

AUS DER CHIRURGISCHEN KLINIK
DES
AKADEMISCHEN LEHRKRANKENHAUSES
MARIENHOSPITAL EUSKIRCHEN

CHEFARZT: PROF. DR. MED. HANS SCHWERING

**Über die Rolle der Chemokinrezeptoren
bei der Migration von T-Helferzellen
an den Ort des chirurgischen Traumas
bzw. der lokalen Entzündung**

INAUGURAL – DISSERTATION

ZUR
ERLANGUNG DES DOCTOR MEDICINAE
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER WESTFÄLISCHEN WILHELMS-UNIVERSITÄT MÜNSTER

VORGELEGT VON

STEPHANIE ADAM

AUS BONN

2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Schwering

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Preusser

Tag der mündlichen Prüfung: 24. März 2004

Aus der chirurgischen Klinik des
Akademischen Lehrkrankenhauses
Marienhospital Euskirchen

Chefarzt: Prof. Dr. med. H. Schwering

Referent: Prof. Dr. med. H. Schwering

Koreferent: Prof. Dr. med. P. Preusser

Zusammenfassung

Über die Rolle der Chemokinrezeptoren bei der Migration von T-Helferzellen
an den Ort des chirurgischen Traumas bzw. der lokalen Entzündung

Stephanie Adam

Das Trauma einer Operation führt, vergleichbar einer lokalen Entzündung, zu komplexen immunologischen Reaktionen. Die Abwehrreaktion des menschlichen Organismus besteht darin, vermehrt Bestandteile des Immunsystems an den Verletzungsort bzw. Infektionsherd zu transportieren. Zu diesem Zweck erhöht sich die Blutzufuhr zum Ort der Immunreaktion, die Kapillarpermeabilität nimmt zu, und Leukozyten treten aus den Kapillaren in das umgebende Gewebe aus. Im Gewebe wandern sie chemotaktisch gesteuert auf den Infektionsort zu. Entsprechend der Schwere des Gewebetraumas wandern T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1-Zellen) zum Ort des chirurgischen Traumas bzw. der lokalen Entzündung ab. So konnte aufgezeigt werden, dass es nach chirurgischen Eingriffen zu einer Schwächung der zellulären, zytotoxischen Immunabwehr kommt, die durch eine Reduzierung der T_H1-Zellen im Blut charakterisiert ist (Decker et al., 1996).

Vor diesem Hintergrund erfolgten die Untersuchungen von Lymphozyten-Subpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker und der von verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimierten Chemokinrezeptoren, um zu klären, welche Rolle die Chemokinrezeptoren bei der Migration von T-Helferzellen an den Ort des chirurgischen Traumas bzw. der lokalen Entzündung spielen. Die Untersuchungen wurden an 21 Patienten nach elektiven abdominal-chirurgischen Eingriffen vergleichend im Vollblut und im peritonealen Drainagesekret vorgenommen. Die in der vorliegenden Studie dargelegten Untersuchungen bestätigen eine lokale Zellrekrutierung von T-Helferzellen (CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten) am Ort des chirurgischen Trauma. Zur Rolle der Chemokinrezeptoren bei der Migration von T-Helferzellen an den Ort des chirurgischen Traumas bzw. der lokalen Entzündung konnte gezeigt werden, dass der Chemokinrezeptor CXCR3 von Bedeutung ist. Da dieser unter den T-Helferzellen im wesentlichen auf den T_H1-Zellen exprimiert wird, kann man ihm eine Beteiligung am Abwanderungsprozess von T_H1-Zellen aus dem peripheren Blut zum Ort des chirurgischen Traumas zuschreiben. Daraus lässt sich folgern, dass die Chemokine der CXC-Klasse mit ihren Wirkstoffen IP-10, MIG und I-TAC in den postoperativen Immunregulationsvorgängen ebenfalls eine wichtige Rolle einzunehmen scheinen, was auch durch die vergleichbaren Untersuchungen an T-Suppressorzellen bestätigt werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigt die Arbeit, dass der CCR5 Rezeptor bei den immunregulativen Mechanismen nach einer Operation keine, oder nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

