-Familien-Verprolin-homologes Protein
ZVK	Zentralvenöser Katheter

µm

Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Einführung in die Thematik	1
1.2 Neutrophile Granulozyten (PMN).....	1
1.3 Phagozytose.....	4
1.4 Respiratory Burst	8
1.5 Polytrauma	11
1.6 Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) und Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS)	13
1.7 Ziele der Arbeit	17
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Geräte	19
2.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.2.1 Labormaterialien	20
2.2.2 Reagenzien.....	20
2.2.3 Lösungen.....	21
2.2.4 Kits.....	22
2.2.5 Primer.....	22
2.3 Probanden.....	22
2.4 Blutentnahme	26
2.5 Herstellen einer reinen Granulozyten-Population.....	26
2.6 Bestimmung der Zellzahl	27
2.7 Bestimmung der Zytokinexpression	27
2.7.1 RNA-Isolation mit Trizol.....	27
2.7.2 Bestimmung der RNA-Konzentration	28
2.7.3 Reverse Transkription.....	28
2.7.4 Polymerase-Kettenreaktion.....	29
2.8 Bestimmung der Phagozytose-Aktivität	30
2.9 Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (oxidative burst).....	32
2.10 Durchflusszytometrie	33
2.11 Statistik	34
3 Ergebnisse.....	36

3.1	Patientenkollektiv.....	36
3.1.1	Klinische Angaben.....	36
3.1.2	Unfallmechanismus	39
3.1.3	Verletzungsmuster	39
3.1.4	SOFA-Score.....	41
3.2	Bestimmung der Zytokinexpression	42
3.3	Aktivitätsbestimmungen	45
3.3.1	Bestimmung der Phagozytose-Aktivität	45
3.3.2	Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (oxidative burst)	47
3.4	Korrelationen.....	51
3.4.1	Korrelation der Aktivität mit der Leukozytenzahl im Blut.....	51
3.4.2	Korrelation der Aktivität mit dem SOFA-Score.....	52
4	Diskussion.....	54
5	Schlussfolgerungen	62
6	Literaturverzeichnis	63
7	Danksagung	1

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Das Immunsystem des Menschen besteht aus einem angeborenen und einem adaptiven Teil, der sich erst im Laufe des Lebens entwickelt. Es schützt den Körper vor schädlichen Einwirkungen von außen. Bei besonders starken Schädigungen eines menschlichen Körpers, wie einem schweren Trauma, kann die Reaktion des Immunsystems überschießend sein mit dem Versuch, die Situation in den Griff zu bekommen. Dabei nehmen auch körpereigene Zellen Schaden durch die hochpotenten Gifte der Immunzellen. Zu den Effektorzellen, die auch bei sterilen Entzündungen als eine der ersten rekrutiert werden, zählen die neutrophilen Granulozyten (PMN) [1]. Sie sind Zellen der angeborenen Immunantwort und verfügen über vielfältige Mechanismen, Mikroorganismen zu eliminieren und Gewebeerstörungen zu beseitigen, scheinen aber die Regeneration der Wunde zu verzögern [1, 2]. Auch können sie zusätzliche Gewebeschäden verursachen, im schlimmsten Fall stirbt der Patient am Versagen mehrerer lebenswichtiger Organe [3, 4].

1.2 Neutrophile Granulozyten (PMN)

PMN gehören zur Gruppe der Leukozyten und sind Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems, spielen aber auch eine wichtige Rolle als Vermittler bei der adaptiven Immunantwort. Sie gehen aus der myeloischen Stammzelle hervor, machen mit 50-70 % den größten Anteil der im Blut zirkulierenden Leukozyten aus und führen die erste Abwehr gegen Bakterien und Pilze aus [5].

PMN haben einen Durchmesser von 12-15 μm . Der Zellkern ist in mehrere über dünne Streben verbundene Segmente geteilt, daher werden sie polymorphkernige Zellen genannt (Abb. 1) [6]. Pro Tag werden ca. 10^{11} PMN im Knochenmark gebildet [5]. Die vollständig ausdifferenzierten Zellen treten ins Blut über. Dort zirkulieren PMN 8-12 h lang, bevor sie in das Gewebe, ihren eigentlichen Wirkort, übertreten. Dort überleben sie weitere 1-2 d [5]. Neben den zirkulierenden PMN gibt es noch jene, die an den

Gefäßwänden anhaften, und einen Vorrat an reifen Granulozyten im Knochenmark. Aus diesen Reserven kann die Konzentration der PMN im Blut bei akuten bakteriellen Infektionen rasch erhöht werden [6]. Außerdem können Produktion und Lebensdauer der PMN um ein Vielfaches gesteigert werden. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass PMN auch unter normalen Umständen etwa 5 d im peripheren Blutstrom zirkulieren [7].

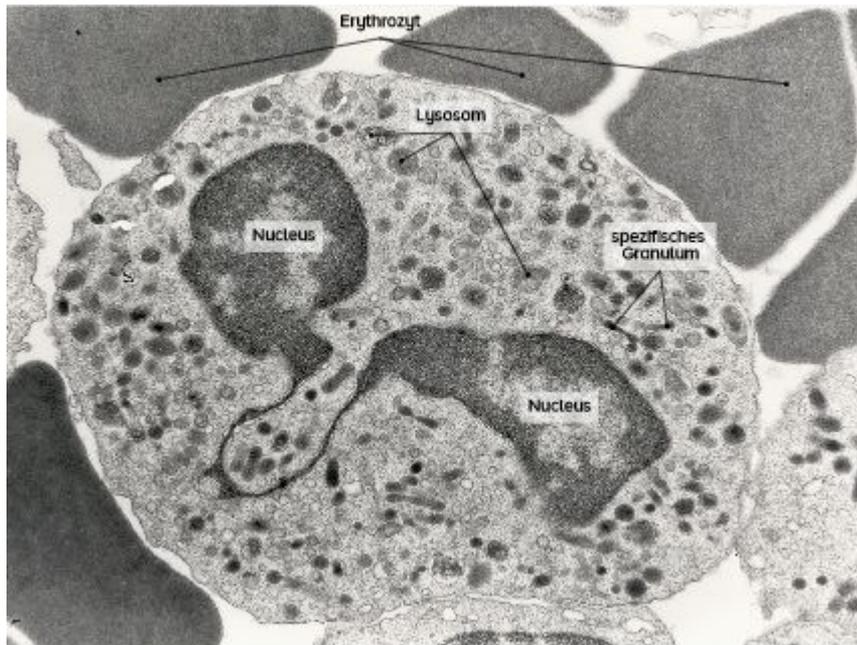


Abb. 1: Neutrophiler Granulozyt unter dem Elektronenmikroskop. Vergrößerung in der Quelle nicht angegeben.

Verwendet mit Genehmigung aus www.morphomed.ch, © Universität Bern [8]

Das Zytoplasma von PMN enthält nur wenige Mitochondrien, kleine Golgi-Apparate und viele dicht bepackte Granula, die den Zellen ihren Namen geben [9]. In den Granula sind extrem potente mikrobiozide Proteine wie Elastase, Lysozym, Laktoferrin, Myeloperoxidase (MPO) und weitere Proteasen, aber auch Phosphatasen und andere Enzyme gespeichert [10, 11]. Je nach Vorkommen wird zwischen MPO-positiven (primären, azurophilen) und MPO-negativen (sekundären, spezifischen) Granula unterschieden [11]. Des Weiteren gibt es auch Gelatinase enthaltende (tertiäre) Granula und sekretorische Vesikel [10]. Letztere enthalten Plasma und dienen als mit Rezeptoren bestückte Membranreserve [12].

Im Blut zirkulierende PMN erkennen entzündetes Gewebe über Selektine auf der

Oberfläche des Endothels. Die zunächst schwache Adhäsion über Selektine wird von einer stärkeren Bindung, die durch Integrine vermittelt wird, abgelöst. Die Integrin-Bindung initiiert zum einen die Transmigration der PMN zwischen den Endothelzellen hindurch in das Gewebe, zum anderen werden Phagozytose und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) hierüber vermittelt [13-15].

Im Gewebe bewegen sich PMN entlang eines Gradienten aus Entzündungsmediatoren zum eingedrungenen Erreger hin. Dieser Vorgang wird Chemotaxis genannt.

Bei dem Durchtritt durch das Endothel werden die PMN vollständig aktiviert und sind dann in der Lage verschiedene Funktionen zu erfüllen. PMN sind unter anderem zur Phagozytose und zur Bildung von ROS fähig, auf deren Ablauf in den nachfolgenden Abschnitten näher eingegangen werden soll. Des Weiteren kommt es zur als Degranulation bezeichneten Entleerung der Granula. Sekretorische Vesikel und Gelatinase-haltige Granula geben ihren Inhalt hauptsächlich via Exozytose an die Umgebung ab [16]. Azurophile und spezifische Granula verschmelzen meist mit dem Phagosom, zum Teil aber auch mit der äußeren Plasmamembran [17, 18].

PMN sind zudem zu einem als NETose bezeichneten Vorgang fähig, bei dem die Zellen *neutrophil extracellular traps* (NETs) bilden. Der Leukozyt stößt dabei ein Netz aus Chromatin und dem Inhalt der Granula aus [19]. In dieser Falle können die antimikrobiellen Proteasen und Histone hoch konzentriert wirken und sowohl gram-negative als auch gram-positive Bakterien, Pilze und Parasiten unschädlich gemacht werden [20-22]. NETose führt meistens zum Zelltod des Granulozyten selbst und findet abhängig von der Bildung von ROS statt [23].

Außerdem interagieren PMN durch die Ausschüttung von Zytokinen und die Expression von Oberflächenmolekülen auch mit weiteren Zellen des Immunsystems, unter anderem mit denen der adaptiven Immunantwort [5].

1.3 Phagozytose

Phagozytose bezeichnet den Vorgang, andere Zellen bzw. Zellfragmente oder Mikroorganismen in eine Zelle aufzunehmen. Im menschlichen Körper wird diese Aufgabe vor allem von professionellen Phagozyten wie PMN, Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) übernommen. Sie nehmen Bakterien und Pilze auf, verdauen diese und leiten durch Antigenpräsentation und Sekretion von inflammatorischen Zytokinen die adaptive Immunantwort in die Wege. Im Falle eines Gewebeschadens beseitigen PMN die zugrunde gegangenen körpereigenen Zellen. Auch apoptotische Zellen werden aufgenommen. [5, 24] Im Gegensatz zur Phagozytose von fremden Partikeln oder nekrotischen Zellen wird hierbei durch die Ausschüttung von antiinflammatorischen Zytokinen eine Entzündungsreaktion verhindert [25, 26].

Phagozyten erkennen ihre Zielobjekte über intrazellulär und oberflächlich lokalisierte Rezeptoren, den *pattern recognition receptors* (PRRs). Als Liganden dienen Oberflächen-assoziierte Moleküle, sogenannte PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), sowie körpereigene Botenstoffe (Alarmine), die bei Verletzungen freigesetzt werden. Diese Strukturen sind in der Lage, eine Immunantwort auszulösen, und werden unter dem Begriff *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) zusammengefasst [27]. Zu den *Alarminen* gehören Moleküle wie *Human mobility box group-1* (HMBG-1), *Hepatoma-derived growth factor* (HDGF), Harnsäure und andere Stoffe, die normalerweise nur intrazellulär zu finden sind und bei Zellschäden freigesetzt werden [28-30].

PMN exprimieren alle der zehn bekannten *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) bis auf TLR3, mit deren Hilfe intra- und extrazellulär Mikroorganismen sowie endogene Liganden erkannt werden können [31, 32]. Außerdem findet man auf PMN Rezeptoren der C-Typ-Lektine, zu denen Dectin-1 gehört, welcher an β -Glykane von Pilzen bindet [33, 34]. Zusätzlich verfügen PMN über intrazelluläre *Nod-like-Rezeptoren* (NLRs), nämlich *nucleotide-binding oligomerization domain 2* (NOD2) und *NACHT-LRR-PYD-containing protein 3* (NLRP3) [35]. Der NLR-Typ NOD2 dient der Erkennung von Bakterien, während NLRP3 auch Warnsignale körpereigener Zellen wahrnimmt [36, 37]. Alarmine interagieren teilweise ebenfalls mit TLR und mit *receptors for advanced glycation end-products* (RAGE) [38, 39]. (Abb. 2)

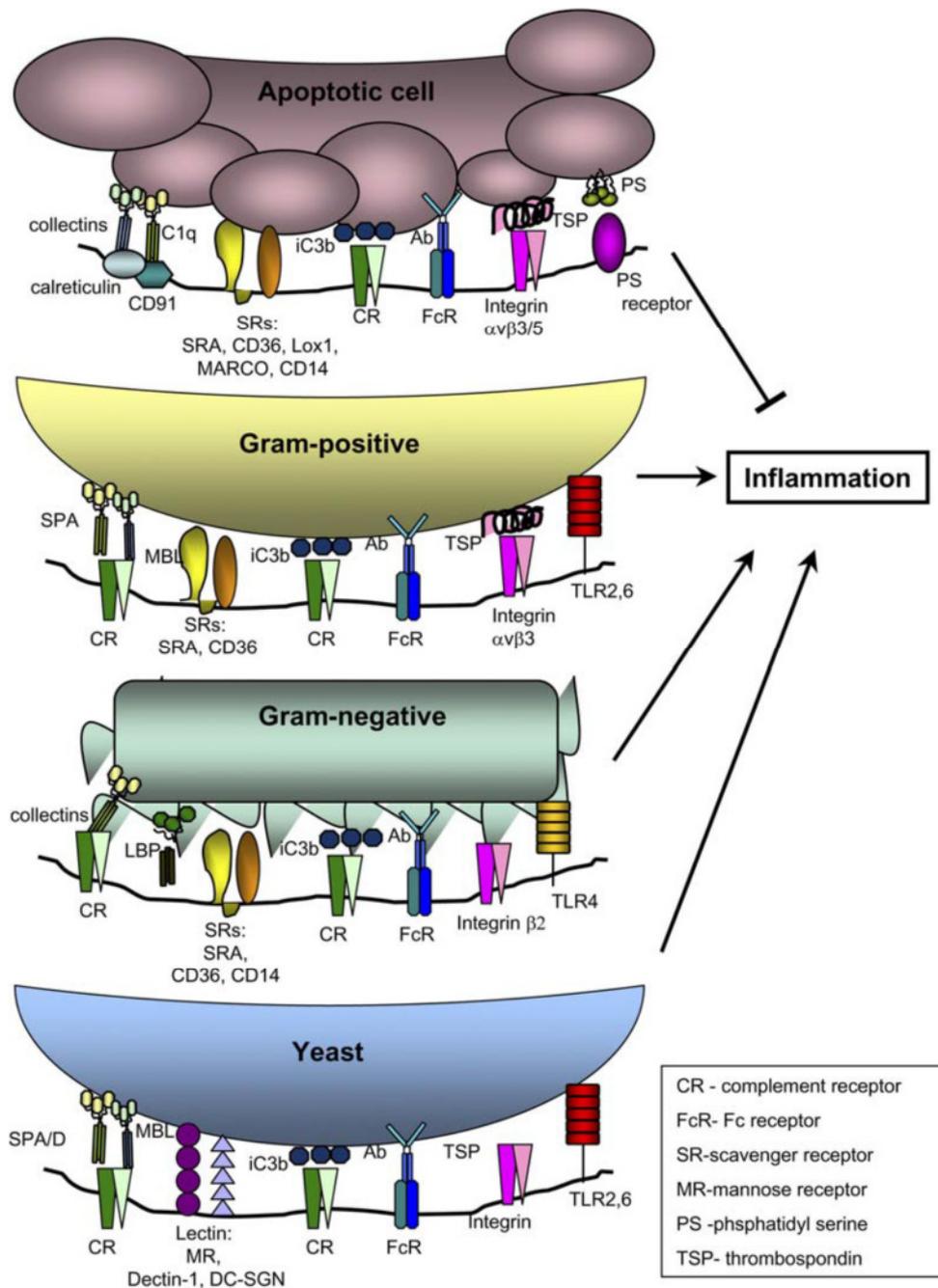


Abb. 2: Gemeinsamkeit der Erkennung von apoptotischen Zellen und Pathogenen über phagozytische Rezeptoren.

Es sind die Erkennung und Bindung von apoptotischen Zellen, gram-positiven sowie gram-negativen Bakterien und von Hefezellen über PAMPs durch phagozytierende Zellen dargestellt.

C - Komplementfaktor; CR - Komplementrezeptor; FcR - Fc-Rezeptor; MR - Mannoserezeptor; PAMP - *pathogen associated molecular pattern*; PS - Phosphatidylserin; SR - *scavenger*-Rezeptor; TLR - *Toll-like*-Rezeptor; TSP - Thrombospondin. Verwendet mit Genehmigung von Elsevier aus [42].

Bei nicht voraktivierten PMN steigert eine Kennzeichnung der Mikroorganismen durch Opsonisierung die Phagozytose-Rate [40]. Die wichtigsten im Blut zirkulierenden Opsonine sind Antikörper und Komplementfaktoren. Sie umhüllen Pathogene und werden dann von entsprechenden Rezeptoren auf der Oberfläche von Phagozyten erkannt.

PMN interagieren über Fc γ - und Fc α -Rezeptoren mit den Immunglobulinen IgG und IgA [41, 42].

Das Komplementsystem gehört ebenfalls zur angeborenen Immunantwort und besteht aus einer Kaskade hintereinandergeschalteter Proteasen, die über verschiedene Wege aktiviert werden kann, wobei der Beginn immer die Bindung von im Blut gelösten *pattern recognition molecules* (PRMs) an PAMPs ist. Alle Wege enden mit der Spaltung des Komplementfaktors C3 zu C3a und C3b [43]. C3b wirkt unter anderem als Opsonin und kann von PMN mithilfe der Komplementrezeptoren (CR) CR1 und CR3 gebunden werden [44, 45]. Außerdem exprimieren PMN Rezeptoren für C3a und C5a, Mediatoren, die als Nebenprodukte der Enzymkaskade des Komplementsystems entstehen. Mollnes et al. [46] fanden heraus, dass die Bindung von C5a an C5aR die Expression von CR3 stimuliert und somit einen wesentlichen Beitrag zur *Escherichia coli* (*E. coli*)-induzierten Phagozytose und der damit verbundenen Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch PMN leistet.

Auch Signale über die anderen Rezeptoren bewirken ein sogenanntes *priming* der PMN, ein Voraktivieren als Vorbereitung für die Aufnahme und Verdauung von Partikeln. Bei fehlender Stimulation an TLRs, NLRs, Fc- und Komplementrezeptoren sind Zellfunktionen wie die Phagozytose, die intrazelluläre Bildung von Superoxidanionen und die Ausschüttung von eigenen Entzündungsmediatoren bei Kontakt mit Bakterien oder Immunkomplexen deutlich gehemmt [35, 47-50]. CR regulieren durch ihre Aktivität sogar gegenseitig ihre Expression hoch [46]. Ein *primender* Effekt konnte ebenfalls stimulierenden Zytokinen in der Umgebung der Entzündung nachgewiesen werden, z. B. den Interleukinen IL-1 β und IL-8, TNF- α und Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor (G-CSF) [51, 52].

Ein Pathogen wird von verschiedenen phagozytischen Rezeptortypen erkannt, sodass in der Zelle mehrere Signalwege gleichzeitig aktiviert werden [53]. Als Beispiel ist der

komplexe intrazelluläre Signalweg bei der FcRezeptor (FcR)-Aktivierung in Abb. 3 skizziert. Die Rezeptorbindung führt über Veränderungen im Zytoskelett und der Zellmembran zur Bildung von Ausstülpungen der Membran, sogenannten Pseudopodien, welche das aufzunehmende Partikel umschließen [54, 55]. Anschließend wird es unter Entstehung eines Phagosoms in die Zelle aufgenommen.

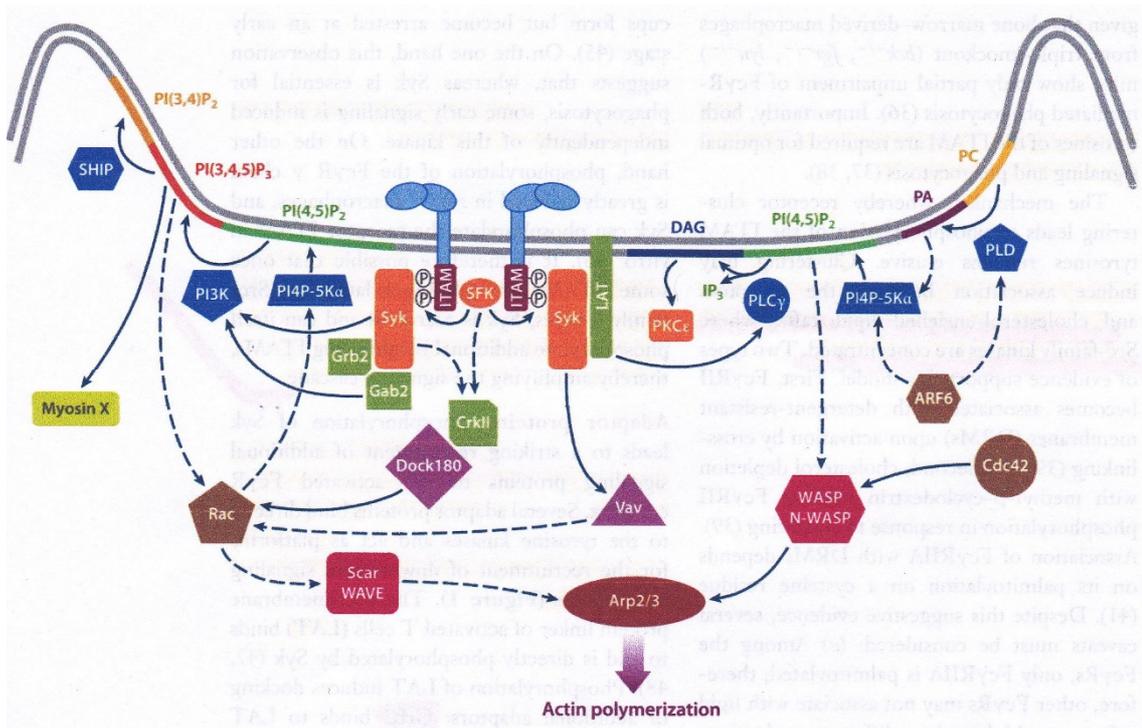


Abb. 3: Intrazellulärer Signalweg der FcR-vermittelten Phagozytose

DAG-Diacylglycerol; ITAM - *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*; LAT - *Linker of activated T-cells*; PA - Phosphatidsäure; PC - Phosphatidylcholin; PI3K - Phosphatidylinositol-3-Kinase; PI(3,4)P₂ - Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat; PI(3,4,5)P₃ - Phosphatidyl-3,4,5-Triphosphat; PI(4,5)P₂ - Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat; PKC - Proteinkinase C; PLC - Phospholipase C; PLD - Phospholipase D; SHIP - *Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase*; Syk - Milz-Tyrosinkinase; WASP - Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein. Aus Referenz [24].

In der Zelle trennt sich das Phagosom von der Plasmamembran und verschmilzt mit den Granula der PMN, die ihre bakteriziden Enzyme in die entstandene Vakuole abgeben [18, 56, 57]. Der Verlust an Membranoberfläche durch die Internalisierung wird via Exozytose intrazellulärer Membranreserven ausgeglichen [55].

1.4 Respiratory Burst

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehören Sauerstoff-Radikale und stabile Oxidantien. Sie werden in PMN von der Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase gebildet. Diese wird bei der Phagozytose aktiviert und trägt wesentlich zur Eliminierung bestimmter Mikroorganismen bei [58-60]. Die schlagartig erhöhte Produktion der genannten Sauerstoffderivate durch PMN und deren Freisetzung in die Umgebung wird *respiratory* oder *oxidative burst* genannt. Wie wichtig die NADPH-Oxidase ist, zeigt sich an Patienten, die unter chronischer Granulomatose leiden. Bei ihnen tritt ein genetischer Defekt in einer der Untereinheiten der NADPH-Oxidase auf, sodass sie rezidivierenden Infektionen ausgesetzt sind [61]. Die Aktivität des Enzyms muss streng reguliert und örtlich begrenzt werden, da es zytotoxische Prozesse auslöst, die stark gewebschädigend wirken können [62].

Die NADPH-Oxidase besteht aus mehreren Untereinheiten, die vor der Aktivierung an verschiedenen Orten in der Zelle lokalisiert sind. Über die Cofaktoren Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und zwei Hämgruppen werden Elektronen vom zytosolischen NADPH auf molekularen Sauerstoff (O₂) übertragen [63]. So entstehen extrazellulär oder im Phagolysosom Superoxid-Anionen. Zugrunde liegt folgende Reaktionsgleichung:



Im Redox-Zentrum liegt das Flavohämprotein Cytochrom b₅₅₈, welches FAD sowie die beiden Hämgruppen enthält [65, 66]. Es befindet sich in den Membranen der spezifischen Granula und der sekretorischen Vesikel und folglich nach Aktivierung der Zellen auch in der äußeren Plasmamembran [67, 68]. Es besteht aus den beiden Untereinheiten gp91^{phox} und p22^{phox} [69]. Nach der Fusion mit dem Phagolysosom werden die zytosolischen Komponenten des Enzymkomplexes - p40^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} - phosphoryliert und lagern sich an das Cytochrom b₅₅₈ an [70-72]. Wesentlich für den Elektronenfluss ist auch die Bindung der Guanosintriphosphat (GTP)-bindenden Proteine Rac1 und besonders Rac2 [73, 74]. Nun befindet sich die Oxidase im aktivierten Zustand und die Elektronen können vom NADPH auf das FAD, als nächstes auf die innere, dann auf die äußere Hämgruppe und anschließend auf den Sauerstoff übertragen werden [75, 76]. Ein Schema des Elektronentransports innerhalb der

NADPH-Oxidase zeigt Abb. 4. Abhängig von der Akkumulation von Phosphatidylinositolphosphaten wird die Oxidase nur in der Plasmamembran der Vakuole aktiviert [59].

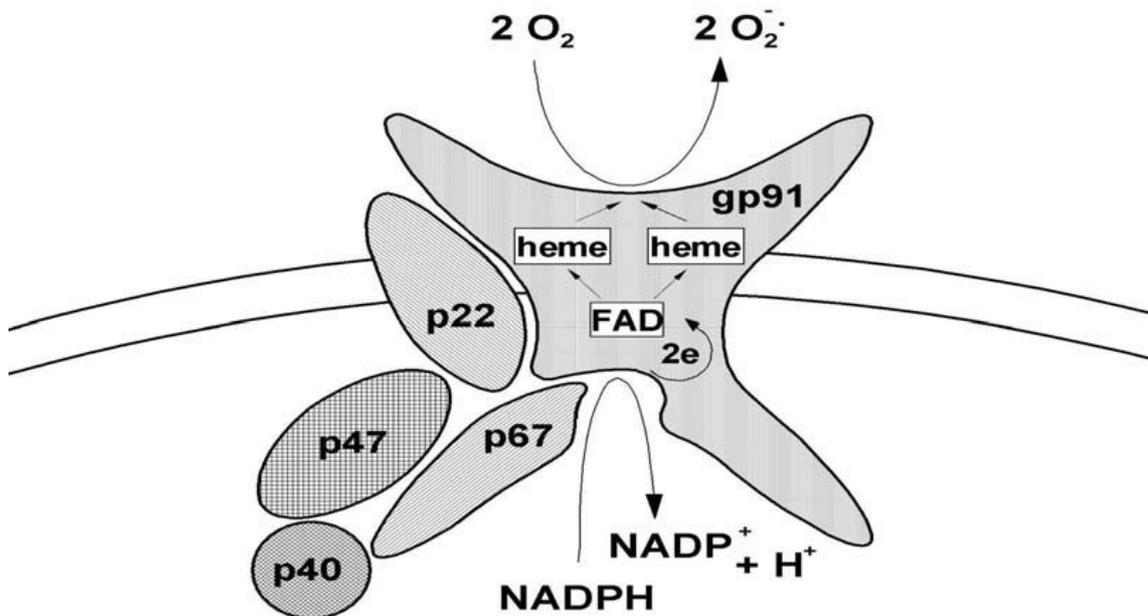


Abb. 4: Schematische Darstellung des Elektronentransfers der NADPH-Oxidase.

Nach Aneinanderlagerung des NADPH-Oxidase-Komplexes bindet NADPH aus dem Zytosol an das Enzym und gibt Elektronen ab. Diese Elektronen werden dann über FAD und die Hämgruppen auf molekularen Sauerstoff auf der anderen Seite der Membran übertragen, sodass entweder im Phagosom oder in der extrazellulären Umgebung Superoxide entstehen.

FAD - Flavin-Adenin-Dinukleotid; H - Wasserstoff; NADP - Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotidphosphat; O₂ - molekularer Sauerstoff. Modifiziert mit Genehmigung der Springer-Verlag GmbH nach [77].

Die direkte bakterizide Wirkung der Superoxid-Anionen (O₂⁻) im Phagolysosom ist relativ gering. Spontan oder von der Superoxid-Dismutase katalysiert bilden sie Wasserstoffperoxid (H₂O₂) [78]. H₂O₂ reagiert mit Superoxid-Anionen zu Hydroxyl-Radikalen (OH[·]) und Singulett-Sauerstoff (¹O₂) [79, 80]. Diese Moleküle sind sehr reaktiv und wirken giftig auf Mikroorganismen [81]. Des Weiteren ist H₂O₂ ein Substrat der MPO. Durch Oxidation von Halogenen produziert dieses Enzym unter anderem Hypochlorid-Anionen (ClO⁻) und verstärkt die bakterizide Wirkung um ein Vielfaches [81-83]. Der MPO konnte auch eine Katalase-Aktivität nachgewiesen werden, mit der diese in der Lage ist, H₂O₂ in Wasser (H₂O) und O₂ abzubauen, um andere Proteine vor zu hohen Konzentrationen zu schützen [84]. Aus Singulett-Sauerstoff kann Antikörper-

induziert auch Ozon (O₃) gebildet werden, um Mikroorganismen abzutöten [85].

Allein die Bildung von ROS macht allerdings noch lange nicht den zytotoxischen Effekt der NADPH-Oxidase aus [62]. Sie ist zudem noch an der Freisetzung der Proteasen aus den Granula beteiligt. Die aus dem Elektronentransport entstehende Depolarisation der Plasma- und Phagosommembran muss durch Kationen ausgeglichen werden. Im Zytosol sammeln sich Protonen in Form von Wasserstoffionen (H⁺) an, die nach der Trennung der Elektronen von NADPH übrigbleiben und außerdem bei der Produktion von NADPH durch den Hexose-Monophosphat-Shunt entstehen, und extrazellulär sezerniert werden [86]. Der Inhalt des Phagosoms wird zunächst leicht alkalisch (pH = 7,8), im weiteren Verlauf sinkt der pH-Wert auf ca. 5,8 [87]. Die initiale Alkalisierung trotz der Fusion mit dem sauren Inhalt der Granula kommt durch die H⁺-verbrauchende Reaktion von O₂⁻ zu H₂O₂ zustande [87, 88]. Dies zeigt auch, dass ein Einstrom von Protonen nicht für den Ladungsausgleich über die Membran verantwortlich sein kann, da der pH-Wert im Phagosom dann neutral bleiben oder sinken würde. Es strömen positiv geladene Kalium-Ionen (K⁺) in die Vakuole und lösen die kationischen Proteasen der Granula aus ihrer Bindung mit der Proteoglykan-Matrix [89]. Die Aktivität dieser Enzyme ist bei dem erzeugten, leicht alkalischen pH-Wert am höchsten [89]. Abb. 5 veranschaulicht die Vorgänge im Phagosom.

Um eine effektive Bekämpfung von Bakterien und anderen Pathogenen zu ermöglichen, ist also ein Zusammenspiel von NADPH-Oxidase und Enzymen der Granula essentiell, da die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies alleine nicht ausreicht [62].

Darüber hinaus modulieren ROS die Prozessierung und Ausschüttung inflammatorischer Zytokine (IL-1 β) durch PMN [90].

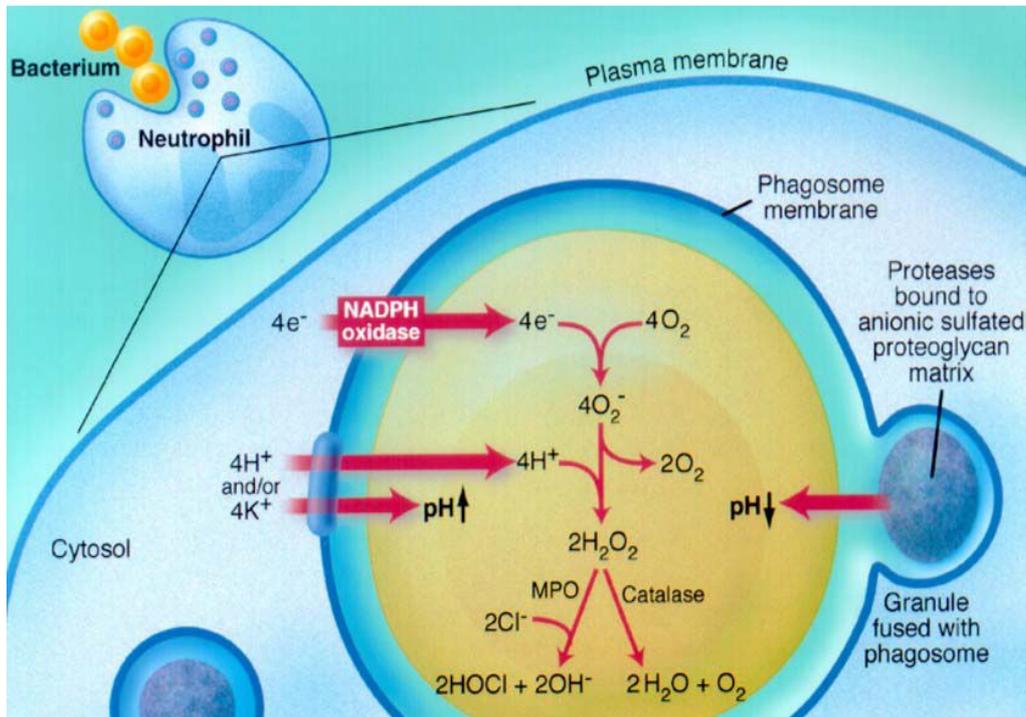


Abb. 5: Reaktionen und pH-Veränderungen im Phagosom.

Es strömen H^+ - und K^+ -Ionen über die Membran in das Phagosom. Trotz der Fusion mit dem sauren Inhalt der Granula kommt es zu einer initialen Alkalisierung des Milieus im Phagosom.

Cl - Chlorid; H - Wasserstoff; H_2O_2 - Wasserstoffperoxid; HOCl - Hypochloridsäure; K - Kalium; MPO - Myeloperoxidase; NADPH - Nikotinamidsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat; O_2 - molekularer Sauerstoff. Aus [91]. Verwendet mit Genehmigung von AAAS.

1.5 Polytrauma

In Deutschland ereigneten sich im Jahr 2014 laut Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAUA) ca. 9,77 Millionen Unfälle, bei denen 22.717 Menschen starben. Davon sind 971 Menschen (4,3 %) bei Arbeitsunfällen ums Leben gekommen, 42 Menschen (0,2 %) bei Schulunfällen, 3.581 Menschen (15,8 %) bei Verkehrsunfällen (inklusive der Arbeits- und Schulunfälle im Verkehr), 9.044 Menschen (30,0 %) bei Unfällen im Hausbereich und 9.577 Unfalltote (42,2 %) gab es in anderen Bereichen, meist in der Freizeit [92]. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei Unfällen in Deutschland jährlich ungefähr 35.000 Menschen schwer verletzt werden [93]. Im Jahr 2015 starben ca. 11 % der Patienten, die eine Klinik erreichten, die Mehrheit der Überlebenden ist dauerhaft beeinträchtigt [94]. 34% fühlen sich in ihrem täglichen

Leben eingeschränkt, mehr als die Hälfte (53 %) auch bei sozialer Interaktion [95]. Etwa jeder zweite kann nicht wieder an seinem ehemaligen Arbeitsplatz eingesetzt werden [96]. Jeweils 46% leiden nach der Verletzung unter Schmerzen oder Funktionseinschränkungen. Eine große Rolle spielen mentale Beeinträchtigungen; es treten häufig Depressionen (42%) und Ängstlichkeit (48%) auf, 53% entwickeln eine posttraumatische Belastungsstörung (PTBS) [95].

Abgesehen von den persönlichen Schicksalen werden erhebliche Kosten für die Gesellschaft verursacht. Laut Daten der Bundesanstalt für Straßenwesen verursacht jeder Schwerstverletzte volkswirtschaftliche Kosten von mehreren 100.000 €, pro Patient fallen allein ca. 15.000 € Behandlungskosten an [94, 97]. Aus den beachtlichen physischen und psychischen Beeinträchtigungen des Betroffenen sowie seiner Angehörigen und dem großen finanziellen Schaden ergibt sich die hohe Relevanz des Themas für die medizinische Forschung.

Als Schwerverletzter gilt in der Traumatologie ein Patient mit potenziell lebensgefährlichen Verletzungen infolge eines Traumas. Zu diesen gehören auch polytraumatisierte Patienten, die definitionsgemäß mehrere Verletzungen in verschiedenen Körperregionen aufweisen, von denen eine allein oder die Summe aller Verletzungen lebensbedrohlich ist. Zur objektiven Messung der Verletzungsschwere wurden unter anderem die *Abbreviated Injury Scale* (AIS) und der darauf aufbauende *Injury Severity Score* (ISS) eingeführt [98]. Sie beruhen auf der Bewertung des Schweregrades der Verletzungen in den einzelnen Körperregionen, die anschließend zusammengefasst werden (eine detaillierte Beschreibung der Berechnung folgt unter 2.2.5). Es gibt verschiedene Ansätze zur objektiven Definition eines Polytraumas; gemeinsam haben sie, dass jeweils ein ISS-Punktwert von 16 oder höher erreicht wird und relevante Verletzungen in mind. zwei verschiedenen Körperregionen vorliegen [99, 100].

1.6 Systemisches inflammatorisches *Response*-Syndrom (SIRS) und *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* (MODS)

Eine systemische Entzündung kann im Körper durch verschiedene Ereignisse ausgelöst werden. Es gibt infektiöse und nicht-infektiöse Ursachen. Systemische Entzündungen infektiösen Ursprungs gehen mit der Besiedelung des Körpers durch Mikroorganismen einher und sind unter dem Begriff Sepsis bekannt. Zu den nicht-infektiösen Ursachen gehören Verbrennungen, Pankreatitis, massive Blutungen, Ischämien und Traumen. Dieses Krankheitsbild wird - unabhängig von der Genese - Systemisches Inflammatorisches *Response*-Syndrom (SIRS) genannt [101]. Definitionsgemäß müssen für die Diagnose eines SIRS mind. zwei der folgenden klinischen Symptome auftreten:

- Hypo- (< 36 °C) oder Hyperthermie (> 38 °C)
- Tachykardie (> 90 Schläge/min)
- Tachypnoe (> 20 Atemzüge/min oder PaCO₂ < 32 mmHg)
- Leukopenie (< 4.000/μl) oder -zytose (> 12.000/μl) [101]

Eine Sepsis wurde lange als SIRS bei vorliegender Infektion bezeichnet. Die 2016 neu aufgestellte Definition der Sepsis [102] baut allerdings nicht mehr darauf auf. Eine Sepsis wird nun als „lebensbedrohliche Organdysfunktion, welche durch eine dysregulierte Immunantwort der Patienten auf eine Infektion verursacht wird“ [103] definiert. Die Organdysfunktion wird anhand des *Sequential (oder Sepsis-related) Organ Failure Assessment* (SOFA)-Score bemessen. In diesen Score fließen der respiratorische, neurologische und kardiovaskuläre Zustand sowie die Funktion von Leber, Niere und der Blutgerinnung ein [103, 104]. Eine ausführliche Erläuterung der Berechnung des SOFA-Scores erfolgt in Kapitel 2.3. Bei einer Sepsis muss eine „akute Veränderung ≥ 2 Punkte im Gesamt SOFA-Score“ vorliegen [103]. Ein Screening kann durch einen abgespeckten SOFA-Score, den sogenannten *quick SOFA (qSOFA)*, erfolgen. Dabei legen eine Atemfrequenz von > 21/min, eine veränderte Vigilanz und ein systolischer Blutdruck < 101 mmHg das Vorliegen einer Sepsis nahe. Ist der mittlere arterielle Druck (MAP) ohne Vasopressoren unter 65 mmHg und steigt das

Laktat im Serum auf über 2 mmol/l, wird von einem septischen Schock gesprochen [102, 103].

Die Prävalenz von SIRS ist hoch: Laut einer Studie von Talmor et. al. [105] entwickeln ungefähr 50% der Patienten, die auf einer Intensivstation überwacht werden müssen, Zeichen des Syndroms. Bei 35% dauert die Erholung länger als 24 h. Je mehr SIRS-Kriterien bei den Patienten zutreffen, desto länger ist der Aufenthalt auf der Intensivstation und umso höher sind die Rate an Organdysfunktionen sowie die Sterblichkeit. Es überleben fast alle Patienten, die keines der oben genannten Symptome zeigen, während von denjenigen, die alle vier über mind. 3 d aufweisen, 45% im Verlauf sterben. Häufigkeit, Dauer und Ausmaß des SIRS ihrerseits korrelieren mit der Größe des vorangegangenen Traumas [106]. Auch in dieser Studie [106] zeigt sich eine Korrelation der Schwere und Dauer des Syndroms mit postoperativen Komplikationen bis hin zum Multiorganversagen (MOV) oder Tod.

Ein proinflammatorisches Zytokin ist Interleukin-1 β (IL-1 β). Wie beim synergistisch wirkenden Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) wird die Freisetzung durch Infektion, Trauma, Ischämie, aktivierte T-Zellen oder Toxine getriggert und stellt den lokalen Beginn der entzündungsfördernden Kaskade dar [107]. Es konnte gezeigt werden, dass IL-1 β sowohl bei sterilen, verletzungsbedingten Entzündungen, wie sie bei einem Polytrauma vorliegen, als auch bei infektiionsbedingten Läsionen eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von PMN spielt [108, 109]. Ohne IL-1 β ist eine gerichtete Migration zur Verletzung hin nicht möglich [109]. IL-1 β bewirkt unter anderem auch die Ausprägung von Adhäsionsmolekülen am Endothel, an denen die im Blutstrom zirkulierenden Leukozyten anhaften können [110]. Außerdem stimuliert das Zytokin an Endothelzellen die Expression bzw. Sekretion von weiteren inflammatorischen Mediatoren wie *platelet-activating factor* (PAF), *procoagulant activity* (PCA) und Prostaglandinen [111-114]. Die Überexpression von IL-1 β führt zu einer systemischen Entzündungsreaktion mit einer stark erhöhten Anzahl zirkulierender PMN und einer ungewöhnlichen Verteilung dieser im ganzen Körper [109]. Über die verschiedenen Effekte kann IL-1 β auch eine starke Hypotension bis hin zum Schock auslösen und Organschäden verursachen [115].