Meiner Familie und meinem Mann gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung des Immunsystems	1
1.2 Die Immunantwort	1
1.3 Die Zellen des Immunsystems	2
1.3.1 Die Phagozyten	3
1.3.1.1 Mononukleäre Phagozyten	3
1.3.1.2 Polymorphkernige Granulozyten	4
Neutrophile, Eosinophile, Basophile	
und Thrombozyten	
1.3.2 Die Lymphozyten	6
1.3.2.1 Oberflächenrezeptoren der Lymphozyten	6
1.3.2.2 T-Lymphozyten	7
1.3.2.3 T-Lymphozyten-Aktivierung	8
1.3.2.4 T-Helferzellen (CD3⁺/CD4⁺)	9
1.3.2.5 Zytotoxische T-Zellen / T-Suppressorzellen	
(CD3⁺/CD8⁺)	9
1.3.2.6 B-Lymphozyten	9
1.3.2.7 Natürliche Killerzellen	10

1.4	Entzündung	11
1.4.1	Entzündungsreaktion	11
1.4.2	Steuerung der Entzündung	12
1.5	Chemokine und Chemokinrezeptoren	14
1.5.1	Chemokine	14
1.5.2	Chemokinrezeptoren	17
1.5.3	Regulation der Chemokinrezeptoren auf verschiedenen Leukozytenpopulationen	17
1.5.4	Chemotaxis	19
1.6	Veränderungen der zellulären und humoralen Immunität nach chirurgischen Eingriffen	20
1.7	Fragestellung	21
2.	Patienten und Methoden	23
2.1	Studienart	23
2.2	Patientenauswahl	23
2.3	Probengewinnung	25
2.3.1	systemisch im Blut	25
2.3.2	lokal im Wundsekret	25
2.4	Analysemethoden	26
2.4.1	Aufarbeitung und Markierung der Zellen	26
2.4.2	Durchflußzytometrie	27

2.5	Untersuchte Parameter	28
2.6	Statistische Methoden	29
2.6.1	Deskriptive Statistik	29
2.6.2	Statistische Auswertung	30
3.	Ergebnisse	32
3.1	CD3 ⁺ -Lymphozyten	32
3.2	CD3 ⁺ /CD4 ⁺ -Lymphozyten	35
3.3	CD3 ⁺ /CD8 ⁺ -Lymphozyten	38
3.4	CCR5 exprimierende T-Helferzellen	41
3.5	CXCR3 exprimierende T-Helferzellen	44
3.6	CCR5 exprimierende T-Suppressorzellen	47
3.7	CXCR3 exprimierende T-Suppressorzellen	50
3.8	CCR5 exprimierende Nicht-T-Zellen	53
3.9	CXCR3 exprimierende Nicht-T-Zellen	56
4.	Diskussion	59
5.	Zusammenfassung	70

6. Abkürzungsverzeichnis	72
7. Literaturverzeichnis	75
8. Lebenslauf	80
9. Danksagung	82

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung des Immunsystems

Um den menschlichen Organismus gegen schädliche Einwirkungen von außen zu schützen, bedarf es einer differenzierten Abwehr.

Die mögliche Schädigung am Makroorganismus Mensch kann vielfältig sein. Sie kann zum einen das Eindringen eines infektiösen Erregers – also eine Antigenbelastung sein, zum anderen kann sie in Form einer physikalischen Schädigung auf den Körper wirken.

Infektiöse Erreger gibt es in der Umwelt sehr zahlreich, genannt seien die Gruppen von Bakterien, Viren, Pilzen, Protozoen und Parasiten. Viele können die intakte Haut des Menschen nicht durchdringen. Zugangswege zum menschlichen Organismus und damit Schwachstellen sind allerdings die Epitheloberflächen des Darmes und des Urogenitaltraktes, der Nasopharynx, die Lungen, der direkte Weg in die Blutbahn, als auch die verletzte Haut (Male und Roitt, 1995).

Die physikalische Schädigung des menschlichen Körpers kann durch Verletzung, bzw. Operation eintreten.

Das menschliche Immunsystem dient dazu, die Krankheitserreger zu bekämpfen oder noch besser zu eliminieren, die Integrität des menschlichen Körpers zu schützen, wiederherzustellen bzw. zumindest den verursachten Schaden möglichst klein zu halten.

1.2 Die Immunantwort

Jede Immunantwort besteht darin, im ersten Schritt das Pathogen bzw. die Schädigung zu erkennen und als zweiter Schritt, eine Reaktion dagegen aufzubauen. Man unterscheidet zwei Kategorien der Immunantworten.

Zum einen die angeborenen, nicht-adaptiven Antworten, zum anderen die erworbenen Immunantworten.

Die angeborene Immunantwort zeichnet sich dadurch aus, dass in einer Art ersten Verteidigungslinie verschiedene Arten von Phagozyten (Fresszellen) über unspezifische Erkennungsmechanismen an eingedrungene Mikroorganismen binden, sie „auffressen“ und zerstören.