Zu den Chemokinen, die im Rahmen der Entzündungsreaktion von den Endothelzellen

ausgeschüttet werden, gehört auch Interleukin-8 (IL-8), welches eine starke chemotaktische Wirkung auf PMN hat und diese somit an den Ort der Entzündung rekrutiert [116]. Da PMN unter den Leukozyten die höchste IL-8-Rezeptordichte aufweisen, gilt das Signal besonders ihnen [117]. Weiterhin beeinflusst IL-8 das *priming* der PMN positiv und verstärkt somit die Antwort auf die ROS-Bildung stimulierende Substanzen [51, 118]. Außerdem inhibiert IL-8 die spontane sowie die TNF- α -induzierte Apoptose, wodurch die Lebensdauer der reifen Granulozyten verlängert wird [119]. Auch PMN selbst schütten stressinduziert proinflammatorische Zytokine aus, darunter TNF- α , IL-1 β und IL-8 [90, 120]. Bei Patienten mit einer Sepsis im Sinne eines SIRS mit nachgewiesener Infektion ist die Migration von PMN an den Ort einer sekundären Inflammation stark vermindert. Außerdem ist bei diesen Patienten die phagozytische Aktivität der ins Gewebe eingewanderten PMN gegenüber der zirkulierenden PMN viel geringer, während die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach der Exsudation weiterhin gesteigert ist [121]. Diese Erkenntnisse liefern einen Beitrag zur Erklärung der Anfälligkeit für sekundäre Infektionen septischer Patienten.

Bei Verletzungen beschränkt sich die Reaktion des Körpers nicht auf eine lokale Entzündungsreaktion. Es folgt eine generelle Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit der Verteilung von inflammatorischen Botenstoffen im ganzen Organismus und es kommt zum klinischen Bild des SIRS [122]. In diesem Zuge ist die Anzahl der PMN im Blutstrom erhöht und deren Aktivität und die Bildung von ROS sind durch *priming* erhöht [123-125]. Zudem ist ihre Adhäsion an Endothelzellen vermehrt [125]. Dem entgegengesetzt antwortet das adaptive Immunsystem: Die Anzahl zirkulierender T-Zellen sowie deren Sekretion proinflammatorischer Mediatoren ist vermindert [123]. Dies kann Teil eines Kompensatorischen Antiinflammatorischen *Response*-Syndroms (CARS) sein. Ein CARS zeichnet sich auch durch eine reduzierte Fähigkeit zur Antigen-Präsentation bei Makrophagen aus [124, 126].

Die Entstehung von Dysfunktionen primär nicht betroffener Organe durch die überschießende proinflammatorische Immunantwort ist mit PMN assoziiert [127]. Die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und erhöhte Gefäßpermeabilität durch Interaktion der PMN mit dem Endothel und die in den Granula enthaltenden Enzyme können erhebliche Organschäden, z. B. Ödeme, Hämorrhagien und Nekrosen in der Lunge und der Leber, verursachen [4, 128, 129].

Ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischer Immunantwort scheint der Hauptfaktor für die Entstehung eines *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* (MODS) zu sein [130]. MODS bezeichnet den Zustand veränderter Funktion von Organen, die primär nicht erkrankt/verletzt waren, bei kritisch kranken Patienten, durch den die Homöostase ohne Intervention nicht aufrechterhalten werden kann [101]. Dies kann leichte Einschränkungen in der Organfunktion bis hin zum kompletten Organversagen bedeuten. Synonym wird oft auch der Begriff Multiorganversagen (MOV) verwendet. Ungefähr ein Viertel der schwerverletzten Trauma-Patienten entwickelt ein MODS [131, 132]. Zu den Risikofaktoren hierfür zählen ein höheres Alter der Patienten (> 55 Jahre), schwerere Verletzungen (ISS > 24) und größere Mengen an Bluttransfusionen in den ersten 12 h nach Ankunft im Krankenhaus (> sechs Einheiten) [131, 133]. Bei Patienten mit einem MODS treten häufiger Infektionen und andere Komplikationen auf, sie müssen im Schnitt länger auf der Intensivstation bleiben und haben eine höhere Mortalitätsrate [3, 133]. Je mehr Organe betroffen sind, desto höher ist die Sterblichkeit [133, 134]. Das MODS stellt bei Traumapatienten, die ihre Verletzungen initial überleben, die häufigste Todesursache dar [131, 132].

Je nach Beginn wird zwischen dem frühen MODS (innerhalb der ersten 3 d nach Trauma) und dem späten MODS (nach > 72 h) unterschieden [133]. Für das frühe MODS sind hauptsächlich PMN verantwortlich, die zur durch das eigentliche Trauma hervorgerufenen, direkten Immunantwort gehören [3]. Die bereits wenige Stunden nach dem Trauma vermehrt im Blut zirkulierenden PMN sind im Hinblick auf ROS-Bildung und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine *geprimt* und aktiviert [3, 135-137]. Eine besonders hohe Aktivität der PMN ist besonders vom zweiten bis zum fünften Tag nach dem Trauma zu sehen [138]. Zu einem späten MODS kommt es nach der *second hit*-Theorie durch ein erneutes „Trauma“, z. B. eine Operation oder eine Infektion, in dieser vulnerablen Phase [133, 139]. Dieses Trauma verstärkt das *priming* und die zytotoxische Aktivität der PMN, ihre Einwanderung in Organgewebe und die Sekretion von Entzündungsmediatoren [138, 140]. Durch einen *second hit* werden allerdings nicht nur pro-, sondern auch antiinflammatorische Zytokine ausgeschüttet [141].

Es werden auch regulär antiinflammatorische Mediatoren freigesetzt [142]. Die Phagozytose kann bei PMN nach einem Trauma mit schweren Verletzungen vermindert sein, woraus ebenfalls eine gewisse Anfälligkeit für Infektionen und septische

Komplikationen im weiteren Verlauf resultiert [138, 143]. Ab dem dritten Tag nach dem Trauma sezernieren PMN vermehrt der Entzündung entgegenwirkende Zytokine [137]. Ein stark ausgeprägtes CARS ist ebenso gefährlich wie das SIRS. Es kann zur Immunparalyse mit Reduktion der Funktion verschiedener Leukozyten führen und die Abwehr von Infekten verhindern sowie die Mortalität erhöhen [124, 142]. Die Organfunktion kann mithilfe des SOFA-Score evaluiert werden [104].

Die Möglichkeiten zur Therapie von SIRS und MODS sind bisher sehr beschränkt. Beim Ausfall der Funktion eines Organs, kann diese apparativ ersetzt werden; im Fall der Niere mit Hämodialyse bzw. Hämodiafiltration [144]. Ist die Lunge durch eine generalisierte Entzündung geschädigt, hat sich eine protektive Beatmung mit niedrigem Tidalvolumen und erhöhtem endexpiratorischem Druck in der Lunge als prognostisch günstig erwiesen [145]. Weiterhin ist es wichtig, den Kreislauf ggf. mit Katecholaminen zu unterstützen und die Ernährung – zur Not parenteral - fortzuführen. Ein pharmakologischer Therapieversuch mit Dexamethason, einem Glukokortikoid, konnte den Zustand der SIRS-Patienten nur kurzzeitig bessern [146].

Da noch keine adäquate, kurative Therapie des SIRS gefunden wurde, ist es überaus wichtig, die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen weiter zu erforschen und besser zu verstehen, damit betroffene Patienten in Zukunft vor einem Tod durch Multiorganversagen bewahrt werden können.

1.7 Ziele der Arbeit

Wie beschrieben spielt die Reaktion des Immunsystems eine wichtige Rolle für die Regeneration nach einem schweren Trauma. In dieser Arbeit wurden einige Aspekte dieser Reaktion genauer beleuchtet, um detailliertere Erkenntnisse darüber zu erlangen, welche Vorgänge in solch einer Situation ablaufen. Hierbei wurden speziell die PMN beobachtet. Es wurde angenommen, dass sie durch das schwere Trauma sehr stark aktiviert werden und sie gegenüber PMN gesunder Probanden eine extrem hohe Aktivität aufweisen. Hierbei sollte nicht nur der Status unmittelbar nach dem Trauma eruiert werden, sondern auch der Verlauf beurteilt werden können. Deshalb wurden die Messungen am Tag des Traumas und auch am fünften und zehnten Tag nach dem Ereignis durchgeführt.

PMN wurden aus dem Blut von definitionsgemäß polytraumatisierten Patienten isoliert. Anschließend wurden die aufgenommenen Bakterien quantitativ bestimmt. Die Phagozytose ist wichtig für die Abwehr eindringender Erreger und zur Aufnahme von Resten anderer, toter Zellen [24]. Weiterhin werden PMN durch den Vorgang der Phagozytose *geprimt* und somit eine Entzündungsreaktion eingeleitet und der *respiratory burst* stimuliert [48, 59].

Zudem wurde das Ausmaß des *oxidative burst* auf verschiedene Stimuli hin erfasst. Dieses ist insofern wichtig, als dass hierbei auch Proteasen aus den Granula der PMN freigesetzt werden und diese gleichermaßen toxisch auf phagozytierte Mikroorganismen und körpereigene Zellen des umliegenden Gewebes wirken [4, 62, 89].

Diese Mechanismen können – je nach Aktivierungsgrad - den Körper also schützen, dem Heilungsprozess entgegenwirken oder, schlimmer noch, das Trauma sogar verstärken. Deshalb ist es sehr wichtig den Verlauf nach einer schweren Verletzung näher zu untersuchen. Mit diesen Erkenntnissen kann nach Möglichkeiten gesucht werden, die Aktivität der PMN dahingehend zu modulieren, dass Patienten in Zukunft bessere Regenerationsbedingungen haben.

Weiterhin wurde die Kommunikation der PMN mit der Umgebung untersucht, indem die Genexpression der Zytokine IL-1 β und IL-8 gemessen wurde. IL-1 β und IL-8 sind Zytokine, die bei der Rekrutierung von PMN in das Gewebe benötigt werden [108-110, 116]. Durch das *priming* der Zellen tragen beide Mediatoren auch zu einer verstärkten Phagozytose-Aktivität und ROS-Freisetzung bei [51, 52, 118]. Es ist demnach hilfreich zu wissen, wie sich die Bildung nach einem schweren Trauma verhält, um regulatorisch eingreifen zu können. Durch Hemmung der Expression oder Ausschüttung der entsprechenden Zytokine könnte die Entzündungsreaktion eingedämmt und der Körper vor Schaden bewahrt werden.

Es muss bemerkt werden, dass in dieser Arbeit nur ein Ausschnitt der immunologischen Reaktion auf ein Polytrauma dargestellt wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Biologische Sicherheitswerkbank	Euro Flow EF/S	Clean Air
Biologische Sicherheitswerkbank	Herasafe KS 18	Thermo Electron Corporation
Durchflusszytometer	FACS Calibur	Becton Dickinson
Inkubator	Hera Cell 150	Thermo Electron Corporation
Lichtmikroskop	Axiovert 40 C	Zeiss
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
Pipette	Pipetman	Gilson
Pipetten	0,5-10 µl/10-100 µl/200 µl/1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe	Accujet pro	Brand
Pipettierhilfe	Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte
<i>Real Time</i> PCR System	7300 Real Time PCR System	Thermo Fisher Scientific
Spectrophotometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific
Thermozykler	MyCycler	BioRad
Wasserbad	Typ WB 20	P-D Industriegesellschaft mbH
Zählkammer nach Neubauer	Assistent	Karl Hecht
Zentrifuge	Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 16 R	Thermo Fisher Scientific

2.2 Verbrauchsmaterialien

2.2.1 Labormaterialien

Tabelle 2: Labormaterialien

Labormaterial	Kennzeichen	Hersteller
Blutentnahme-Adapter		Becton Dickinson
Blutentnahme-Röhrchen mit Heparinzusatz		Becton Dickinson
Blutentnahme-Röhrchen zur Serumisolation		Becton Dickinson
<i>Butterfly</i> -System	Vacutainer	Becton Dickinson
Stripetten	5,0 ml /10,0 ml /25,0 ml	Costar
Eisbad mit Deckel		
Rundbodenröhrchen	Rundbodenröhrchen, Polystyrol	Falcon, Corning Science
Flasche mit Deckel	1000 ml	
Pipetten	0,5-10 μ l/10-100 μ l/100- 1000 μ l	Eppendorf Research und Reference
Pipettenspitzen		Eppendorf, StarLab
Reaktionsgefäße	0,5/1,5/2,0 ml	Eppendorf
Spritze	2 ml	Braun
Zentrifugenröhrchen	CELLSTAR Centrifuge Tube, 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One

2.2.2 Reagenzien

Tabelle 3: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Ammoniumchlorid, 0,83 %	Sigma
Aqua dest.	
Aqua, molekularbiologisch rein	5PRIME

Chloroform	Sigma
<i>DEPC treated water</i>	Invitrogen
Dulbecco's PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrome Ag
Ethanol	Merck
FBS (<i>Foetal Bovine Serum</i>) Gold	PAA
HES (Hydroxyethylstärke) 10 %	Griffols
Isopropanol	Sigma
Kochsalzlösung, physiologisch (0,9 %)	DeltaSelect
Oligo dT15	Sigma
Pen-Strep	Invitrogen
<i>Percoll separating solution</i>	Biochrom
<i>Power SYBR Green</i>	Applied Biosystems
<i>Primer IL-1β, IL-8</i>	Sigma
<i>Random Primers (octamers)</i>	Sigma
RNAse Inhibitor 2500 U	Ambion
RPMI-1640-Medium	Biochrome Ag
Trizol	Sigma
Trypanblau	Sigma

2.2.3 Lösungen

Tabelle 4: Lösungen

Lösung	Komponenten	Hersteller
Lyselösung	0,83 % Ammoniumchlorid (8,29 g) 0,1 % KHCO ₃ (1,00 g) 0,004 % EDTA (0,04 g) ad 1000 ml H ₂ O	Universitätsklinikum Düsseldorf Zentralapotheke
Zellkultur-Medium	RPMI-1640-Medium 1% Pen-Strep	Laboreigene Herstellung

2.2.4 Kits

Tabelle 5: Kits

Kit	Hersteller
DNA-free Kit	Ambion
Omniscript RT Kit	Qiagen
Phagoburst	Glycotope Biotechnology
Phagotest	Glycotope Biotechnology

2.2.5 Primer

Tabelle 6: *Primer*

<i>Primer</i>	Sequenz
Oligo dT15	TTTTTTTTTTTTTTTT
IL-1 β forward primer template	AGGGCCAATCCCCAGCCCTTT
IL-1 β reverse primer template	GCCGTGGTTTCTGTCAGGCGG
IL-8 forward primer template	GAGTGGACCACACTGCGCCA
IL-8 reverse primer template	TCCACAACCCTCTGCACCCAGT

2.3 Probanden

Für diese Arbeit wurde das Blut von polytraumatisierten Patienten verwendet (ISS > 16). Bedingung für die Teilnahme an der Studie war zudem ein Mindestalter von 18 Jahren. Patienten mit immunmodulatorischer Vormedikation, isoliertem Schädel-Hirn-Trauma (SHT), und solche, die innerhalb des Untersuchungszeitraumes verstorben sind oder die Teilnahme an der Studie abgelehnt hatten, wurden ausgeschlossen. Vorbestehende Erkrankungen spielten bei der Auswahl zur Teilnahme an der Studie keine Rolle. Das Kollektiv bestand aus 18 polytraumatisierten Patienten, die in einem Zeitraum von 14 Monaten am Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD) aufgenommen und behandelt wurden.

Es erfolgte eine mündliche Aufklärung der Patienten durch ärztliche Mitarbeiter des UKD mit anschließender schriftlicher Einwilligung der Patienten. Die Studie wurde im

Vorfeld von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (# 3412). War der Patient aufgrund seiner Verletzungen nicht einwilligungsfähig, wurden die Angehörigen aufgeklärt und entschieden über die Teilnahme an der Studie. Waren auch keine Angehörigen erreichbar oder vorhanden, erklärten ein unabhängiger Arzt und ein weiterer Zeuge die Einhaltung der Studienkriterien für bindend, wie es bei der „*Physician Authorization Form*“ praktiziert wird. Lehnte der Patient bei wiederhergestellter Einwilligungsfähigkeit die Teilnahme an der Studie ab, wurden die Proben verworfen und die erhobenen Daten vernichtet. Ebenso wurde verfahren, wenn ein Patient bzw. seine Angehörigen die Zustimmung zur Teilnahme an der Studie zurückzogen.

Den Patienten wurde nach dem Ereignis, das zu ihrer schweren Verletzung führte, am Tag 1, 5 und 10 Blut entnommen und untersucht. Der Tag, an dem die Patienten die Verletzungen erlitten, galt hierbei als Tag 0. Bezüglich des Zeitpunktes der Blutentnahme (BE) wurde ein Spielraum von plus/minus 24 h (1 d) eingeräumt.

Für die Patienten wurden zwei verschiedene Scores berechnet, die die Schwere der Verletzung und die (Dys-)Funktion verschiedener Organe angeben. Zunächst wurde der *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA)-Score verwendet [104]. Hierbei wird die Lungenfunktion anhand des Horowitz-Quotienten (arterieller Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) geteilt durch inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO_2)), das zentrale Nervensystem mithilfe der *Glasgow Coma Scale* (GCS) und das kardiovaskuläre System über den mittleren arteriellen Druck (MAP) und den Bedarf an Katecholaminen beurteilt. Der GCS-Wert wird entsprechend der motorischen sowie verbalen Antwort und dem Öffnen der Augen auf Reize ermittelt und kann Werte von drei bis 15 Punkten annehmen. Weiterhin fließen die Bilirubin-Konzentration im Serum als Korrelat der Leberfunktion, die Thrombozytenzahl im Blut zur Bewertung der Gerinnung und der Kreatininwert im Serum zur Beurteilung der Nierenfunktion ein. Tabelle 7 zeigt die Zuordnung klinischer Parameter zu SOFA-Score-Punkten. Es wurden klinische Angaben des behandelnden ärztlichen Personals bzw. Blutwerte als Grundlage verwendet. Der SOFA-Score wurde an jedem Tag, an dem eine Blutabnahme mit anschließender Untersuchung stattfand, bestimmt.

Tabelle 7: Aufschlüsselung des SOFA-Scores

Respiratorisches System	
PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	SOFA-Score-Punkte
< 400	1
< 300	2
< 200 und maschinell beatmet	3
< 100 und maschinell beatmet	4
Zentrales Nervensystem	
GCS	SOFA-Score-Punkte
13-14	1
10-12	2
6-9	3
< 9	4
Kardiovaskuläres System	
MAP und Katecholaminbedarf	SOFA-Score-Punkte
MAP < 70 mmHg	1
Dopamin ≤ 5 µg/kg/min o. Dobutamin (jede Dosierung)	2
Dopamin 5,-15 µg/kg/min o. Adrenalin ≤ 0,1 µg/kg/min o. NA ≤ 0,1 µg/kg/min	3
Dopamin > 15 µg/kg/min o. Adrenalin > 0,1 µg/kg/min o. NA > 0,1 µg/kg/min	4
Leberfunktion	
Bilirubin im Serum (mg/dl)	SOFA-Score-Punkte
1,2 - 1,9	1
2,0 - 5,9	2
6,0 - 11,9	3
> 12,0	4

Gerinnung	
Thrombozyten im Blut ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	SOFA-Score-Punkte
< 150	1
< 100	2
< 50	3
< 20	4
Nierenfunktion	
Kreatinin im Serum (mg/dl)	SOFA-Score-Punkte
1,2 - 1,9	1
2,0 - 3,4	2
3,5 - 4,9	3
> 5,0	4

Vergabe der SOFA-Score-Punkte anhand klinischer Parameter [103]

PaO₂ - Arterieller Sauerstoffpartialdruck; FiO₂ - Inspiratorische Sauerstoffkonzentration; SOFA - *Sequential Organ Failure Assessment*; GCS - *Glasgow Coma Scale*; NA - Noradrenalin

Außerdem wurde die Verletzungsschwere mithilfe des *Injury Severity Score* (ISS) bestimmt [98]. Hierbei werden zunächst die jeweiligen Verletzungen der 6 Körperregionen (Kopf und Nacken, Gesicht, Brustkorb, Bauchraum und Organe im Becken, Extremitäten und Beckenring, Externe Verletzungen) auf der *Abbreviated Injury Scale* (AIS) in 6 Schweregrade (AIS98-Codes) von Gering bis Maximal (= nicht behandelbar) eingeteilt werden. Das Quadrat der Summe der höchsten 3 AIS98-Codes ergibt den ISS. Er kann maximal einen Wert von 75 annehmen, ab einem Wert von 16 entspricht die Verletzungsschwere einem Polytrauma. Der ISS wurde bei jedem Patienten einmalig anhand der initialen Verletzungen berechnet.

Die Daten der Patienten wurden pseudonymisiert gespeichert und werden spätestens nach zehn Jahren gelöscht werden. Sie finden ausschließlich Verwendung in der wissenschaftlichen Auswertung der Versuchsreihen und, anonymisiert, in der wissenschaftlichen Veröffentlichung der Ergebnisse.

Als Referenzwerte wurden die gleichen Untersuchungen mit dem Blut von gesunden Probanden, die sich freiwillig zur Verfügung gestellt haben, durchgeführt.

2.4 Blutentnahme

Den Patienten wurde Blut zur Isolierung von PMN entnommen. Dazu wurde ein bereits vom Personal des UKD gelegter arterieller Katheter mit Drei-Wege-Hahn genutzt. Zuerst wurde mithilfe einer 2-ml-Spritze aus dem arteriellen Schenkel des Katheters 2 ml Flüssigkeit entnommen bis unverdünntes Blut angesogen wurde. Anschließend wurde je ein BE-Röhrchen über die Adapter mit dem Katheter verbunden und es wurden ein Röhrchen mit Heparinzusatz mit 5 ml Blut und ein Röhrchen zur Serumisolation mit 2,5 ml Blut gefüllt. Alternativ wurde den Patienten in gleicher Art und Weise Blut aus einem ebenfalls bereits angelegten Zentralvenösen Katheter (ZVK) entnommen.

Den gesunden Probanden wurde das Blut nach Punktion oberflächlicher Armvenen über ein *Butterfly*-System mit entsprechendem Adapter entnommen. Hier wurden zwei Röhrchen mit Heparinzusatz mit je 5 ml Blut und ein Röhrchen zur Serumisolation mit 2,5 ml Blut gefüllt.

2.5 Herstellen einer reinen Granulozyten-Population

Die Isolation der PMN erfolgte aus humanem Vollblut. Zunächst wurden 5 ml Percoll *separating solution* mit 3,4 ml 0,9 %-iger NaCl-Lsg. in einem 15-ml-Zentrifugenröhrchen verdünnt und durch Kippen vermischt. Darauf wurden vorsichtig 5 ml Blut geschichtet. Nach 25 min Zentrifugation bei 2000 rpm und 17 °C ohne Bremse lagerten sich polymorphkernige Zellen und Erythrozyten im Pellet ab. Darüber befanden sich aufsteigend eine Schicht Percoll-Lösung, mononukleäre Zellen und eine Schicht aus Thrombozyten und Plasmabestandteilen. Nach Entnahme der oberen drei Schichten mit einer Glaspipette wurde das Pellet in wenigen ml Lyselösung resuspendiert, in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt, dieses mit Lyselösung aufgefüllt und für 7-8 min im Eisbad inkubiert, bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1500 rpm und 17 °C abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Nun wurden die Zellen gewaschen, indem sie zunächst in 50 ml PBS resuspendiert, dann erneut für 5 min bei 1500 rpm und 17 °C abzentrifugiert wurden und der Überstand abgegossen wurde.

2.6 Bestimmung der Zellzahl

Nach Resuspendieren des Pellets in ca. 5 ml PBS wurden 10 µl der Zelllösung entnommen und im Verhältnis 1:4 in einem 0,5-ml-Reaktionsgefäß mit Trypanblau gemischt. Mithilfe der Neubauerkammer konnte jetzt unter dem Lichtmikroskop die Zellzahl ermittelt werden. Pro Quadrant wurden die Zellen in je einem Quadrat gezählt und die Anzahl addiert. Das Ergebnis wurde dem Verdünnungsfaktor entsprechend vervierfacht und anschließend mit 10^4 multipliziert. So ergab sich die Zellzahl pro ml.

2.7 Bestimmung der Zytokinexpression

In den PMN, die aus am Tag 1, 5 und 10 nach Trauma entnommenem Vollblut isoliert wurden, wurde die Genexpression der Zytokine IL-1 β und IL-8 anhand der jeweiligen intrazellulären Boten-Ribonukleinsäure (mRNA)-Konzentration gemessen. Dabei wurden nur die Patienten eingeschlossen, bei denen an allen drei Tagen eine Blutabnahme erfolgte. Als Kontrolle wurden PMN aus Vollblutspenden von sechs gesunden Probanden herangezogen.

2.7.1 RNA-Isolation mit Trizol

Zunächst wurde die Ribonukleinsäure (RNA) aus den PMN isoliert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Trizol pro $5-10 \times 10^6$ Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert. Es folgte eine Inkubation der Proben bei Raumtemperatur (RT) für 5 min. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform pro Probe wurde diese 15 s kräftig gemischt. Die Proben wurden 10 min bei RT stehen gelassen, bis sich die Phasen deutlich voneinander getrennt hatten und wurden dann für 15 min bei 11.200 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die farblose, wässrige Phase mit der RNA wurde abgezogen und in ein frisches 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Es verblieb eine weiße Interphase, welche die DNA enthält, und eine rote Phenol-Chloroform-Phase mit Proteinen. Zu der RNA wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben, kräftig gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden 10 min bei 11.200 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 1 ml 75 %-igem Ethanol (EtOH) gewaschen. Nach 7 min Zentrifugation bei 8.800 rpm und 4 °C wurde der Waschschrift mit EtOH

wiederholt. Das Pellet wurde bei geöffnetem Reaktionsgefäß 5-10 min getrocknet und dann in 10 µl sterilem, RNase-freiem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde die RNA mithilfe des *DNA-free* Kits (Ambion) aufgereinigt. Dafür wurden pro Reaktionsgefäß 1 µl 10xDNase-Puffer und 1 µl rDNase zugegeben, vorsichtig gemischt und die Proben für 20-30 min bei 37 °C im Wärmeblock inkubiert. Dann kam 1 µl DNase-Inaktivierungslösung dazu und es wurde gründlich gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden 2 min bei RT inkubiert und der Inhalt zwischendurch gemischt. Nach Zentrifugieren bei 10.000 rpm und 4 °C für 2 min wurde der Überstand, der die RNA enthält, abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.7.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Quantifizierung der präparierten RNA erfolgte durch photometrische Messung bei 260 nm. Die Konzentration der RNA wird nach folgender Formel errechnet:

$$\text{RNA-Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = A_{260} \times 40$$

Die Zahl 40 stellt einen RNA-spezifischen Faktor dar, der einer Lösung mit optischer Dichte von 1 entspricht, die ungefähr 40 ng/µl RNA enthält.

Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 28 nm ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung, die sich im Bereich zwischen 1,8 und 2,0 befinden sollte.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde 1 µl Probe auf die untere Messfläche des Spectrophotometers pipettiert und die Absorption bei 260 nm gemessen.

2.7.3 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Unter Zugabe von *Primern*, Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und einem Puffer synthetisiert das Enzym Reverse Transkriptase zunächst einen zur RNA komplementären DNA-Einzelstrang und wandelt diesen dann in eine DNA-Doppelstrang um. *Primer* sind kurze Nukleotidsequenzen, sogenannte Oligonukleotide. Zum Schutz der RNA wird ein RNase-Inhibitor hinzugefügt [147].

Die Konzentration der RNA wurde mit sterilem, RNase-freiem Wasser auf 20 ng/µl

eingestellt. Für die Reverse Transkription wurden zu je 10 µl der Proben (200 ng) 2 µl 10 x RT-Puffer, 2 µl dNTP Mix (je 5 nM), 1 µl Olgo dT (20 µM), 2 µl Random Primers (8 bp, 100 µM), 0,25 µl RNase Inhibitor (40 U/µl), 0,25 µl Omniscript Reverse Transcriptase (4 U/µl) und 2,5 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt. Es folgte ein Inkubationsschritt für 60 min bei 37 °C in einem Thermozykler (MyCycler, BioRad). Die cDNA wurde bei - 20 °C gelagert.

2.7.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Es werden die DNA-Proben, die vervielfältigt werden sollen, 2 Oligonukleotid-*Primer*, Desoxyribonukleotidphosphate, DNA-Polymerase und ein Reaktionspuffer benötigt. Zunächst wird der DNA-Doppelstrang bei 90-95 °C thermisch denaturiert, wodurch einzelsträngige *Template*-DNA entsteht. Danach binden genspezifische *Primer* über Basenpaarungen bei ca. 50 °C an die komplementären Sequenzen der DNA. Nun erfolgt die Amplifikation des kompletten DNA-Doppelstranges durch hitzestabile DNA-Polymerase bei 72 °C. Dieser Zyklus wird nun so oft wiederholt, bis die gewünschte Menge DNA hergestellt worden ist. Die Durchführung erfolgt in Thermozyklern. Bei der *Real-time* PCR wird nach jedem Vervielfältigungszyklus die aktuelle Menge der synthetisierten Ziel-DNA angezeigt. Das Produkt der PCR wurde bei dieser Arbeit mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I* markiert, dessen Intensität direkt proportional zur Menge der gebildeten DNA ist. Dabei kann die DNA absolut oder relativ quantifiziert werden. Hier wurde die relative Quantifizierung im Verhältnis zu einem *housekeeping*-Gen angewendet, dessen Expression in den Zellen immer konstant ist. Als endogenes Referenztranskript diente 18S rRNA. [147].

Pro Zielgen und pro Probe wurde ein *Master Mix* aus den folgenden Reagenzien hergestellt: 12,5 µl *SYBR Green Master Mix 2x*, 0,75 µl *Primer Forward* (10 µM), 0,75 µl *Primer Reverse* (10 µM) und 7 µl RNase-freies Wasser. Der *Master Mix* wurde mit je 2 ng der Proben gemischt.

Der *Master Mix* für 18S rRNA bestand aus 12,5 µl *SYBR Green Master Mix 2x*, 0,25 µl *Primer Forward* (10 µM), 0,25 µl *Primer Reverse* (10 µM) und 8 µl RNase-freiem

Wasser pro Probe. Es wurden ebenfalls je 2 ng cDNA hinzugegeben.

Die Durchführung der PCR mit den Proben der Polytrauma-Patienten und gesunden Kontrollpersonen erfolgte jeweils im dreifachen Ansatz. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Es wurden entsprechende Mengen der *Master Mixe* für IL-1 β , IL-8 und 18S rRNA hergestellt. Je 21 μ l des jeweiligen *Master Mix* wurden auf die Platten pipettiert und jeweils 4 μ l Probe (= 2 ng cDNA) hinzugegeben. Zusätzlich wurde eine *non template control* (NTC) mit H₂O statt cDNA erstellt. Anschließend wurden die Platten bei 1000 rpm für 2 min abzentrifugiert und der Lauf direkt gestartet. Die *Real-time* PCR wurde in einem *Real-Time* PCR-System nach folgendem Protokoll durchgeführt: 10 min Enzymaktivierung bei 95 °C, 40 Zyklen mit je 15 s Denaturierung bei 95 °C und anschließend 60 s bei 60 °C für die DNA-Synthese.

Im Anschluss daran erfolgte die Datenanalyse. Sobald die produzierte Menge DNA einen definierten Schwellenwert überschritt, galt die Reaktion als positiv. Die Ct (*cycle threshold* = Zyklusschwelle) gibt die Anzahl der Zyklen an, die für einen positiven Ausschlag nötig ist, und ist umgekehrt proportional zur DNA-Ausgangsmenge in den Proben. Aus den 3 Ct-Werten jeder Probe, die sich aus der 3-fach-Bestimmung ergaben, wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Um die Genexpression in den Zellen der Patienten in Relation zu der Expression in den Zellen gesunder Probanden zu setzen, wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode angewendet [148]. Dabei wurde der Wert der Kontrollgruppe mit 1,0 gleichgesetzt.

2.8 Bestimmung der Phagozytose-Aktivität

11×10^6 frisch isolierte PMN wurden in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1500 rpm und 17 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 1100 μ l Zellkultur-Medium mit 10 %-igem autologem Serum resuspendiert, sodass die Dichte der Zellen schließlich 10^7 Zellen/ml betrug.

Die Phagozytose-Aktivität der Leukozyten wurde mithilfe des Kits Phagotest™ von Glycotope Biotechnology quantitativ bestimmt. Zum einen wird der Anteil an Zellen ermittelt, die Phagozytose betreiben, also ein oder mehrere Bakterien aufnehmen. Zum anderen wird die Aktivität der einzelnen Zellen gemessen, indem die Bakterienanzahl

pro Zelle bestimmt wird. Das Kit enthält Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-markierte *E. coli*-Bakterien, die mit Immunglobulinen (Fc-Molekülen) und Komplementfaktoren (C3b) opsonisiert wurden, und weitere für den Test nötige Reagenzien.

Die im Folgenden beschriebene Durchführung folgte abgesehen von wenigen Änderungen der vom Hersteller beigelegten Anleitung. Alle Inkubationsschritte fanden im Dunkeln statt. Es wurde mit doppelten Ansätzen gearbeitet. Statt Vollblut, wie angegeben, wurde eine Lösung aus isolierten PMN als Ausgangssubstanz verwendet. Die Messung erfolgte per Durchflusszytometrie.

Die Waschlösung wurde durch Lösen des mitgelieferten Salzes in 1000 ml Aqua dest. hergestellt und wurde bei RT aufbewahrt. In vier Rundbodenröhrchen wurden je 10^6 Zellen (entspricht je 100 μ l der nach der Isolation der PMN hergestellten Suspension) hineinpipettiert. Alle Röhrchen wurden für 10 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurden je 20 μ l der vorgekühlten und mit dem Reagenzglasschüttler gemischten Bakterienlösung, die FITC-markierte *E. coli*-Bakterien in einer Konzentration von 2×10^9 Bakterien/ml enthielt, in zwei der Rundbodenröhrchen pipettiert und der Inhalt einmal mit der Pipette gemischt. Diese beiden Röhrchen wurden für 10 min bei 37 °C im Wasserbad ohne Schütteln inkubiert, die beiden Negativkontrollen auf Eis. Die Phagozytose in den Proben mit Bakterien wurde gestoppt, indem die Röhrchen nach Ende der Inkubationszeit sofort auf Eis platziert wurden. Ab diesem Zeitpunkt wurden Negativ- und Positivproben gleich behandelt. Als nächstes wurden je 100 μ l der *quenching solution* hinzugegeben und die Röhrchen mit dem Reagenzglasschüttler gemischt. Diese blaue Lösung fängt die Fluoreszenz der auf der Oberfläche gebundenen Bakterien ab, sodass zwischen angelagerten und aufgenommenen *E. coli* unterschieden werden kann. Nun wurden die Zellen gewaschen, indem je 3 ml Waschlösung hinzugegeben und bei 1500 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen. Es wurden pro Röhrchen je 2 ml der 1:10 mit Aqua dest. verdünnten Lyselösung hinzugegeben und 20 min bei RT inkubiert. Die Lyselösung lysiert Erythrozyten und fixiert Leukozyten. Da nicht mit Vollblut sondern mit isolierten PMN gearbeitet wurde, war nur Letzteres relevant. Nach 5 min des Zentrifugierens bei 1500 rpm und 4 °C und Verwerfen des Überstandes folgte ein weiterer Waschschrift. Zuletzt wurden in jedes Röhrchen 200 μ l DNA-Färbelösung gegeben und die Proben für 10 min im Eisbad inkubiert. Die Färbelösung verhindert

Artefakte durch Aggregation von Bakterien oder Zellen. Die Messung der Phagozytose-Aktivität mit dem Durchflusszytometer erfolgte innerhalb von 60 min nach Beendigung des *Assays*.

2.9 Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (*oxidative burst*)

Die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) wurde mit dem Kit Phagoburst™ von Glycotope Biotechnology quantitativ bestimmt. Dieses Kit enthält die Stimulanzen N-Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), fluoreszierendes Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) und einige weitere Reagenzien, die im Folgenden beschrieben werden. Der Anteil der Zellen, die reaktive Sauerstoff-Spezies bilden, wurde darüber gemessen, wieviel DHR 123 insgesamt zu Rhodamin (R) 123 umgewandelt wird. Die Aktivität der NADPH-Oxidase in den PMN wird über die Menge an R 123 pro Zelle bestimmt.

Die Durchführung folgte bis auf wenige Änderungen der vom Hersteller beigefügten Anleitung. Alle Inkubationsschritte fanden im Dunkeln statt und die Ansätze wurden gedoppelt. Statt Vollblut, wie angegeben, wurde eine Lösung aus isolierten PMN als Ausgangssubstanz verwendet. Die Messung erfolgt per Durchflusszytometrie.

Die Waschlösung entsprach der des Phagotest™-Kits. Das DHR 123 wurde in 1 ml Waschlösung gelöst und für 20-30 min auf dem Schüttler inkubiert. Die hergestellte Lösung konnte bei - 20 °C für zwei Wochen aufbewahrt werden.

In sechs Rundbodenröhrchen wurden je 10^6 Zellen (entspricht je 100 μ l der nach der Isolation der PMN hergestellten Suspension) hineingegeben. In zwei der Röhrchen kamen je 20 μ l Waschlösung als Negativkontrolle. In die anderen Röhrchen wurden die Stimulanzen hinzugegeben, in zwei der Röhrchen je 20 μ l fMLP und in die anderen beiden Röhrchen jeweils die gleiche Menge PMA. Die beiden Stimulanzen sind zuvor jeweils im Verhältnis 1:200 mit Waschlösung verdünnt worden. Der Inhalt der Röhrchen wurde einmal mit der Pipette gemischt und dann für 10 min bei 37 °C im Wasserbad ohne Schütteln inkubiert. Als nächstes wurden in alle Röhrchen gleichermaßen 20 μ l der DHR 123-Lösung hineinpipettiert. DHR 123 ist ein

fluoreszierendes Substrat, das durch die von den Zellen gebildeten reaktiven Sauerstoff-Spezies zu R 123 oxidiert wird. Es folgte eine erneute Inkubation für 10 min bei 37 °C im Wasserbad. Nun wurden alle Proben mit 2 ml Lyselösung versetzt. Die Lyselösung entspricht der des Phagotest™-Kits. Sie wurde ebenfalls 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und stoppte die Reaktion des DHR. Der Inhalt der Röhren wurde mit dem Reagenzglasschüttler gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von je 3 ml Waschlösung wurde erneut abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen und je 200 µl DNA-Färbelösung hinzugegeben. Der Inhalt der Röhren wurde mit der Pipette gemischt und für 10 min im Eisbad inkubiert. Auch bei Phagoburst™ dient die DNA-Färbelösung zur Vermeidung von Artefakten durch Zell- oder Bakterienaggregation. Die Fluoreszenz des umgesetzten DHR Substrats wurde mittels Durchflusszytometrie innerhalb von 30 min nach Beendigung des Assays quantifiziert. Zusätzlich wurde dabei der prozentuale Anteil an ROS-produzierender PMN bestimmt.

2.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Analyse von Zellen, welches in der Biologie und der Medizin angewendet wird und mit dem Größe und Granularität, aber auch die Oberflächenstruktur der Zellen bestimmt werden können. Granularität beschreibt das Innere der Zelle, somit Menge und Inhalt eingeschlossener Vesikel [149]. Ebenfalls können Funktionen, wie hier die Phagozytose oder die Bildung von ROS, gemessen werden. Sogenannte *Fluorescence Actiated Cell Sorting* (FACS)-Geräte sind außerdem in der Lage, Zellen nach vorgegebenen Eigenschaften zu trennen [149]. Das FACS ist ein Markenname des Herstellers Becton-Dickinson (BD), der heutzutage allerdings allgemein als Begriff für die Durchflusszytometrie verwendet wird.

Bei der Durchflusszytometrie wird eine Einzelzellsuspension über eine Kapillare angesaugt und gelangt in die Durchflusszelle, eine Mikroküvette aus Glas oder Quarz. Dort passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl, durch den sie angeregt werden. Das Licht wird von den Zellen zum einen im flachen Winkel gebeugt, wobei dieses

Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) mit der Zellgröße korreliert. Des Weiteren wird die Ablenkung im rechten Winkel als Seitwärtsstreulicht (SSC = *Side Scatter*) gemessen und so die Granularität bestimmt [149]. Die Oberflächenstruktur von Zellen wird mithilfe der fluoreszenz-aktivierten Durchflusszytometrie analysiert. Dabei werden Oberflächenmoleküle der Zellmembran mit Antikörpern markiert, an welche Fluoreszenzstoffe gebunden sind. Auch der DNA-Gehalt einer Zelle kann mithilfe von Farbstoffen bestimmt werden, die extra- oder intrazellulär an die DNA binden. Zusätzlich zum Streulicht werden dann die Fluoreszenzfarben gemessen. Ein FACS-Gerät kann die Zellen anschließend noch sortieren, indem es sie in einzelnen Tropfen einschließt, die polarisiert werden und durch ein elektrisches Feld in verschiedene Gefäße gelangen. Bei der Auswertung der Daten können Schwellen und *gates* individuell gesetzt werden, damit nur die gewünschten Zellen betrachtet werden [149].

2.11 Statistik

Zur Auswertung der Daten wurden die Programme Microsoft Excel 2013 und GraphPad Prism 5 for Windows Version 5.01, 2007 verwendet. Es wurden alle Werte innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands vom Median in die Wertung eingeschlossen.

Bei der Prozessierung der Daten aus den Bestimmungen der Phagozytose-Aktivität und der Bildung von ROS wurden die Mediane verwendet. Um Unterschiede zwischen den Medianen festzustellen, wurde für alle Messzeitpunkte sowie für die Kontrollgruppe eine einfaktorielle *between-subjects* Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Als *post-hoc*-Verfahren kam *Dunn's Multiple Comparison Test* zur Anwendung, um im Fall einer durch die ANOVA detektierten globalen Signifikanz herauszufinden, auf welchen spezifischen Medianunterschieden diese begründet ist.

Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen wurden mit den SOFA-Score-Werten sowie mit den Leukozytenzahlen im Blut korreliert. Es wurde jeweils eine lineare Regression durchgeführt, um die Abweichung der Regressionsgeraden von Null zu messen. Das Maß der Korrelation wurde mithilfe von *Spearman's Rho*-Wert ermittelt.

Im Falle der Bestimmung der Expression von IL-1 β und IL-8 wurde mit den Mittelwerten \pm Standardfehler (SEM) der Ergebnisse weitergearbeitet. Auf die ANOVA

zur Detektion von Mittelwertunterschieden folgte *Newman Keul's Multiple Comparison Test* als *post-hoc*-Verfahren.

Alle Ergebnisse der durchgeführten inferenzstatistischen Tests mit $p < 0,05$ wurden als signifikant erachtet. Das kritische α -Fehlerniveau war somit $\alpha = 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Klinische Angaben

15 Männer und drei Frauen wurden in die Studie eingeschlossen. Das durchschnittliche Alter bei Aufnahme lag bei $48,1 \pm 4,0$ Jahren (Mittelwert \pm SEM; Bereich: 21-77 Jahre). Der ISS betrug im Durchschnitt $32,1 \pm 2,6$ (Bereich: 18-50). Die Patienten verbrachten im Mittel insgesamt $14,11 \pm 2,6$ d auf der Intensivstation (Bereich: 2-45 d). Die Aufenthaltsdauer im UKD insgesamt betrug im Mittel $54,6 \pm 8,4$ d (Bereich: 15-143 d). 95 % der Patienten wurden am Tag des Traumas operiert. Innerhalb der ersten zehn Behandlungstage fanden durchschnittlich $2,7 \pm 0,25$ Operationen (OPs) (Bereich: 1-5 OPs) pro Patient statt. Zwei der Probanden entwickelten eine Sepsis, einer davon innerhalb der ersten 10 d nach dem Trauma. Der andere dieser beiden Patienten starb nach dem Untersuchungszeitraum im klinischen Verlauf. Eine Übersicht über Geschlecht und Alter der Patienten bei Aufnahme, Verletzungsschwere (gemessen anhand des ISS-Wertes), Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation, Anzahl der durchgeführten Operationen innerhalb der ersten 10 d, Entwicklung einer Sepsis, Überleben und Aufenthaltsdauer insgesamt gibt Tabelle 8 wieder. Zur Einschätzung des Umfangs der Entzündung wurden zu den Zeitpunkten, an denen eine BE durchgeführt wurde, die Leukozytenzahlen im peripheren Blut gemessen. Diese sind gesondert in Tabelle 9 aufgeführt.