Das besondere Merkmal der erworbenen Immunitäten ist die Spezifität, das heißt, das Immunsystem reagiert spezifisch auf ein bestimmtes Pathogen und kann sich nach stattgehabten Erstkontakt „erinnern“ und so die Abwehr optimieren. Hauptverantwortlich für diese Art der Abwehr sind die Lymphozyten.

1.3 Die Zellen des Immunsystems

Die Leukozyten stehen als übergeordnete Gruppe im Zentrum jeglicher immunologischer Reaktion. Sie treten im Rahmen der Abwehr mit verschiedenen Gewebszellen in Interaktion.

Man unterscheidet verschieden Typen von Leukozyten:

- Lymphozyten:
 - B-Zellen (produzieren Antikörper)
 - T-Zellen (produzieren Zytokine)
 - natürliche Killerzellen
(= LGL-Zellen / große, granuläre Lymphozyten)
(produzieren Zytokine)

- Phagozyten:
 - mononukleäre Phagozyten (produzieren Zytokine und Komplement/Chemokine)
 - Neutrophile
 - Eosinophile

- | | | |
|-----------------|----------------|--------------|
| - Helferzellen: | - Basophile | (produzieren |
| | - Mastzellen | Entzündungs- |
| | - Thrombozyten | Mediatoren) |

1.3.1 Die Phagozyten

Eine wichtige Gruppe von Leukozyten sind die Phagozyten, wozu die mononukleären Phagozyten der Monozyten/Makrophagen-Reihe, und die polymorphkernigen Granulozyten gehören.

Sie heften sich an Mikroorganismen an, verschlingen und zerstören sie. Da sie einfache, unspezifische Erkennungsmechanismen verwenden, durch die sie sich an eine Vielzahl von mikrobiellen Produkten binden können, vermitteln sie die angeborene, nicht-adaptive Immunantwort.

1.3.1.1 Mononukleäre Phagozyten

Die mononukleären Phagozyten leiten sich von Stammzellen des Knochenmarks ab. Sie sind mit einer Lebensdauer von Monaten bis Jahren vergleichsweise langlebig. Im Blut gehören die im Knochenmark entstandenen Monozyten zu dieser Reihe (Male und Roitt, 1995).

Nach der rezeptorvermittelten Auswanderung aus den Blutgefäßen werden Monozyten zu Gewebsmakrophagen, oder auch nur Makrophagen genannt. Man unterscheidet zwei Hauptfunktionen des mononukleären phagozytierenden Systems, die von verschiedenen Zelltypen wahrgenommen werden.

Zum einen sind dies die klassisch phagozytierenden Monozyten/Makrophagen, dessen Aufgabe es ist, Antigene zu beseitigen, also Krankheitserreger zu „fressen“ und somit unschädlich zu machen.

Die Makrophagen verfügen über eine Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptoren, die zum einen die Adhäsion und Aufnahme von Mikroorganismen in die Zelle vermitteln (z.B. CD14-Rezeptoren, Fc-Rezeptoren, Komplementrezeptoren), zum anderen als Empfangsstationen für Zytokin-vermittelte Aktionen dienen (z.B. IL4-Rezeptor, IFN γ -Rezeptor, Migrationshemmfaktor-Rezeptor).

Zwischen ihnen und den Lymphozyten bestehen Interaktionen in beträchtlichem Ausmaß, so führen die von T-Lymphozyten freigesetzten löslichen Stoffe (Zytokine) zu einer Aktivierung der Phagozytosefunktionen.

Aktivierte Makrophagen bilden auch selbst Zytokine, Komplementkomponenten und Prostaglandine, mit denen sie regulativ in die Immunantwort eingreifen.

Die zweite Zellgruppe der mononukleären Phagozyten gehört zu den antigen-präsentierenden Zellen (antigen-presenting-cells = APC). Ihre Aufgabe besteht darin, das phagozytierte Antigen den Lymphozyten zu präsentieren. Sie sind primär in der Haut, in Lymphknoten, Milz und Thymus zu finden. APC sind eine heterogene Population von Leukozyten mit hervorragenden immunstimulierenden Eigenschaften. Einige spielen eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Aktivität von T-Helferzellen, einige kommunizieren mit anderen Leukozyten.

1.3.1.2 Polymorphkernige Granulozyten **Neutrophile, Eosinophile, Basophile und Thrombozyten**

Polymorphkernige Granulozyten (Polymorphe) leiten sich ebenfalls von Stammzellen des Knochenmarks ab. Sie sind im Vergleich zu den mononukleären Phagozyten mit einer Lebensspann von zwei bis drei Tagen recht kurzlebig.