Aus organisatorischen Gründen war es nicht möglich jedem Patienten zu allen drei Messzeitpunkten Blut abzunehmen, sodass die Anzahl der Messwerte pro Zeitpunkt unterschiedlich war.

Tabelle 8: Klinische Daten der Patienten

Pat.- Nr.	Geschlecht	Alter	ISS	Aufenthalt ITS	OPs	Sepsis	Überleben	Aufenthalt insges.
1	M	60	22	5	3	N	J	27
2	M	63	20	6	3	N	J	34
3	M	57	43	5	3	N	J	44
4	M	21	20	4	4	N	J	27
5	W	28	27	8	2	N	J	112
6	M	32	43	26	4	J	N	55
7	M	77	27	31	2	N	J	50
8	M	56	41	15	2	N	J	37
9	M	33	48	16	5	J	J	82
10	M	31	34	15	3	N	J	16
11	M	64	16	3	2	N	J	52
12	M	33	34	14	4	N	J	82
13	M	68	43	21	2	N	J	36
14	M	26	29	7	3	N	J	15
15	W	61	21	2	1	N	J	19
16	M	56	18	18	2	N	J	99
17	M	42	41	13	2	N	J	53
18	W	58	50	45	3	N	J	143

Patientennummer, Geschlecht, Alter bei Aufnahme, ISS, Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation in d, Anzahl der Operationen innerhalb der ersten zehn Behandlungstage, Entwicklung einer Sepsis, Überleben, Aufenthaltsdauer insgesamt in d

ISS - Injury Severity Score; ITS - Intensivstation; J - Ja; M - männlich; N - Nein; OPs - Operationen; Pat.-Nr. - Patientennummer; W - weiblich

Tabelle 9: Leukozytenzahl im peripheren Blut ($\times 10^3/\mu\text{l}$) am Tag 1, 5 und 10 (± 1 d) nach Trauma

Patientennummer	Tag 1	Tag 5	Tag 10
1		9,7	12,3
2		5,2	10,3
3		10,2	12,2
4		6,4	11,6
5	4,4	8,4	12,4
6	5,1	8,3	10,7
7	8,7	4,9	6,1
8	9,5	10,0	10,8
9	7,9	16,6	24,1
10		9,2	15,9
11	6,2	6,1	10,4
12	11,6	11,3	20,4
13	8,1	7,6	9,5
14	6,4	8,9	
15	9,6	10,0	
16	9,7	7,9	10,2
17	6,1	5,6	12,6
18	9,0	8,9	19,8

Angegeben ist die Leukozytenzahl im peripheren Blut am jeweiligen Tag der BE, den Kriterien der Leukozytose entsprechende Leukozytenzahlen sind fett gedruckt

Die Kontrollgruppe, die bei den Aktivitäts-Assays zum Vergleich herangezogen wurde, bestand aus elf gesunden Personen. Zehn davon waren weiblich, eine männlich. Im Durchschnitt waren sie 29,45 ($\pm 11,36$ Jahre) Jahre (Mittelwert (\pm SEM); Bereich: 20-54 Jahre) alt. Bei der Messung der Zytokinexpression dienten PMN aus Vollblutspenden der Blutbank von sechs Probanden als Vergleich.

3.1.2 Unfallmechanismus

Die Mehrzahl der polytraumatisierten Patienten (Anzahl: 12; 66,7 %) erlitten ihre Verletzungen bei einem Verkehrsunfall. Davon waren fünf Patienten (41,7 %) Insassen eines Personenkraftwagens (PKW), drei (25 %) waren Motorradfahrer, zwei (16,7 %) Fußgänger, ein Patient (8,3 %) war Fahrradfahrer und bei einem Patienten (8,3 %) fehlte die Angabe. Fünf Patienten (22,2 %) stürzten aus großer Höhe (> 3 m), einer (11,1 %) aus geringer Höhe (< 3 m).

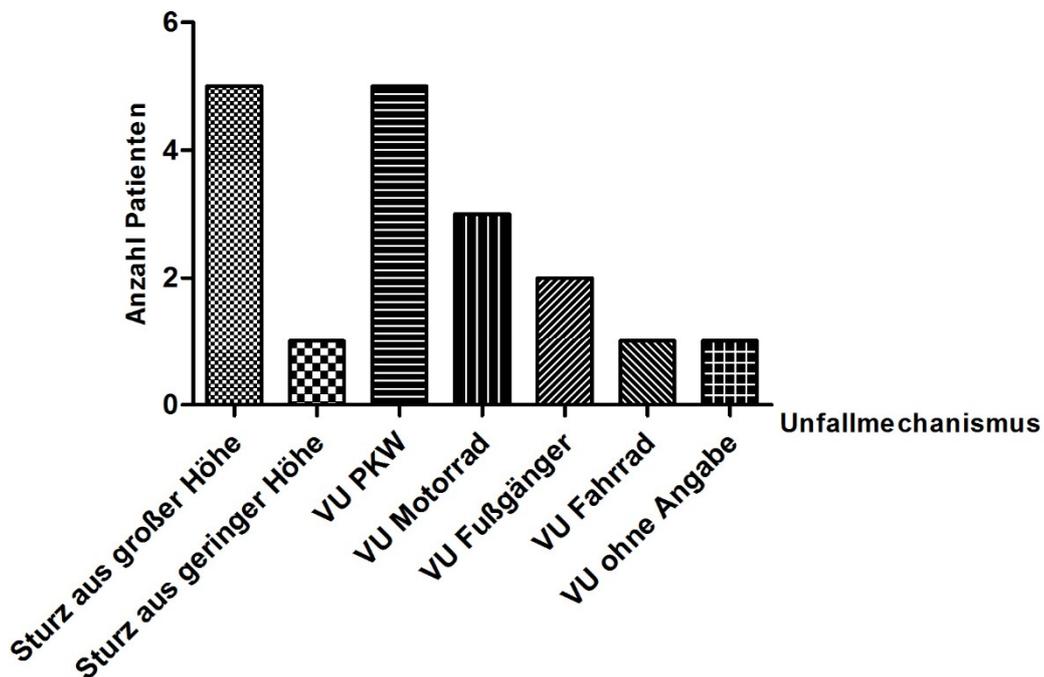


Abb. 6: Unfallmechanismen

Häufigkeiten der Unfallursachen bei den in die Studie eingeschlossenen Polytrauma-Patienten in den Kategorien Sturz aus großer Höhe (> 3 m), Sturz aus geringer Höhe (< 3 m), VU PKW, VU Motorrad, VU Fußgänger, VU Fahrrad, VU ohne Angabe

PKW - Personenkraftwagen; VU - Verkehrsunfall

3.1.3 Verletzungsmuster

Am häufigsten (jeweils 15 Patienten (83,33 %)) traten Verletzungen der Extremitäten bzw. des Beckenrings und externe Verletzungen auf. Verletzungen im Brustbereich erlitten 14 (77,78 %) der Patienten. 12 Probanden (66,66 %) waren im Bereich Kopf/Nacken verletzt. Elf der polytraumatisierten Personen (61,11 %) hatten

Verletzungen im Bauchraum und/oder an den Organen im Becken und acht (44,44 %) im Gesicht. Der Schweregrad der Verletzungen in den einzelnen Körperregionen wurde mithilfe des AIS evaluiert. Die AIS-Werte sind in Tabelle 10 angegeben. Aus diesen Werten wurde wiederum der ISS berechnet, welcher die Verletzungsschwere insgesamt widerspiegelt.

Tabelle 10: Schwere der Verletzungen in verschiedenen Körperregionen

Pat.-Nr.	Kopf/Nacken	Gesicht	Brustkorb	Bauchraum/Beckenorgane	Extremitäten/Beckenring	Externe Verletzungen
1	3	0	3	2	2	1
2	0	0	0	0	4	2
3	5	3	3	0	3	1
4	0	0	0	0	4	2
5	2	0	3	3	3	0
6	5	3	3	0	3	1
7	0	3	3	3	0	1
8	3	0	4	0	4	3
9	4	0	2	2	4	4
10	4	3	3	2	3	3
11	2	0	0	2	3	1
12	0	1	3	4	3	1
13	5	2	3	1	3	1
14	2	0	5	0	0	0
15	0	0	2	4	0	1
16	0	3	0	0	3	0
17	4	0	4	2	3	2
18	5	2	3	1	4	2

Patientennummer, AIS-Werte in den Bereichen Kopf/Nacken, Gesicht, Brustkorb, Bauchraum und Beckenorgane, Extremitäten und Beckenring, externe Verletzungen

AIS - *Abbreviated Injury Scale*; Pat.-Nr. - Patientennummer

3.1.4 SOFA-Score

Mithilfe des SOFA-Score kann die Organfunktion bei Patienten eingeschätzt werden. In diesen Score fließen der respiratorische, neurologische und kardiovaskuläre Zustand sowie die Funktion von Leber, Niere und der Blutgerinnung ein [104]. Am Tag 1 lag der durchschnittliche Wert des SOFA-Scores bei $9,6 \pm 0,7$ (Mittelwert \pm SEM; Bereich: 6-13). Der Mittelwert des SOFA-Scores am Tag 5 war $5,5 \pm 1,0$ (Bereich: 0-14). Am

Tag 10 betrug der Wert des SOFA-Scores im Durchschnitt $4,6 \pm 0,8$ (Bereich: 0-14). Die SOFA-Score-Werte sind in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 11: SOFA-Score-Werte am Tag 1, 5 und 10 (± 1 d) nach Trauma

Patientennummer	SOFA Tag 1	SOFA Tag 5	SOFA Tag 10
1		2	1
2		6	1
3		9	5
4			0
5	11	5	2
6	10	10	5
7	6	6	7
8	13	14	4
9	10	0	7
10		9	10
11	6	1	0
12	12	8	6
13	8	7	6
14	10	0	
15	8	0	
16	9	9	6
17	12	6	9
18	11	13	14

Die Organfunktion wurde anhand des SOFA-Scores bewertet, in den der Zustand des respiratorischen, zentralnervösen und kardiovaskulären Systems sowie die Funktionsparameter von Leber, Gerinnung und Niere einfließen.

SOFA - *Sequential Organ Failure Assessment*

3.2 Bestimmung der Zytokinexpression

Um die Synthese der Zytokine IL-1 β und IL-8 zu evaluieren, wurde die Expression der entsprechenden Gene mithilfe des *Real-time* PCR-Verfahrens quantifiziert. Am Tagen 1, 5 und 10 (± 1 d) nach Trauma wurde das intrazelluläre Vorliegen der jeweiligen mRNA in den PMN der schwerverletzten Patienten gemessen und mit der entsprechenden

mRNA-Menge in PMN gesunder Probanden verglichen. Von der Genexpression kann auf die Synthese dieser Mediatoren geschlossen werden. Es wurden nur Patienten in die Untersuchung eingeschlossen, bei denen an allen drei Tagen Blut abgenommen wurde. Der Mittelwert der Expression in der Kontrollgruppe wurde mit 1,0 gleichgesetzt.

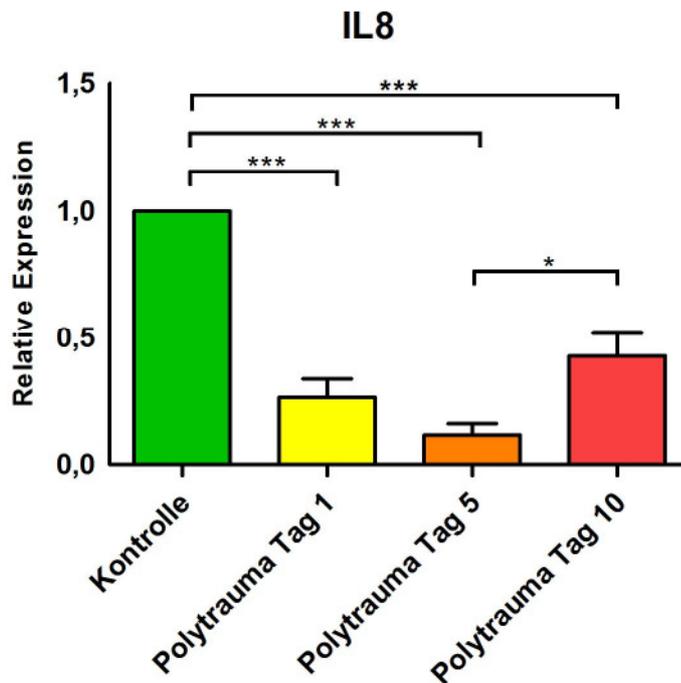


Abb. 7: Relative IL-8-Expression

Dargestellt ist die Genexpression von IL-8 in aus humanem Vollblut isolierten PMN. Es wurde Blut von gesunden Probanden (Kontrolle, n = 6) und Patienten nach schwerem Trauma untersucht. Den Polytrauma-Patienten wurde am Tag 1 (n = 7), 5 (n = 6) und 10 (n = 6) nach Trauma Blut abgenommen, wobei der Tag der BE um ± 1 d variabel war. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Signifikante Unterschiede gab es zwischen der Kontrolle und Tag 1, der Kontrolle und Tag 5, der Kontrolle und Tag 10 und zwischen Tag 5 und Tag 10.

*** - α -Fehlerniveau von $\alpha = 0,001$; ** - α -Fehlerniveau von $\alpha = 0,01$; * - α -Fehlerniveau von $\alpha = 0,05$

BE - Blutentnahme; PMN - Neutrophile Granulozyten; SEM - Standardabweichung

Die Menge an IL-8-mRNA war am Tag 1, 5 und 10 nach Trauma jeweils signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt (jeweils $p < 0,001$). Weiterhin gab es einen signifikanten Unterschied der Expression zwischen Tag 5 und Tag 10 innerhalb der Polytrauma-Gruppe ($p < 0,05$). Es wurde ein Anstieg der Expression von 0,26 im Mittel am Tag 1 und durchschnittlich 0,12 am Tag 5 zu einem Mittelwert von 0,43 am Tag 10

beobachtet (Abb. 7).

Die Genexpression von IL-1 β war am Tag 1 nach Trauma um das 1,72-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, sank am Tag 5 auf einen relativen Wert von 0,33 und blieb auch am Tag 10 mit einem Wert von 0,92 unter dem Wert der gesunden Probanden (Abb. 8). Zwischen Tag 1 und Tag 10 konnte mit $p = 0,0207$ ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

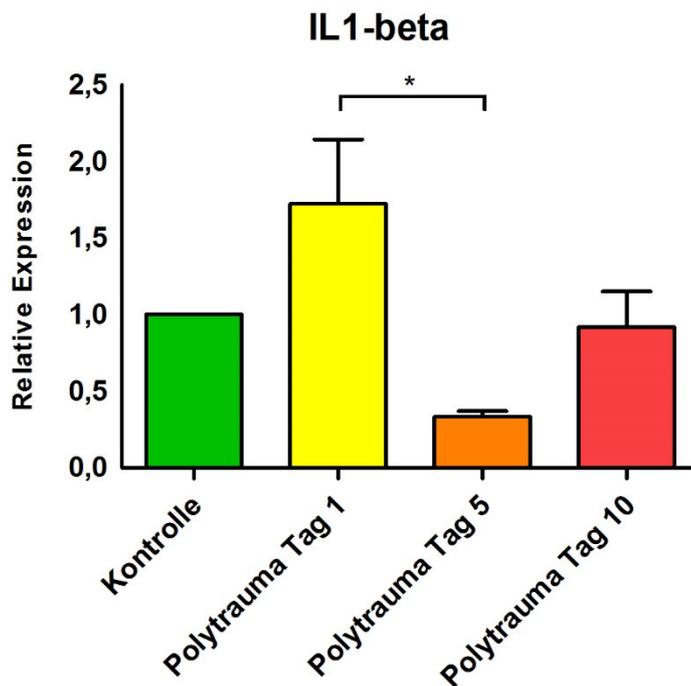


Abb. 8: Relative IL-1 β -Expression

Dargestellt ist die Genexpression von IL-1 β in aus humanem Vollblut isolierten PMN. Es wurde Blut von gesunden Probanden (Kontrolle, $n = 6$) und Patienten nach schwerem Trauma untersucht. Den Polytrauma-Patienten wurde am Tag 1 ($n = 7$), 5 ($n = 6$) und 10 ($n = 6$) nach Trauma Blut abgenommen, wobei der Tag der BE um ± 1 d variabel war. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM. Signifikante Unterschiede gab es zwischen Tag 1 und Tag 5.

* - α -Fehlerniveau von $\alpha = 0,05$

BE - Blutentnahme; PMN - Neutrophile Granulozyten; SEM - Standardabweichung

3.3 Aktivitätsbestimmungen

3.3.1 Bestimmung der Phagozytose-Aktivität

Um zu prüfen, ob nach einer schweren Verletzung mehr PMN Partikel internalisieren und ob sie dies in erhöhtem Ausmaß tun, wurde die Phagozytose-Aktivität der PMN bestimmt.

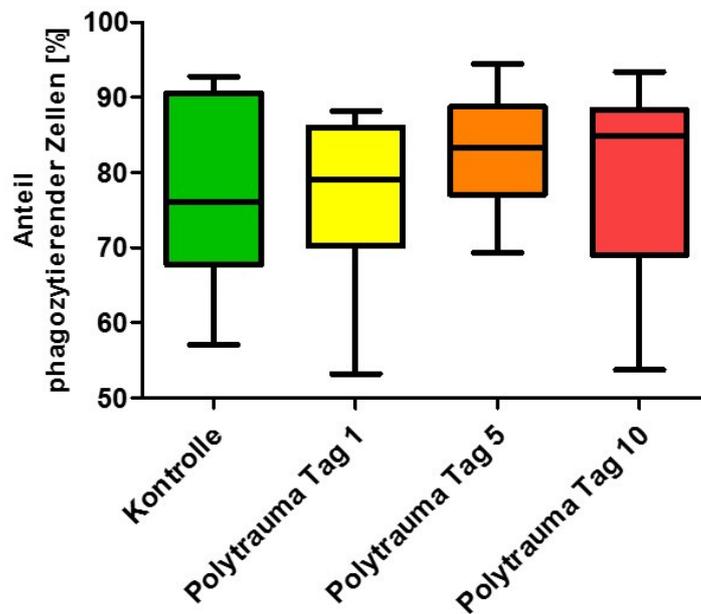


Abb. 9: Anteil phagozytischer Zellen in %

Dargestellt ist der Anteil an aus humanem Vollblut isolierten PMN, bei denen Phagozytose-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Es wurde Blut von gesunden Probanden (Kontrolle, $n = 11$) und Patienten nach schwerem Trauma untersucht. Den Polytrauma-Patienten wurde am Tag 1 ($n = 12$), 5 ($n = 15$) und 10 ($n = 14$) nach Trauma Blut abgenommen, wobei der Tag der BE um ± 1 d variabel war. Angegeben sind die Mediane mit Interquartilsabstand und Spannweite der Daten insgesamt.

BE - Blutentnahme; PMN - Neutrophile Granulozyten

Zunächst wurde der Anteil der phagozytierenden PMN gemessen und mit den Werten gesunder Probanden verglichen. Die Untersuchung wurde am Tag 1, 5 und 10 (± 1 d) nach Trauma durchgeführt. Der Prozentsatz der Zellen, die Phagozytose betreiben, war am Tag 1 gegenüber der Kontrollgruppe leicht erhöht und stieg im Verlauf tendenziell an. Signifikante Unterschiede bestanden nicht. Abb. 9 veranschaulicht die Ergebnisse.

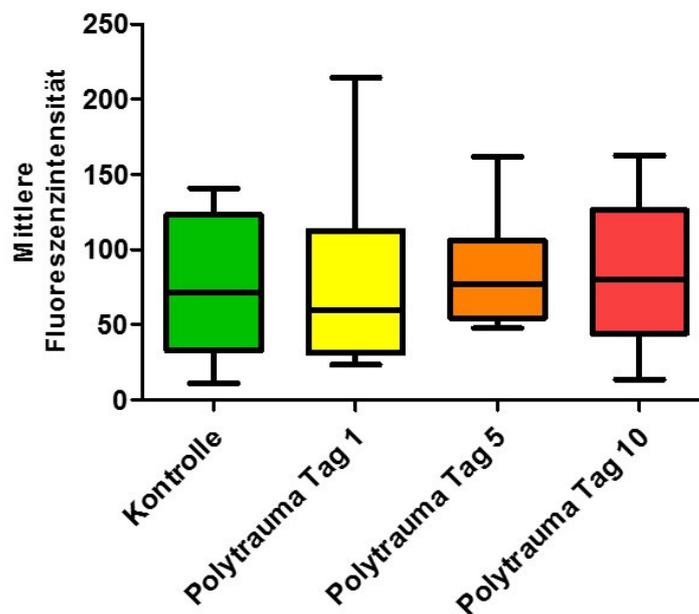


Abb. 10: Mittlere Phagozytose-Aktivität pro Zelle

Dargestellt ist die mittlere Phagozytose-Aktivität von aus humanem Vollblut isolierten PMN. Die Bakterienaufnahme korreliert mit der gemessenen Fluoreszenzintensität. Es wurde Blut von gesunden Probanden (Kontrolle, $n = 11$) und Patienten nach schwerem Trauma untersucht. Den Polytrauma-Patienten wurde am Tag 1 ($n = 12$), 5 ($n = 16$) und 10 ($n = 14$) nach Trauma Blut abgenommen, wobei der Tag der BE um ± 1 d variabel war. Angegeben sind die Mediane mit Interquartilsabstand und Spannweite der Daten insgesamt.

BE - Blutentnahme; PMN - Neutrophile Granulozyten

Ebenso wurde die durchschnittliche Aufnahme von Bakterien pro Zelle am Tag 1, 5 und 10 (± 1 d) nach Trauma ermittelt. Sie entspricht der mittleren Fluoreszenzaktivität bei der Durchflusszytometriemessung. Am Tag 1 war die mittlere Phagozytose-Aktivität pro Zelle im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erniedrigt. Es zeigte sich

ebenfalls eine steigende Tendenz über Tag 5 bis Tag 10 (Abb. 10). Signifikante Unterschiede wurden nicht festgestellt.

3.3.2 Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (oxidative burst)

Ob PMN nach schwerer Verletzung voraktiviert sind und der Anteil reaktive Sauerstoffspezies bildender Zellen erhöht ist, wurde in einer weiteren Versuchsreihe ermittelt. Außerdem wurde untersucht, ob PMN im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion mehr ROS pro Zelle sezernieren. Es wurden zwei verschiedene Substanzen als Stimuli verwendet: fMLP und PMA. Die Bildung von ROS wurde am Tag 1, 5 und 10 (± 1 d) nach Trauma sowie in einer Kontrollgruppe aus gesunden Personen gemessen.

Unter Stimulation mit fMLP war der Anteil ROS-bildender PMN am Tag 1 nach Trauma im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p < 0,05$). Wie Abb. 11 darstellt, lag der Median am Tag 1 bei 12,49 (Kontrollgruppe: 5,178). Im Verlauf fiel der Wert in der Tendenz ab, weitere signifikante Unterschiede der Aktivität der PMN Schwerverletzter im Vergleich zu gesunden Probanden bestanden diesbezüglich nicht.

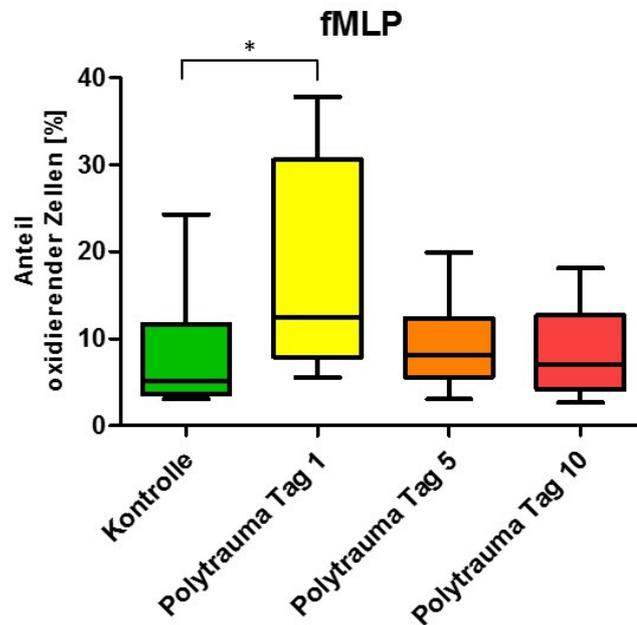


Abb. 11: Anteil der Zellen, die unter Stimulation mit fMLP ROS bilden, in %

Dargestellt ist der Anteil an aus humanem Vollblut isolierten PMN, die unter Stimulation mit fMLP reaktive Sauerstoffspezies bilden. Es wurde Blut von gesunden Probanden (Kontrolle, $n = 11$) und Patienten nach schwerem Trauma untersucht. Den Polytrauma-Patienten wurde am Tag 1 ($n = 12$), 5 ($n = 16$) und 10 ($n = 14$) nach Trauma Blut abgenommen, wobei der Tag der BE um ± 1 d variabel war. Angegeben sind die Mediane mit Interquartilsabstand und Spannweite der Daten insgesamt. Signifikante Unterschiede gibt es zwischen der Kontrolle und Tag 1.

* - α -Fehlerniveau von $\alpha = 0,05$

BE - Blutentnahme; fMLP - N-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin; PMN - Neutrophile Granulozyten; ROS - reaktive Sauerstoffspezies

Die durchschnittlich gebildete ROS-Menge pro Zelle nach Stimulation mit fMLP war am Tag 1 nach Trauma leicht erniedrigt. Es deutete sich ein minimaler Anstieg der mittleren ROS-Bildung je PMN am Tag 5 an, am Tag 10 lag der Median wieder auf dem Niveau von Tag 1 (Abb. 12). Signifikante Unterschiede konnten nicht festgestellt werden.

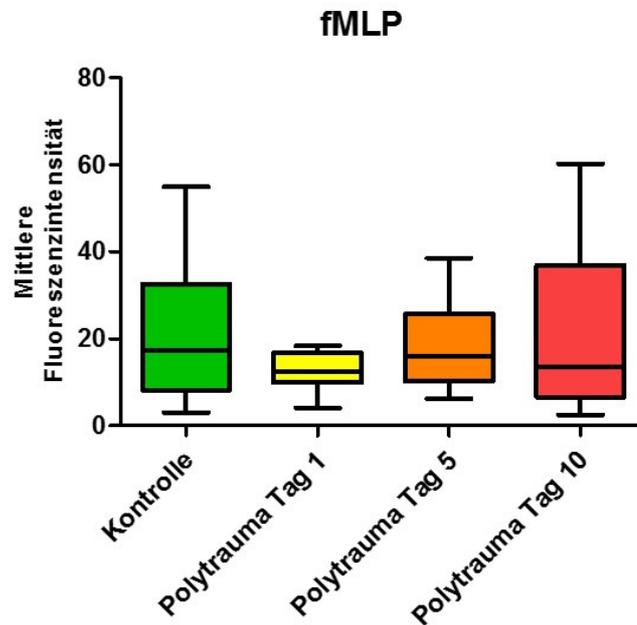


Abb. 12: Mittlere ROS-Bildung unter Stimulation mit fMLP

Dargestellt ist die mittlere Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in aus humanem Vollblut isolierten PMN pro Zelle unter Stimulation mit fMLP. Die ROS-Bildung korreliert mit der gemessenen Fluoreszenzintensität. Es wurde Blut von gesunden Probanden (Kontrolle, n = 10) und Patienten nach schwerem Trauma untersucht. Den Polytrauma-Patienten wurde am Tag 1 (n = 12), 5 (n = 16) und 10 (n = 16) nach Trauma Blut abgenommen, wobei der Tag der BE um ± 1 d variabel war. Angegeben sind die Mediane mit Interquartilsabstand und Spannweite der Daten insgesamt.

BE - Blutentnahme; fMLP - N-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin; PMN - Neutrophile Granulozyten; ROS - reaktive Sauerstoffspezies

Unter Stimulation mit PMA war der Anteil ROS-produzierender PMN bei Polytrauma-Patienten im Vergleich zu PMN gesunder Probanden nicht signifikant verändert. Der Median lag in der Kontrollgruppe bei 94,72 % und befand sich in der Gruppe der Schwerverletzten an allen drei Tagen etwa auf dem gleichen Niveau (Abb. 13).

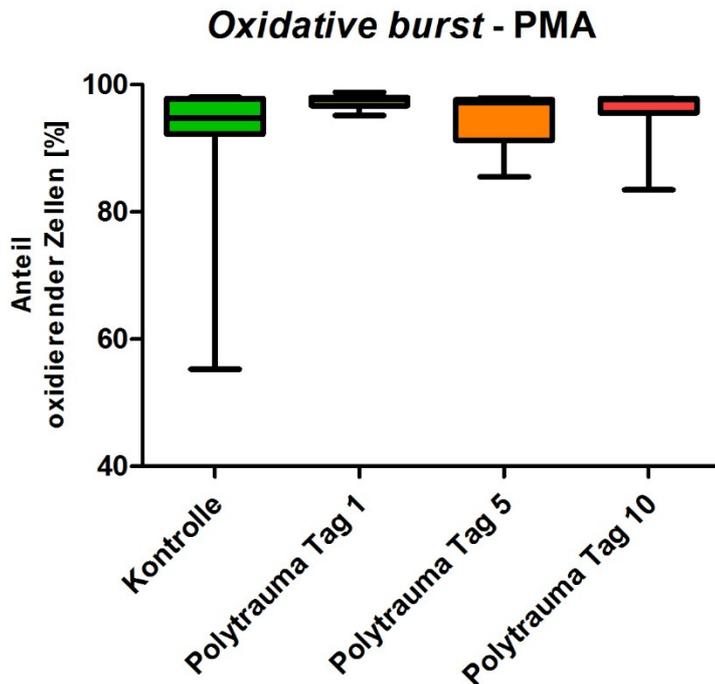


Abb. 13: Anteil der Zellen, die unter Stimulation mit PMA ROS bilden, in %

Dargestellt ist der Anteil an aus humanem Vollblut isolierten PMN, die unter Stimulation mit PMA reaktive Sauerstoffspezies bilden. Es wurde Blut von gesunden Probanden (Kontrolle, n = 11) und Patienten nach schwerem Trauma untersucht. Den Polytrauma-Patienten wurde am Tag 1 (n = 12), 5 (n = 15) und 10 (n = 14) nach Trauma Blut abgenommen, wobei der Tag der BE um ± 1 d variabel war. Angegeben sind die Mediane mit Interquartilsabstand und Spannweite der Daten insgesamt.

BE - Blutentnahme; PMA - Phorbol-12-Myristat-13-Acetat; PMN - Neutrophile Granulozyten; ROS - reaktive Sauerstoffspezies

Der Median der mittleren ROS-Menge pro Granulozyt unter Stimulation mit PMA war am Tag 1 nach Trauma tendenziell höher als der Median der Kontrollgruppe, fiel im Verlauf allerdings auf das Niveau der gesunden Probanden ab (Abb. 14). Die Unterschiede waren nicht signifikant.

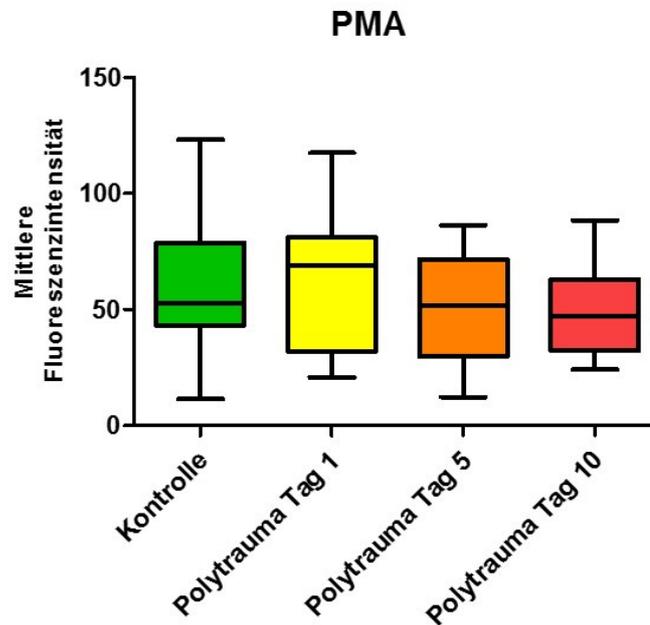


Abb. 14: Mittlere ROS-Bildung pro Zelle unter Stimulation mit PMA

Dargestellt ist die mittlere Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in aus humanem Vollblut isolierten PMN pro Zelle unter Stimulation mit PMA. Die ROS-Bildung korreliert mit der gemessenen Fluoreszenzintensität. Es wurde Blut von gesunden Probanden (Kontrolle, n = 12) und Patienten nach schwerem Trauma untersucht. Den Polytrauma-Patienten wurde am Tag 1 (n = 13), 5 (n = 17) und 10 (n = 16) nach Trauma Blut abgenommen, wobei der Tag der BE um ± 1 d variabel war. Angegeben sind die Mediane mit Interquartilsabstand und Spannweite der Daten insgesamt.

BE - Blutentnahme; PMA - Phorbol-12-Myristat-13-Acetat; PMN - Neutrophile Granulozyten; ROS - reaktive Sauerstoffspezies

3.4 Korrelationen

3.4.1 Korrelation der Aktivität mit der Leukozytenzahl im Blut

Um zu untersuchen, ob die Aktivität der PMN mit dem Ausmaß der Entzündung korreliert, wurde das Bestehen eines Zusammenhangs zwischen den Ergebnissen der Aktivitäts-Messungen und den Leukozytenzahlen im peripheren Blut am jeweiligen Tag der BE überprüft. Es wurden *Spearman's Rho*-Werte als Maß der Korrelation

verwendet (Tab. 12). Eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Anteil phagozytischer Zellen sowie der mittleren Phagozytose-Aktivität und der Leukozytenzahl im peripheren Blut mit $p < 0,01$ wurde am Tag 1 nach Trauma festgestellt. Am Tag 5 korrelierte die Leukozytenzahl im peripheren Blut signifikant negativ mit dem Anteil ROS-bildender Zellen ($p < 0,01$) und der mittleren ROS-Bildung pro Zelle ($p < 0,05$) unter Stimulation mit PMA. Die übrigen Werte wiesen keine signifikante Korrelation auf.

Tabelle 12: Korrelation der Zellaktivität mit der Leukozytenzahl im peripheren Blut

	Tag 1	Tag 5	Tag 10
Anteil phagozytischer Zellen	0,79 **	-0,24 ^{ns}	-0,13 ^{ns}
Mittlere Phagozytose-Aktivität pro Zelle	0,73 **	0,20 ^{ns}	0,10 ^{ns}
Anteil ROS-bildender Zellen (fMLP)	-0,09 ^{ns}	0,02 ^{ns}	-0,26 ^{ns}
Mittlere ROS-Bildung pro Zelle (fMLP)	0,18 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,05 ^{ns}
Anteil ROS-bildender Zellen (PMA)	-0,21 ^{ns}	-0,72 **	-0,24 ^{ns}
Mittlere ROS-Bildung pro Zelle (PMA)	0,24 ^{ns}	-0,60 *	-0,29 ^{ns}

Angegeben ist der *rho square* der Korrelation der Zellaktivität mit der jeweiligen Leukozytenzahl am Tag der BE

ns - nicht signifikant; * - signifikant mit $p < 0,05$; ** - signifikant mit $p < 0,01$

BE - Blutentnahme; fMLP - N-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin;

PMA - Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

3.4.2 Korrelation der Aktivität mit dem SOFA-Score

Weiterhin wurde überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen der Dysfunktion von Organen und der Aktivität der PMN gibt. Hierfür wurden die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen mit den berechneten SOFA-Score-Werten der Patienten an den entsprechenden Tagen verglichen. Als Maß für die Korrelation wurden ebenfalls *Spearman's Rho*-Werte berechnet. Diese sind in Tabelle 13 aufgeführt. Eine signifikante Korrelation oder ein eindeutiger Trend wurden nicht beobachtet.

Tabelle 13: Korrelation der Zellaktivität mit den jeweilige SOFA-Score-Werten

	Tag 1	Tag 5	Tag 10
Anteil phagozytierender Zellen	0,12 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,26 ^{ns}
Mittlere Phagozytose-Aktivität pro Zelle	-0,33 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,35 ^{ns}
Anteil ROS-bildender Zellen (fMLP)	0,33 ^{ns}	0,08 ^{ns}	-0,25 ^{ns}
Mittlere ROS-Bildung pro Zelle (fMLP)	0,18 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	0,40 ^{ns}
Anteil ROS-bildender Zellen (PMA)	-0,29 ^{ns}	0,30 ^{ns}	-0,06 ^{ns}
Mittlere ROS-Bildung pro Zelle (PMA)	-0,40 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,27 ^{ns}

Angegeben ist der *rho square* der Korrelation zwischen den Aktivitätsmessungen und dem jeweiligen SOFA-Score-Wert am Tag der BE

ns - nicht signifikant

BE - Blutentnahme; fMLP - N-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin;

PMA - Phorbol-12-Myristat-13-Acetat; SOFA - *Sequential Organ Failure Assessment*

4 Diskussion

Diese Studie wurde mit 18 polytraumatisierten Patienten ($ISS \geq 16$) in einem Zeitraum von 14 Monaten durchgeführt. Das mittlere Alter, die Geschlechterverteilung und der Unfallmechanismus sind vergleichbar mit den Angaben der deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (Jahresbericht 2014) [150]. Das Verletzungsmuster ist ähnlich, nur die Häufigkeit von Verletzungen mit einem Schweregrad von mind. zwei Punkten im AIS war in den Bereichen Gesicht mit 38,9 % zu 15,3 % und Bauchraum/Beckenorgan mit 50,0 % zu 21,6 % in dieser Patientengruppe deutlich höher als in der Stichprobe des Traumaregisters [150].

Lange ist bekannt, dass IL-8 hauptverantwortlich für die Rekrutierung von PMN und deren Aktivierung ist [116]. Durch das *priming* werden Degranulation, Phagozytose-Aktivität und die Bildung von ROS verstärkt [51, 151]. Aktivierte PMN produzieren ihrerseits ebenfalls IL-8 [120]. Ohne Stimulus wird die Transkription des Chemokins allerdings aktiv unterdrückt [152, 153]. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben ergeben, dass die Genexpression und dementsprechend auch der Plasmaspiegel von IL-8 in PMN nach Trauma signifikant erhöht sind. Dabei erreichen die Werte innerhalb der ersten 24 h nach dem Ereignis ihr Maximum und sinken dann wieder etwas ab [154]. Weiterhin korreliert der anfängliche Plasmaspiegel von IL-8 in einigen Studien positiv mit dem Auftreten eines Multiorganversagens im weiteren Verlauf [155, 156]. Einer der Gegenspieler ist IL-10, das als antiinflammatorisches Zytokin die Produktion von IL-8 auf Ebene der Genexpression vermindert und mit höheren Überlebensraten bei Sepsis einhergeht [157]. Dabei verringert es allerdings nur die Sterblichkeit, wenn es bei bereits bestehender Sepsis appliziert wird, und hat keine präventiven Effekte [158]. Im Gegenteil scheint es bei Polytrauma-Patienten, bei denen laut einer Studie von Sherry et al. [159] mehrheitlich IL-10 im Blutplasma zu finden ist, mit einem häufigeren und früheren Auftreten von Sepsis assoziiert zu sein. In der hier vorliegenden Arbeit wird eine signifikante Reduktion der Genexpression von IL-8 in PMN nach Polytrauma beschrieben, die sowohl direkt nach der Verletzung als auch 5 bzw. 10 d später nachzuweisen war. Die Menge an IL-10-mRNA wurde nicht parallel gemessen, sodass über einen eventuell bestehenden Zusammenhang in diesem Fall lediglich Vermutungen angestellt werden können. Weiterhin wurden hier nur PMN im peripheren Blutstrom

untersucht. Es ist möglich, dass sich deren Genaktivität von den bereits ins Gewebe rekrutierten Zellen unterscheidet. Die niedrige IL-8-Expression passt allerdings zu der Tatsache, dass von den in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten nur zwei im Verlauf eine Sepsis entwickelten und einer dieser beiden gestorben ist.

Einer der Hauptstimuli für die IL-8-Produktion ist das durch die Verletzung ausgeschüttete IL-1 β [152, 160, 161]. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben einen signifikanten Anstieg der IL-1 β -Expression am ersten Tag nach dem Trauma. Dieses Ergebnis deckt sich mit den bisherigen Literaturangaben, nach denen IL-1 β besonders zu Beginn einer Entzündung ausgeschüttet wird und eine Kaskade in Gang setzt [107, 109]. Die IL-1 β -Sekretion hängt auch von der ROS-Bildung ab [90]. Dementsprechend zeigt sich eine Parallele zu dem Anstieg der ROS-Bildung am Tag 1, der in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Nachdem die Entzündungsreaktion initiiert wurde, setzt eine gegenteilige Reaktion ein und die Genexpression von IL-1 β sinkt am Tag 5 auf weniger als die Hälfte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch diese Entwicklung konnte schon in anderen Studien an Sepsis-Modellen beobachtet werden [142, 162]. Hauptverantwortlich für die Gegenregulation im Sinne eines CARS ist auch hier IL-10 [163, 164]. Im Gegensatz zu den entzündungsfördernden Zytokinen wird es im Verlauf der Inflammation erst später ausgeschüttet [165]. Die immunsuppressiven Effekte dieses Zytokins beruhen neben verschiedenen Einflüssen auf Lymphozyten auch auf der Inhibition der Ausschüttung proinflammatorischer Botenstoffe wie IL-1 β , wodurch der Rückgang der Expression am Tag 5 zu erklären ist [164, 165]. Weiterhin unterliegt die Expression von IL-10 einem negativen Feedbackmechanismus, durch den die IL-10-Produktion autoregulatorisch gehemmt wird [165]. 10 d nach dem traumatischen Ereignis entspricht die IL-1 β -Ausprägung dem Basislevel, das auch in PMN bei gesunden Probanden vorhanden ist. Dieser Umstand weist auf die gute Fähigkeit zur Selbstregulation des Immunsystems hin.

Bei den Ergebnissen der Versuche zur Aktivitätsbestimmung von PMN im peripheren Blut schwer verletzter Patienten sind starke interindividuelle Unterschiede aufgetreten. Auch anderen Arbeitsgruppen ist bei Untersuchungen kritisch kranker Patienten eine hohe intra- und interindividuelle Variabilität aufgefallen [166]. Ein Grund hierfür kann die weite Bandbreite der Verletzungsschwere, aber auch eine individuelle Reaktion des

Körpers auf das Trauma sein. Allerdings wiesen auch die Werte der gesunden Probanden eine breite Varianz auf. Voraussetzung für die Eignung als gesunder Proband war, dass die Person sich zu dem Zeitpunkt der BE sowie in den Tagen vorher absolut gesund gefühlt haben musste und auch nicht kürzlich eine Impfung bekommen hatte. Weiterhin hatten sie auch keine immunologischen Grunderkrankungen. Es konnte demnach davon ausgegangen werden, dass sie über ein normal funktionierendes, nicht aktiviertes Immunsystem verfügen. Einen verzerrenden Einfluss könnte eventuell die unterschiedliche Alters- und Geschlechterverteilung in der Kontroll- und der Patientengruppe gehabt haben. Weiterhin wurden die Untersuchungen an einer kleinen Stichprobe durchgeführt, sodass der Nachweis von Signifikanzen erschwert war.