Granulozyten stellen 60-70% der gesamten Leukozyten im Blut dar, sind aber auch extravaskulär im Gewebe zu finden, da sie vergleichbar den Blutmonozyten

rezeptorvermittelt an den Endothelzellen der Blutgefäße adhären und dann die Gefäßwand penetrieren können (Lydyard und Grossi, 1995).

Obwohl diese Zellen keinerlei Spezifität für Antigene aufweisen, spielen sie zusammen mit Antikörpern und Komplement bei der akuten Entzündung eine wichtige Rolle. Ihre Hauptaufgabe ist hierbei die Phagozytose.

Reife Polymorphe enthalten einen gelappten Kern und viele Granula. Aufgrund der histologischen Anfärbbarkeit ihrer Granula unterscheidet man Neutrophile, Eosinophile und Basophile.

Die Neutrophilen stellen über 90% der im Blut zirkulierenden polymorphkernigen Granulozyten. Sie unterliegen verschiedenen chemotaktischen Faktoren, die Margination und Diapedese der Neutrophilen induzieren können. Von Neutrophilen phagozytierte Organismen werden in Vakuolen, den so genannten Phagosomen eingeschlossen, die dann mit den enzym-gefüllten Lysosomen zu Phagolysosomen verschmelzen.

Die Eosinophilen stellen 2-5% der Leukozyten im Blut. Neben der Fähigkeit zur Phagozytose werden sie durch den von T-Zellen, Mastzellen und Basophilen freigesetzten ECF-A (eosinophiler chemotaktischer Faktor der Anaphylaxie) angelockt und können auf entsprechende Reize hin degranulieren. Dabei setzen die Eosinophilen ein toxisches Protein als „granulierte Bewaffnung“ gegen größere, nicht-phagozytierbare Ziele ein.

Die Basophilen stellen weniger als 0,2% der Leukozyten im Blut. Reife Basophile enthalten unregelmäßig verteilte Granula, die von einer Membran umgeben sind. Auslöser der Degranulation ist gewöhnlich ein Allergen (kreuzvernetzte IgE-Moleküle). An dieser Stelle seien auch die histaminhaltigen Mastzellen genannt, die in ihren Eigenschaften den Basophilen sehr ähneln, jedoch nicht im Blutkreislauf, sondern nur in Körpergeweben zu finden sind. Ihr bei Degranulation freiwerdendes Histamin löst allergische Symptome aus.

Die Thrombozyten leiten sich von den Megakaryozyten aus dem Knochenmark ab und enthalten ebenfalls Granula. Die in großer Zahl im Blut vorkommenden Thrombozyten haben ihre entscheidende Aufgabe in der Blutgerinnung, sind aber auch an der Immunantwort beteiligt. Kommt es zu einer Verletzung des Gefäßendothels, lagern sich Thrombozyten an das Endothel an und aggregieren.

Dabei werden permeabilitätssteigernde Substanzen und Faktoren freigesetzt, die Komplementkomponenten aktivieren und dadurch Leukozyten anlocken.

1.3.2 Die Lymphozyten

Die Bildung von Lymphozyten findet in den primären oder zentralen lymphatischen Organen (Thymus und reifes Knochenmark) statt. Einige dieser Zellen wandern über den Kreislauf in sekundäre lymphatische Gewebe ein (Milz, Lymphknoten, Mandeln und mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe).

Die Lymphozyten stellen 20% aller Leukozyten. Sie sind langlebig und können als sogenannte Gedächtniszellen über viele Jahre bestehen bleiben.

Lymphozyten sind vollständig für die spezifische immunologische Erkennung von Pathogenen zuständig, und leiten deshalb die erworbene Immunantwort.

Man unterscheidet T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Beide Zelltypen besitzen Oberflächenrezeptoren für Antigene, üben aber unterschiedliche Funktionen aus. Eine dritte Lymphozytengruppe, die natürlichen Killerzellen (NK) tragen hingegen keine Antigenrezeptoren. Morphologisch sind das die großen, granulären Lymphozyten (LGL).

1.3.2.1 Oberflächenrezeptoren der Lymphozyten

Lymphozyten exprimieren verschiedene Moleküle oder „Marker“ auf ihrer Zelloberfläche, die zur Unterscheidung von Zellpopulationen dienen. Viele dieser Moleküle können durch spezifische monoklonale Antikörper identifiziert werden. Für diese Zelloberflächenmarker wurde eine systematische Nomenklatur entwickelt, das so genannte CD-System, in welchem die Marker fortlaufend nummeriert sind.