Phagozytose gehört zu den Verteidigungsmechanismen der PMN gegenüber Mikroorganismen. Über verschiedene Rezeptoren erkennen sie die Oberfläche von Pathogenen und nehmen diese auf [24]. Intrazellulär werden die Mikroorganismen dann mithilfe von ROS und proteolytischen Enzymen beseitigt. So schützen PMN den Organismus vor gefährlichen Infektionen [167]. Außerdem ist die Aufnahme toter Zellen wichtig für die Wundheilung [168]. Durch ein Trauma gehen Zellen zugrunde, es werden intrazellulär vorkommende Stoffe freigesetzt und körpereigene Molekülstrukturen zerstört. Diese Gewebsveränderungen initiieren eine sterile Entzündung und locken PMN an [169]. Weiterhin kommt es zu einer systemischen Entzündungsreaktion, in deren Rahmen IL-1 β und IL-8 freigesetzt werden, die wiederum die Phagozytose-Aktivität erhöhen [51, 52]. Auch das Komplementsystem wird aktiviert, ebenfalls ein Mediator der Phagozytose [27, 46, 48]. Da bei Patienten nach einem Polytrauma eine systemische Entzündung auftritt und die PMN im Rahmen des SIRS aktiviert werden, wurde eine stark erhöhte Phagozytose-Aktivität der schwer verletzten Probanden im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erwartet. Diese Beobachtung konnte in der hier vorliegenden Arbeit nicht gemacht werden. Es wurden keine signifikanten Veränderungen der Phagozytose-Aktivität nach schwerem Trauma festgestellt. Der phagozytierende Anteil der Zellen war unmittelbar nach dem Ereignis nur leicht erhöht, die mittlere Phagozytose-Aktivität pro Zelle sogar erniedrigt. Im Verlauf sind beide Werte tendenziell angestiegen.

Andere Arbeitsgruppen haben ähnliche Beobachtungen gemacht. So ergaben Untersuchungen von Sachse et al. [170], dass der Anteil der phagozytierenden PMN

und die Phagozytose-Aktivität pro Zelle in den ersten zwei Wochen nach thermischem Trauma nicht verändert ist. Nur an den Tagen 6-8 nach dem Trauma konnte eine reduzierte Aktivität pro Zelle festgestellt werden. Bei septischen Patienten waren beide Werte bis zu 10 d nach dem Trauma vermindert. Es wurde die gleiche Messmethode angewandt wie in der hier vorliegenden Arbeit. Allerdings muss beachtet werden, dass es sich in der Studie von Sachse et al. [170] um Verbrennungsverletzungen handelt, der Unfallmechanismus also ein anderer ist.

Eine Studie von Ogura et al. [138] wurde mit Polytrauma-Patienten durchgeführt und eignet sich daher besser zum Vergleich. Sie konnten einen signifikant erniedrigten Anteil an phagozytierenden PMN unmittelbar nach dem Trauma (Tag 0 und 1) sowie in der dritten Woche nach der Verletzung feststellen. Zwischenzeitlich lag die Aktivität auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Auch durch einen *second hit*, in diesem Falle eine Infektion, wurde der Anteil phagozytierender Zellen nicht gesteigert. Bei einer anderen Untersuchung [143] wurde nicht die Phagozytose direkt, sondern die Expression eines Komplement- und eines Ig-Rezeptors, die beide PAMPs erkennen und die Internalisierung von Partikeln vermitteln, auf der Oberfläche der PMN gemessen. Es handelte sich ebenfalls um Traumata durch stumpfe bzw. penetrierende Gewalt, hier wurde die Gruppe der Patienten noch einmal in mehr oder weniger schwer Verletzte eingeteilt. Die Expression dieser Rezeptoren war in beiden Gruppen drei Wochen nach dem Trauma verringert. In der Gruppe von Patienten, die schwerer verletzt waren, war die Expression stärker vermindert und unterschied sich im gesamten Zeitraum signifikant von der Kontrollgruppe. Es konnte ein Anstieg der Expression in der ersten Woche nach dem Trauma beobachtet werden, danach fiel sie wieder ab. In der Gruppe der weniger schwer Verletzten war die Expression der Rezeptoren nur am Tag des Traumas, eine Woche und drei Wochen nach Trauma im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert, zwischendurch stieg sie auf das Normalniveau an. In der hier vorliegenden Arbeit lag eine verminderte Phagozytose-Aktivität pro Zelle am Tag 1 nach Trauma vor. Am Tag 5 und 10 lag sie auf dem Niveau der Kontrollgruppe.

Eine Erklärung für die geringe Phagozytose-Aktivität im Blut zirkulierender PMN wäre, dass die Granulozyten schon früh ins Gewebe einwandern und dort aktiv werden [3]. Dies steht allerdings im Gegensatz dazu, dass eine verstärkte ROS-Bildung auch bei PMN im peripheren Blut gemessen werden kann [3].

Mithilfe des Enzyms NADPH-Oxidase können PMN Superoxidanionen bilden, die sie zur Zerstörung von Bakterien und anderen Mikroorganismen einsetzen, nachdem sie sie aufgenommen haben [81, 83]. Sehr wichtig ist dabei auch die Freisetzung lysosomaler Enzyme aus den Granula [89]. Da die zytotoxische Wirkung dieser Abwehrmechanismen unspezifisch ist, können auch Schäden an körpereigenen Zellen entstehen [4]. Die Freisetzung von ROS aus PMN wird durch verschiedene Substanzen stimuliert, in dieser Arbeit wurden fMLP und PMA verwendet. fMLP aktiviert den *oxidative burst* über Rezeptoren an der Zelloberfläche, wodurch intrazelluläre Signalwege in Gang gesetzt werden, die mit der Aktivierung der NADPH-Oxidase enden. PMA hingegen induziert rezeptor- und signalwegunabhängig direkt die intrazelluläre Proteinkinase C (PKC) und darüber die NADPH-Oxidase [171]. Durch eine Art Voraktivierung der PMN kann die Menge und die Kinetik der ROS-Ausschüttung infolge der Stimuli erhöht werden. Ein *priming*-Effekt lässt sich dem Zytokin IL-8 nachweisen. Werden PMN zusätzlich zur Stimulation mit fMLP oder PMA mit IL-8 behandelt, erhöht sich die absolute Menge abgegebener Superoxidanionen sowie auch die Sekretionsrate und die Antwort tritt früher ein [118]. Auch der Einfluss von TNF- α und G-CSF führt zu einer Steigerung der Produktmenge und Geschwindigkeit der Freisetzung [51, 172]. Die alleinige Stimulation mit *priming*-Faktoren führt allerdings nicht zur ROS-Ausschüttung, es wird immer zusätzlich ein Aktivator benötigt. IL-8, TNF- α und G-CSF gehören zu den Zytokinen, die im Rahmen der Entzündungsreaktion unmittelbar nach Trauma ausgeschüttet werden [142, 154, 162, 173]. Unter dieser Voraussetzung wurde erwartet, bei den Trauma-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine vermehrte ROS-Bildung pro Zelle und auch einen erhöhten Anteil ROS-bildender PMN messen zu können.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde unter anderem fMLP als Stimulus verwendet. In diesem Versuchsansatz stieg der Anteil ROS-produzierender Zellen am Tag 1 nach Trauma signifikant an. Diese Beobachtung passt dazu, dass ROS die IL-1 β -Freisetzung beeinflussen, die am Tag 1 ebenfalls erhöht ist [90, 142]. Parallel fällt auch der Anteil ROS-bildender Zellen unter Stimulation mit fMLP an den beiden weiteren Untersuchungszeitpunkten wieder ab. Die mittlere ROS-Bildung pro Zelle nach Zugabe von fMLP unterscheidet sich bei den Patienten nicht signifikant von der Kontrollgruppe und ist, abgesehen von kleinen Schwankungen, an allen drei Untersuchungszeitpunkten

auf dem gleichen Niveau. Unmittelbar nach einem schweren Trauma ist demnach ein höherer Prozentsatz der PMN leichter aktivierbar, produziert aber bei Rezeptor-vermittelter Stimulation mit fMLP nicht mehr ROS pro Zelle. 5 bis 10 Tage später unterscheidet sich die ROS-Freisetzung kaum von der Kontrollgruppe. Botha et al. [171] machten bereits ähnliche Untersuchungen und stellten fest, dass PMN bis zu 24 h nach schwerem Trauma endogen aktiviert und maximal *geprimt* sind, danach aber bis zum vierten Tag nach dem Ereignis die ROS-Bildung unter fMLP-Stimulation auf das Level ruhender Zellen zurückgeht und selbst durch exogenes *priming* nicht erhöht werden kann. Diese zeitliche Abfolge deckt sich auch mit der initialen Ausschüttung von TNF- α , einem der *priming*-Faktoren [142]. Eine andere Studie hat ergeben, dass PMN an den Tagen 2 bis 13 nach Trauma *geprimt* sind. Am Tag des Ereignisses und einen Tag danach war die Reaktion auf Stimulation mit fMLP gegenüber einer Kontrollgruppe nicht erhöht, ab dem zweiten bis zum 21. Tag allerdings schon [138]. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit bestätigen die Erkenntnisse von Botha et al. [171], wonach PMN nach Trauma zunächst (vor-)aktiviert werden und dann in einen nicht-*primebaren* Zustand übergehen, der mind. bis zum zehnten Tag nach Trauma anhält.

Als weiterer aktivierender Faktor wurde PMA angewendet. In niedrigen Konzentrationen kann PMA lediglich als *Primer* eingesetzt werden, löst aber ohne weiteres Agens keinen *oxidative burst* aus [174]. In höheren Konzentrationen bewirkt es ohne vorheriges *priming* oder zusätzlichen Stimulator auch bei ruhenden PMN gesunder Personen eine maximale ROS-Freisetzung [171]. Dementsprechend sezernierten von den mit PMA inkubierten PMN, sowohl in der Kontroll- als auch in der Patienten-Gruppe, zwischen 90 und 100 % der Zellen ROS. Es deutete sich am Tag 1 nach Trauma eine erhöhte Produktion pro Zelle an, auch wenn der Unterschied, möglicherweise aufgrund der kleinen Stichprobe, nicht signifikant war. Am Tag 5 und 10 lag die mittlere ROS-Freisetzung pro Zelle minimal unter dem Level der Kontrollgruppe. Auch Botha et al. [171] stimulierten mit PMA und fanden heraus, dass PMN nur bis zu 6 h nach Trauma mit maximaler ROS-Freisetzung reagieren und ab 48 h nach Trauma die Sekretion sogar signifikant unter der ruhender PMN von gesunden Probanden liegt. Sie stellten fest, dass die PMN bis zum vierten Tag nach Trauma nicht durch PMA aktivierbar waren. Die hier durchgeführte Studie bestätigt

dieses Ergebnis und legt nahe, dass die Aktivierung der ROS-Sekretion nach initialer Verstärkung bis zum zehnten Tag nach einer Schwerstverletzung eingeschränkt ist.

Die Ergebnisse der Messung der ROS-Ausschüttung deuten darauf hin, dass PMN unmittelbar nach schwerem Trauma maximal *geprimt* werden, nach spätestens 48 h allerdings in einen gegenteiligen Zustand übergehen und für mind. 9 d nicht mehr aktivierbar sind. Die Gefahr eines Kollateralschadens an anderen Organen durch Sauerstoffradikale und Proteasen ist somit in den ersten zwei Tagen nach dem Trauma besonders hoch. Für die Therapie polytraumatisierter Patienten bedeutet dies, dass in dieser vulnerablen Phase ein *second hit*, z. B. eine Operation, möglichst vermieden werden sollte, um die Immunantwort nicht noch zu verstärken. Ogura et al. [138] zeigten, dass nach einem *second hit* in Form einer Infektion der *priming*-Index steigt und die Reaktion auf Stimulation mit fMLP stärker ausfällt. Ebenso war das proinflammatorische Zytokin IL-6 im Serum erhöht, während das Serumlevel des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 sowie die Phagozytose-Aktivität unverändert blieben. In Bezug auf den *oxidative burst* der PMN ist es sehr wichtig, weitere Traumata besonders in den ersten zwei Tagen nach einer Schwerstverletzung zu vermeiden.

Nach einem Trauma sterben Patienten, die ihre Verletzung initial überleben, am ehesten an einem Multiorganversagen [131, 132]. Die Funktion der Organe wurde bei den Patienten mithilfe des SOFA-Score eingeschätzt. Er wurde an jedem Tag berechnet, an dem eine BE stattfand. Im SOFA-Score werden das respiratorische, neurologische und das kardiovaskuläre System, sowie die Funktion der Leber, der Blutgerinnung und der Nieren beurteilt [104]. Anschließend wurde geprüft, ob die SOFA-Score-Werte mit der Phagozytose-Aktivität oder der Freisetzung von ROS korrelieren. Hierbei gab es keine signifikante Abweichung von 0 und es ließ sich auch kein Trend erkennen. Demnach scheint sich bei den in dieser Studie eingeschlossenen Patienten die Aktivierung der PMN nicht auf Organfunktionen ausgewirkt zu haben. Möglich ist auch, dass Organschäden durch toxische Effekte der PMN im zeitlichen Verlauf erst später auftreten.

PMN werden im Knochenmark produziert und gespeichert. Normalerweise werden bei gesunden Erwachsenen ungefähr 10^{11} PMN/d generiert. Durch den Wachstumsfaktor G-

CSF können, z. B. bei einer Entzündung, mehr PMN produziert werden, welche ins Blut ausgeschwemmt werden [175, 176]. Auch nach stumpfem oder penetrierendem Trauma ist die Leukozytenzahl im peripheren Blut erhöht, ca. 80 % dieser Leukozyten sind PMN [3, 123]. Durch die Extravasation der PMN ins Gewebe kann es allerdings auch zu einer Leukopenie kommen [3]. Eines der Kriterien für die Diagnose eines SIRS ist Leukozytose > 12.000 Leukozyten/ μl bzw. Leukopenie < 4.000 Leukozyten/ μl [101]. Bei acht der Patienten in dieser Studie trat an insgesamt neun Untersuchungszeitpunkten eine Leukozytose mit > 12.000 Leukozyten/ μl auf. Eine Leukopenie wurde bei keinem der Patienten festgestellt. Die Anzahl weißer Blutzellen im peripheren Blut wurde mit den Ergebnissen der Aktivitäts-Messungen korreliert. Dabei ergab sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der Leukozytenzahl und der Phagozytose-Aktivität am Tag 1, sowohl bei dem Anteil phagozytischer Zellen als auch bei der mittleren Aktivität pro Zelle. Je mehr PMN also aus dem Knochenmark mobilisiert werden, desto aktiver sind sie. Wie bereits erwähnt, ist die Konzentration von G-CSF im Serum unmittelbar nach Trauma erhöht, welcher die Vermehrung und Reifung von PMN im Knochenmark stimuliert und gleichzeitig einen *priming*-Effekt auf die Zellen hat [51, 173]. Ab Tag 2 sinkt der G-CSF-Spiegel schnell wieder ab. An den Tagen 5 und 10 konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Phagozytose-Aktivität der PMN und der Leukozytenzahl im peripheren Blut gemessen werden.

Weiterhin zeigte sich am Tag 5 eine signifikant negative Korrelation zwischen dem Anteil ROS-bildender Zellen und der mittleren ROS-Freisetzung pro Zelle unter Stimulation mit PMA und der Leukozytenzahl. Demnach war die Ausschüttung von ROS umso geringer, je mehr Leukozyten im peripheren Blut nachzuweisen waren. Am Tag 10 ließ sich keine signifikante Korrelation nachweisen. Die Korrelation der Zahl weißer Blutzellen mit der fMLP-stimulierten ROS-Sekretion unterschied sich nicht signifikant von 0. In einem vorhergehenden Abschnitt wurde bereits beschrieben, dass PMN nur bis zu 48 h nach Trauma so *geprimet* sind, dass die stimulierte ROS-Freisetzung erhöht ist. Danach befinden sie sich in einem *ungeprimeten* Zustand und lassen sich für mehrere Tage nicht aktivieren, geben sogar minimal weniger ROS ab als ruhende PMN. Dennoch ist die Anzahl im Blut zirkulierender PMN erhöht.

5 Schlussfolgerungen

Abschließend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit keine Rückschlüsse aus der Bestimmung der Aktivität zirkulierender PMN auf den Inflammationsstatus und das Outcome polytraumatisierter Patienten zu. Der signifikante Anstieg der Genexpression von IL-1 β sowie der ROS-Bildung an Tag 1 nach Trauma ist Ausdruck der beginnenden Entzündungsreaktion. Im weiteren Verlauf ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Aktivitätsparametern der PMN Schwerverletzter und denen gesunder Probanden zu erkennen. Die deutlich verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine an Tag 5 nach Trauma deutet auf eine zwischenzeitlich abklingende Inflammation hin. Die signifikant erniedrigte Expression von IL-8 kann Ausdruck einer supprimierten Immunantwort sein. Ein Zusammenhang zwischen der PMN-Aktivität in der Zirkulation und dem Funktionszustand der Organe, gemessen am klinischen SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*), ließ sich nicht erkennen.

6 Literaturverzeichnis

1. Li, L., et al., *Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration*. J Biol Chem, 2012. **287**(30): p. 25353-60.
2. Dovi, J.V., L.K. He, and L.A. DiPietro, *Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(4): p. 448-55.
3. Botha, A.J., et al., *Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure*. J Trauma, 1995. **39**(3): p. 411-7.
4. Guo, L., et al., *Neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) prevents lung hemorrhage induced by lipopolysaccharide in rat model of cerulein pancreatitis*. Dig Dis Sci, 1995. **40**(10): p. 2177-83.
5. Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell, *The Multifaceted Functions of Neutrophils*. Annual review of pathology, 2014. **9**: p. 181-218.
6. Junqueira, L.C.U. and J. Carneiro, *Histologie*. 6. ed. 2005: Gratzl, Manfred.
7. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2010. **116**(4): p. 625-7.
8. Bern, U., www.morphomed.ch. 06.01.2015; 17:57:18.
9. Sheshachalam, A., et al., *Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 448.
10. Lominadze, G., et al., *Proteomic analysis of human neutrophil granules*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(10): p. 1503-21.
11. Bainton, D.F. and M.G. Farquhar, *Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. II. Cytochemistry and electron microscopy of bone marrow cells*. J Cell Biol, 1968. **39**(2): p. 299-317.
12. Sengelov, H., et al., *Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils*. J Immunol, 1994. **153**(2): p. 804-10.
13. Scharffetter-Kochanek, K., et al., *Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice*. J Exp Med, 1998. **188**(1): p. 119-31.
14. Coxon, A., et al., *A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation*. Immunity, 1996. **5**(6): p. 653-66.
15. Lu, H., et al., *LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil emigration in Mac-1-deficient mice*. J Clin Invest, 1997. **99**(6): p. 1340-50.
16. Sengelov, H., et al., *Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils*. J Immunol, 1995. **154**(8): p. 4157-65.
17. Tapper, H. and S. Grinstein, *Fc receptor-triggered insertion of secretory granules into the plasma membrane of human neutrophils: selective retrieval during phagocytosis*. J Immunol, 1997. **159**(1): p. 409-18.
18. Segal, A.W., J. Dorling, and S. Coade, *Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. Biochemical and morphological studies*. J Cell Biol, 1980. **85**(1): p. 42-59.
19. Urban, C.F., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against Candida albicans*. PLoS Pathogens, 2009. **5**(10): p. e1000639.
20. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.

21. Urban, C.F., et al., *Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms*. Cell Microbiol, 2006. **8**(4): p. 668-76.
22. Guimarães-Costa, A.B., et al., *Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(16): p. 6748-6753.
23. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. The Journal of Cell Biology, 2007. **176**(2): p. 231-241.
24. Flannagan, R.S., V. Jaumouille, and S. Grinstein, *The cell biology of phagocytosis*. Annu Rev Pathol, 2012. **7**: p. 61-98.
25. Fadok, V.A., et al., *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF*. J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 890-8.
26. Stuart, L.M., et al., *Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation*. J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1627-35.
27. Castellheim, A., et al., *Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis*. Scand J Immunol, 2009. **69**(6): p. 479-91.
28. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 191-5.
29. Zhou, Z., et al., *Hepatoma-derived growth factor is a neurotrophic factor harbored in the nucleus*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27320-6.
30. Shi, Y., J.E. Evans, and K.L. Rock, *Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells*. Nature, 2003. **425**(6957): p. 516-21.
31. Hayashi, F., T.K. Means, and A.D. Luster, *Toll-like receptors stimulate human neutrophil function*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2660-9.
32. Ahmad-Nejad, P., et al., *Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments*. Eur J Immunol, 2002. **32**(7): p. 1958-68.
33. Taylor, P.R., et al., *The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages*. J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3876-82.
34. Brown, G.D. and S. Gordon, *Immune recognition. A new receptor for beta-glucans*. Nature, 2001. **413**(6851): p. 36-7.
35. Ekman, A.K. and L.O. Cardell, *The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils*. Immunology, 2010. **130**(1): p. 55-63.
36. Inohara, N., et al., *Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5509-12.
37. Martinon, F., et al., *Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 237-41.
38. Hori, O., et al., *The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25752-61.
39. Park, J.S., et al., *Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7370-7.

40. Lu, T., et al., *Phagocytosis and killing of Staphylococcus aureus by human neutrophils*. J Innate Immun, 2014. **6**(5): p. 639-49.
41. Anderson, C.L., et al., *Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes*. J Exp Med, 1990. **171**(4): p. 1333-45.
42. Van Spruiel, A.B., et al., *Mac-1 (CD11b/CD18) as accessory molecule for Fc alpha R (CD89) binding of IgA*. J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3831-6.
43. Degn, S.E. and S. Thiel, *Humoral pattern recognition and the complement system*. Scand J Immunol, 2013. **78**(2): p. 181-93.
44. Krych-Goldberg, M. and J.P. Atkinson, *Structure-function relationships of complement receptor type 1*. Immunol Rev, 2001. **180**: p. 112-22.
45. Ehlers, M.R., *CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity*. Microbes Infect, 2000. **2**(3): p. 289-94.
46. Mollnes, T.E., et al., *Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1869-77.
47. Jann, N.J., et al., *TLR2 enhances NADPH oxidase activity and killing of Staphylococcus aureus by PMN*. Immunol Lett, 2011. **135**(1-2): p. 17-23.
48. Skjeflo, E.W., et al., *Combined inhibition of complement and CD14 efficiently attenuated the inflammatory response induced by Staphylococcus aureus in a human whole blood model*. J Immunol, 2014. **192**(6): p. 2857-64.
49. Crockett-Torabi, E., et al., *Insoluble immune complex-stimulated neutrophil leukotriene B4 production is dependent on Fc gamma RII and Fc gamma RIII and independent of pertussis toxin-sensitive signal transduction pathways*. Am J Pathol, 1992. **140**(3): p. 613-20.
50. Tsuboi, N., et al., *Human neutrophil Fc gamma receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases*. Immunity, 2008. **28**(6): p. 833-46.
51. Mitchell, G.B., B.N. Albright, and J.L. Caswell, *Effect of interleukin-8 and granulocyte colony-stimulating factor on priming and activation of bovine neutrophils*. Infect Immun, 2003. **71**(4): p. 1643-9.
52. Moxey-Mims, M.M., et al., *The effects of IL-1, IL-2, and tumor necrosis factor on polymorphonuclear leukocyte Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. IL-2 down-regulates the effect of tumor necrosis factor*. J Immunol, 1991. **147**(6): p. 1823-30.
53. Triantafilou, M., et al., *Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 12): p. 2603-11.
54. Greenberg, S., K. Burridge, and S.C. Silverstein, *Colocalization of F-actin and talin during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages*. J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1853-6.
55. Bajno, L., et al., *Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation*. J Cell Biol, 2000. **149**(3): p. 697-706.
56. Zucker-Franklin, D. and J.G. Hirsch, *ELECTRON MICROSCOPE STUDIES ON THE DEGRANULATION OF RABBIT PERITONEAL LEUKOCYTES DURING PHAGOCYTOSIS*. J Exp Med, 1964. **120**: p. 569-76.
57. Lockwood, W.R. and F. Allison, *Electron Micrographic Studies of Phagocytic Cells: II. Observations on the Changes Induced in the Cytoplasmic Contents of Human Granulocytes by the Ingestion of Rough Pneumococcus*. British Journal

- of Experimental Pathology, 1964. **45**(3): p. 294-299.
58. Sbarra, A.J. and M.L. Karnovsky, *The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes*. J Biol Chem, 1959. **234**(6): p. 1355-62.
 59. Briggs, R.T., et al., *Superoxide production by polymorphonuclear leukocytes*. Histochemistry, 1986. **84**(4-6): p. 371-378.
 60. Mandell, G.L., *Bactericidal activity of aerobic and anaerobic polymorphonuclear neutrophils*. Infect Immun, 1974. **9**(2): p. 337-41.
 61. Andrews, T. and K.E. Sullivan, *Infections in patients with inherited defects in phagocytic function*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(4): p. 597-621.
 62. Tkalcevic, J., et al., *Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 201-10.
 63. Cross, A.R. and A.W. Segal, *The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1657**(1): p. 1-22.
 64. Roos, D., R. van Bruggen, and C. Meischl, *Oxidative killing of microbes by neutrophils*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1307-15.
 65. Cross, A.R., et al., *The enzymic reduction and kinetics of oxidation of cytochrome b-245 of neutrophils*. Biochem J, 1982. **204**(2): p. 479-85.
 66. Segal, A.W., et al., *Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes*. Biochem J, 1992. **284** (Pt 3): p. 781-8.
 67. Borregaard, N., et al., *Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation*. J Cell Biol, 1983. **97**(1): p. 52-61.
 68. Calafat, J., et al., *Evidence for small intracellular vesicles in human blood phagocytes containing cytochrome b558 and the adhesion molecule CD11b/CD18*. Blood, 1993. **81**(11): p. 3122-9.
 69. Parkos, C.A., et al., *Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000*. J Clin Invest, 1987. **80**(3): p. 732-42.
 70. Dusi, S. and F. Rossi, *Activation of NADPH oxidase of human neutrophils involves the phosphorylation and the translocation of cytosolic p67phox*. Biochem J, 1993. **296** (Pt 2): p. 367-71.
 71. Fuchs, A., et al., *The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells*. Eur J Biochem, 1997. **249**(2): p. 531-9.
 72. Nauseef, W.M., et al., *Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components*. J Biol Chem, 1991. **266**(9): p. 5911-7.
 73. Abo, A., et al., *Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1*. Nature, 1991. **353**(6345): p. 668-70.
 74. Knaus, U.G., et al., *Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2*. Science, 1991. **254**(5037): p. 1512-5.
 75. Cross, A.R. and J.T. Curnutte, *The cytosolic activating factors p47phox and p67phox have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase*. J Biol Chem, 1995. **270**(12): p. 6543-8.

76. Diebold, B.A. and G.M. Bokoch, *Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 211-5.
77. Meischl, C. and D. Roos, *The molecular basis of chronic granulomatous disease*. Springer Seminars in Immunopathology, 1998. **19**(4): p. 417-434.
78. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
79. McCord, J.M. and E.D. Day, *Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron—EDTA complex*. FEBS Letters, 1978. **86**(1): p. 139-142.
80. Kellogg, E.W., 3rd and I. Fridovich, *Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide*. J Biol Chem, 1977. **252**(19): p. 6721-8.
81. Rosen, H. and S.J. Klebanoff, *Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system. A model for the polymorphonuclear leukocyte*. J Exp Med, 1979. **149**(1): p. 27-39.
82. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase-Halide-Hydrogen Peroxide Antibacterial System*. Journal of Bacteriology, 1968. **95**(6): p. 2131-2138.
83. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Involvement of superoxide and myeloperoxidase in oxygen-dependent killing of Staphylococcus aureus by neutrophils*. Infect Immun, 1996. **64**(9): p. 3512-7.
84. Kettle, A.J. and C.C. Winterbourn, *A kinetic analysis of the catalase activity of myeloperoxidase*. Biochemistry, 2001. **40**(34): p. 10204-12.
85. Yamashita, K., et al., *Ozone production by amino acids contributes to killing of bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(44): p. 16912-7.
86. Borregaard, N., J.H. Schwartz, and A.I. Tauber, *Proton secretion by stimulated neutrophils. Significance of hexose monophosphate shunt activity as source of electrons and protons for the respiratory burst*. J Clin Invest, 1984. **74**(2): p. 455-9.
87. Cech, P. and R.I. Lehrer, *Phagolysosomal pH of human neutrophils*. Blood, 1984. **63**(1): p. 88-95.
88. Styrud, B. and M.S. Klempner, *Internal pH of human neutrophil lysosomes*. FEBS Lett, 1982. **149**(1): p. 113-6.
89. Reeves, E.P., et al., *Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux*. Nature, 2002. **416**(6878): p. 291-7.
90. Gabelloni, M.L., et al., *NADPH oxidase derived reactive oxygen species are involved in human neutrophil IL-1beta secretion but not in inflammasome activation*. Eur J Immunol, 2013. **43**(12): p. 3324-35.
91. Roos, D. and C.C. Winterbourn, *Lethal Weapons*. Science, 2002. **296**(5568): p. 669-671.
92. *Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Unfallstatistik 2014*. 2016.
93. Kuhne, C.A., et al., *[Trauma centers in Germany. Status report]*. Unfallchirurg, 2006. **109**(5): p. 357-66.
94. DGU, *Traumaregister - Jahresbericht 2015*. 2016.
95. Attenberger, C., F. Amsler, and T. Gross, *Clinical evaluation of the Trauma Outcome Profile (TOP) in the longer-term follow-up of polytrauma patients*. Injury, 2012. **43**(9): p. 1566-74.
96. Gross, T., et al., *Factors associated with reduced longer-term capacity to work in patients after polytrauma: a Swiss trauma center experience*. J Am Coll Surg,

2010. **211**(1): p. 81-91.
97. Straßenwesen, B.f., *Volkswirtschaftliche Kosten durch Straßenverkehrsunfälle in Deutschland*. 2008.
 98. Baker, S.P., et al., *The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care*. J Trauma, 1974. **14**(3): p. 187-96.
 99. Pape, H.C., et al., *The definition of polytrauma revisited: An international consensus process and proposal of the new 'Berlin definition'*. J Trauma Acute Care Surg, 2014. **77**(5): p. 780-786.
 100. Paffrath, T., R. Lefering, and S. Flohe, *How to define severely injured patients? -- an Injury Severity Score (ISS) based approach alone is not sufficient*. Injury, 2014. **45 Suppl 3**: p. S64-9.
 101. 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. 1644-1655.
 102. Singer, M., et al., *THE third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 801-810.
 103. Mitarbeiter, G.H.u., *Innere Medizin*. 2017.
 104. Antonelli, M., et al., *Application of SOFA score to trauma patients. Sequential Organ Failure Assessment*. Intensive Care Med, 1999. **25**(4): p. 389-94.
 105. Talmor, M., L. Hydo, and P.S. Barie, *Relationship of systemic inflammatory response syndrome to organ dysfunction, length of stay, and mortality in critical surgical illness: Effect of intensive care unit resuscitation*. Archives of Surgery, 1999. **134**(1): p. 81-87.
 106. Haga, Y., et al., *Systemic inflammatory response syndrome and organ dysfunction following gastrointestinal surgery*. Crit Care Med, 1997. **25**(12): p. 1994-2000.
 107. Dinarello, C.A., *Proinflammatory cytokines*. Chest, 2000. **118**(2): p. 503-8.
 108. Miller, L.S., et al., *Inflammasome-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against Staphylococcus aureus in vivo*. J Immunol, 2007. **179**(10): p. 6933-42.
 109. Yan, B., et al., *IL-1beta and reactive oxygen species differentially regulate neutrophil directional migration and Basal random motility in a zebrafish injury-induced inflammation model*. J Immunol, 2014. **192**(12): p. 5998-6008.
 110. Bevilacqua, M.P., et al., *Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines*. J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 2003-11.
 111. Bussolino, F., et al., *Interleukin 1 stimulates platelet-activating factor production in cultured human endothelial cells*. J Clin Invest, 1986. **77**(6): p. 2027-33.
 112. Bevilacqua, M.P., et al., *Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells*. J Exp Med, 1984. **160**(2): p. 618-23.
 113. Rossi, V., et al., *Prostacyclin synthesis induced in vascular cells by interleukin-1*. Science, 1985. **229**(4709): p. 174-6.
 114. Albrightson, C.R., N.L. Baenziger, and P. Needleman, *Exaggerated human*

- vascular cell prostaglandin biosynthesis mediated by monocytes: role of monokines and interleukin 1.* J Immunol, 1985. **135**(3): p. 1872-7.
115. Okusawa, S., et al., *Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition.* J Clin Invest, 1988. **81**(4): p. 1162-72.
 116. Smart, S.J. and T.B. Casale, *TNF-alpha-induced transendothelial neutrophil migration is IL-8 dependent.* Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 1): p. L238-45.
 117. Chuntharapai, A., et al., *Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes.* J Immunol, 1994. **153**(12): p. 5682-8.
 118. Wozniak, A., et al., *Interleukin-8 primes human neutrophils for enhanced superoxide anion production.* Immunology, 1993. **79**(4): p. 608-15.
 119. Ketritz, R., et al., *Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils.* Kidney Int, 1998. **53**(1): p. 84-91.
 120. Lapinet, J.A., et al., *Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles.* Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 6917-23.
 121. Ahmed, N.A., et al., *Mechanisms for the diminished neutrophil exudation to secondary inflammatory sites in infected patients with a systemic inflammatory response (sepsis).* Crit Care Med, 1999. **27**(11): p. 2459-68.
 122. Murphy, T.J., et al., *Injury, sepsis, and the regulation of Toll-like receptor responses.* J Leukoc Biol, 2004. **75**(3): p. 400-7.
 123. Kasten, K.R., et al., *Divergent adaptive and innate immunological responses are observed in humans following blunt trauma.* BMC Immunol, 2010. **11**: p. 4.
 124. Muller Kobold, A.C., et al., *Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality.* Intensive Care Med, 2000. **26**(7): p. 883-92.
 125. Brown, K.A., et al., *Leucodepletion and the interaction of polymorphonuclear cells with endothelium in systemic inflammatory response syndrome.* Perfusion, 2001. **16 Suppl**: p. 75-83.
 126. Ayala, A., et al., *Differential effects of hemorrhage on Kupffer cells: decreased antigen presentation despite increased inflammatory cytokine (IL-1, IL-6 and TNF) release.* Cytokine, 1992. **4**(1): p. 66-75.
 127. Kyriakides, C., et al., *Neutrophils, not complement, mediate the mortality of experimental hemorrhagic pancreatitis.* Pancreas, 2001. **22**(1): p. 40-6.
 128. Grimminger, F., et al., *Influence of microvascular adherence on neutrophil leukotriene generation. Evidence for cooperative eicosanoid synthesis.* J Immunol, 1990. **144**(5): p. 1866-72.
 129. Zhou, M.Y., et al., *In vivo expression of neutrophil inhibitory factor via gene transfer prevents lipopolysaccharide-induced lung neutrophil infiltration and injury by a beta2 integrin-dependent mechanism.* The Journal of Clinical Investigation. **101**(11): p. 2427-2437.
 130. Ramirez, M., *Multiple organ dysfunction syndrome.* Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care, 2013. **43**(10): p. 273-7.
 131. Ciesla, D.J., et al., *A 12-year prospective study of postinjury multiple organ failure: has anything changed?* Arch Surg, 2005. **140**(5): p. 432-8; discussion

- 438-40.
132. Ciesla, D.J., et al., *Decreased progression of postinjury lung dysfunction to the acute respiratory distress syndrome and multiple organ failure*. *Surgery*, 2006. **140**(4): p. 640-7; discussion 647-8.
 133. Moore, F.A., et al., *Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon*. *J Trauma*, 1996. **40**(4): p. 501-10; discussion 510-2.
 134. Faist, E., et al., *Multiple organ failure in polytrauma patients*. *J Trauma*, 1983. **23**(9): p. 775-87.
 135. Maekawa, K., et al., *Effects of trauma and sepsis on soluble L-selectin and cell surface expression of L-selectin and CD11b*. *J Trauma*, 1998. **44**(3): p. 460-8.
 136. Botha, A.J., et al., *Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window*. *Surgery*, 1995. **118**(2): p. 358-64; discussion 364-5.
 137. Zallen, G., et al., *Circulating postinjury neutrophils are primed for the release of proinflammatory cytokines*. *J Trauma*, 1999. **46**(1): p. 42-8.
 138. Ogura, H., et al., *Priming, second-hit priming, and apoptosis in leukocytes from trauma patients*. *J Trauma*, 1999. **46**(5): p. 774-81; discussion 781-3.
 139. Rezende-Neto, J.B., et al., *The abdominal compartment syndrome as a second insult during systemic neutrophil priming provokes multiple organ injury*. *Shock*, 2003. **20**(4): p. 303-8.
 140. Lomas, J.L., et al., *Differential effects of macrophage inflammatory chemokine-2 and keratinocyte-derived chemokine on hemorrhage-induced neutrophil priming for lung inflammation: assessment by adoptive cells transfer in mice*. *Shock*, 2003. **19**(4): p. 358-65.
 141. Grotz, M.R., et al., *Glycine reduces the inflammatory response and organ damage in a two-hit sepsis model in rats*. *Shock*, 2001. **16**(2): p. 116-21.
 142. Ashare, A., et al., *Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005. **288**(4): p. L633-40.
 143. White-Owen, C., J.W. Alexander, and G.F. Babcock, *Reduced expression of neutrophil CD11b and CD16 after severe traumatic injury*. *J Surg Res*, 1992. **52**(1): p. 22-6.
 144. Vinsonneau, C., et al., *Continuous venovenous haemodiafiltration versus intermittent haemodialysis for acute renal failure in patients with multiple-organ dysfunction syndrome: a multicentre randomised trial*. *Lancet*, 2006. **368**(9533): p. 379-85.
 145. Villar, J., et al., *A high positive end-expiratory pressure, low tidal volume ventilatory strategy improves outcome in persistent acute respiratory distress syndrome: a randomized, controlled trial*. *Crit Care Med*, 2006. **34**(5): p. 1311-8.
 146. Cicarelli, D.D., F.E. Bensenor, and J.E. Vieira, *Effects of single dose of dexamethasone on patients with systemic inflammatory response*. *Sao Paulo Med J*, 2006. **124**(2): p. 90-5.
 147. Monika Jansohn, S.R., *Gentechnische Methoden*. 5. Auflage, 2012.
 148. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
 149. Davey, H.M. and D.B. Kell, *Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses*. *Microbiol Rev*, 1996. **60**(4): p. 641-96.

150. <TR-DGU-Jahresbericht_2014.pdf>.
151. Peveri, P., et al., *A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes*. J Exp Med, 1988. **167**(5): p. 1547-59.
152. Nourbakhsh, M., et al., *The NF-kappa b repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa b-flanking sequence element*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 4501-8.
153. Ashburner BP, W.S., Baldwin Jr S., *The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression*. Mol Cell Biol 21: 7065-7077.
154. Stegmaier, J.C., et al., *Dynamics of neutrophilic NF-kB translocation in relation to IL-8 mRNA expression after major trauma*. Inflamm Res, 2008. **57**(11): p. 547-54.
155. Botha, A.J., et al., *Sequential systemic platelet-activating factor and interleukin 8 primes neutrophils in patients with trauma at risk of multiple organ failure*. Br J Surg, 1996. **83**(10): p. 1407-12.
156. Frink, M., et al., *Influence of sex and age on mods and cytokines after multiple injuries*. Shock, 2007. **27**(2): p. 151-6.
157. Wang, P., et al., *Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils*. Blood, 1994. **83**(9): p. 2678-83.
158. Kato, T., et al., *Interleukin 10 reduces mortality from severe peritonitis in mice*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(6): p. 1336-40.
159. Sherry, R.M., et al., *Interleukin-10 is associated with the development of sepsis in trauma patients*. J Trauma, 1996. **40**(4): p. 613-6; discussion 616-7.
160. Bersinger, N.A., et al., *Dose-response effect of interleukin (IL)-1beta, tumour necrosis factor (TNF)-alpha, and interferon-gamma on the in vitro production of epithelial neutrophil activating peptide-78 (ENA-78), IL-8, and IL-6 by human endometrial stromal cells*. Arch Gynecol Obstet, 2011. **283**(6): p. 1291-6.
161. Kasahara, T., et al., *IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line*. Immunology, 1991. **74**(1): p. 60-67.
162. Pinsky, M.R., et al., *Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality*. Chest, 1993. **103**(2): p. 565-75.
163. Ward, N.S., B. Casserly, and A. Ayala, *The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients*. Clin Chest Med, 2008. **29**(4): p. 617-25, viii.
164. Cassatella, M.A., et al., *Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2207-11.
165. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. J Exp Med, 1991. **174**(5): p. 1209-20.
166. Pinsky, M.R., *Pathophysiology of sepsis and multiple organ failure: pro- versus anti-inflammatory aspects*. Contrib Nephrol, 2004. **144**: p. 31-43.
167. Köhl, A.A., et al., *Aggravation of Different Types of Experimental Colitis by Depletion or Adhesion Blockade of Neutrophils*. Gastroenterology, 2007. **133**(6):

- p. 1882-1892.
168. Cantürk, N.Z., et al., *Effects of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor on Incisional Wound Healing in an Experimental Diabetic Rat Model*. *Endocrine Research*, 1999. **25**(1): p. 105-116.
 169. McDonald, B., et al., *Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation*. *Science*, 2010. **330**(6002): p. 362-6.
 170. Sachse, C., G. Wolterink, and N. Pallua, *Neutrophil intracellular pH and phagocytosis after thermal trauma*. *Clin Chim Acta*, 2000. **295**(1-2): p. 13-26.
 171. Botha, A.J., et al., *Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges*. *Shock*, 1995. **3**(3): p. 157-66.
 172. Atkinson, Y.H., et al., *Recombinant human tumor necrosis factor-alpha. Regulation of N-formylmethionylleucylphenylalanine receptor affinity and function on human neutrophils*. *J Clin Invest*, 1988. **81**(3): p. 759-65.
 173. Tanaka, H., et al., *Changes in granulocyte colony-stimulating factor concentration in patients with trauma and sepsis*. *J Trauma*, 1996. **40**(5): p. 718-25; discussion 725-6.
 174. Tyagi, S.R., et al., *Phorbol myristate acetate (PMA) augments chemoattractant-induced diglyceride generation in human neutrophils but inhibits phosphoinositide hydrolysis. Implications for the mechanism of PMA priming of the respiratory burst*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(26): p. 13191-8.
 175. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. *Immunity*, 2010. **33**(5): p. 657-70.
 176. Hamilton, J.A., *Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(7): p. 533-44.

7 Danksagung

Danken möchte ich allen, die mir auf dem Weg zur Erstellung dieser Doktorarbeit zur Seite standen. Allen voran danke ich meinen Eltern Anett und Stephan, ohne die ich nicht die Möglichkeit gehabt hätte, meinen Traum vom Medizinstudium zu verwirklichen und in diesem Rahmen dann auch zu promovieren. Sie unterstützten mich in jeglicher Hinsicht und standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite, wenn ich mal nicht weiterwusste. Weiterhin danke ich meinem Bruder Lukas für seinen mentalen Beistand und seinen Humor. Große Unterstützung habe ich auch von meinen Großeltern Margarete und Siegfried sowie von meine Paten Coletta und Ulrich erfahren. Ohne den Rückhalt und die Liebe meiner Familie hätte ich es auf meinem Weg nicht so weit gebracht. Ich möchte auch Fabian danken für seine endlose Geduld mit meinen verworrenen Gedanken und Zweifeln. An ihn und meine Eltern geht ein großes Dankeschön für das Korrekturlesen.

Weiterhin danke ich Jutta und Samira, die mir bei meiner Arbeit im Labor unglaublich weitergeholfen haben. Ich konnte sie immer fragen, wenn ich technische oder fachliche Fragen hatte, und sie habe sich Zeit genommen, mich in Methoden einzuarbeiten und mir bei meinen Experimenten zu helfen. Bei Carina bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und Kommunikation bei der Rekrutierung von Patienten und der Weitergabe klinischer Informationen. Last but not least danke ich Adnana, meiner Betreuerin und Schirmherrin des ganzen Projektes, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.