Die Bezeichnung CD „cluster of differentiation“ bezieht sich eigentlich auf Gruppen oder Cluster von monoklonalen Antikörpern, wobei jeder Cluster ganz spezifisch einen Zellmarker bindet. Diese CD-Nummerierung der Antikörper wird entsprechend auch zur Bezeichnung der Oberflächenmoleküle der Lymphozyten verwendet, die von der jeweiligen Gruppe monoklonaler Antikörper erkannt werden.

Man kann verschiedene CD-Marker definieren, die nur in bestimmten Zellphasen der Lymphozyten exprimiert werden. So unterscheidet man zwischen Stammzellmarkern, die charakteristisch für Lymphozyten-Stammzellen sind, Reifungsmarker, die in den unterschiedlichen Stadien der Zellreifung zu finden sind und Aktivierungsmarker, die erst exprimiert werden, wenn die Zelle durch verschiedenartige Stimuli aktiviert wurde.

Oberflächenmoleküle (Marker) lassen sich mit Hilfe von fluoreszierenden, monoklonalen Antikörpern darstellen. Unter Zuhilfenahme der Strömungszytometrie lassen sich auf diese Weise die Zellen zählen und aufgrund ihrer Größe und Fluoreszenzintensität separieren.

1.3.2.2 T-Lymphozyten

Der definitive Stammmarker aller T-Lymphozyten ist der T-Zell-Antigenrezeptor (TCR).

Es gibt zwei definierte Typen, TCR-1 und TCR-2, die über ihr Vorhandensein die T-Zellen typisieren. Eine T-Zelle ist so definiert, dass sie entweder den TCR-1 oder den TCR-2 besitzt. Der vollständige T-Zell-Rezeptorkomplex enthält eine TCR-Einheit und daran assoziiert einen Satz von fünf Polypeptiden, den man als CD3⁺-Komplex bezeichnet. Im menschlichen Blut exprimieren T-Zellen zu über 90% den TCR-2 und zu unter 10% den TCR-1.

Die TCR-2 T-Lymphozyten können wiederum in zwei Populationen unterteilt werden. Zum einen die Untergruppe mit dem CD4-Marker (CD3⁺/CD4⁺), die hauptsächlich Immunantworten erzeugen hilft und deshalb auch T-Helferzelle (T_H-Zelle) genannt wird.

Zum anderen die Untergruppe mit dem CD8-Marker (CD3⁺/CD8⁺), die überwiegend zytotoxische Eigenschaften hat und deshalb auch zytotoxische T-Zelle (T_C-Zelle) oder T-Suppressorzelle genannt wird.

1.3.2.3 T-Lymphozyten-Aktivierung

Zur Antigen-spezifischen Aktivierung von T-Helferzellen in einer Immunantwort werden verschiedene Signale benötigt. Der entscheidende erste Schritt ist dabei die Präsentation vonprozessierten Antigenen auf den MHC-Komplexen (major histocompatibility complexes) der antigen-präsentierenden Zellen (APCs). Dieser pMHC-Komplex bindet anschließend an den TCR2 und den CD4⁺- bzw. CD8⁺-Corezeptor auf den T-Zellen.

Auf diese Bindung erfolgt die zweite Stufe der Aktivierung, die Costimulation zwischen den T-Zellen und den APCs (Croft, 1997). Es ist eine Vielzahl von costimulatorischen Molekülen bekannt, die bei der T-Zell-Aktivierung unterschiedliche Aufgaben erfüllen, z.B. Interleukin-1 und Interleukin-12 aus Makrophagen.

Zusätzlich sind noch verschiedene Adhäsionsmoleküle beteiligt, um zwischen den beiden Zellen (T-Lymphozyten und APCs) einen festen Kontakt herzustellen. Der gesamte Aktivierungsprozess mündet in der Formation einer immunologischen Synapse, in der die beteiligten Membranproteine vereint werden (Bromley, 2001; Grakoui 1999) und so zu einem engen Kontakt zwischen beiden Zellen führen. Insbesondere für die Ausschüttung von Effektormolekülen (Zytokinen und Chemokinen) ist der Aufbau eines dauerhaften und räumlich engen Kontakts von großer Bedeutung.

Erst bei ausreichender Aktivierung der Zellen erfolgt eine klonale Expansion (Lumsden, 2003), das heißt, die aktivierten T-Zellen schütten Zytokine/Chemokine aus und proliferieren.

Gleichzeitig differenzieren die naiven T-Zellen (T_{H0}-Zellen) und werden so zu Effektorzellen mit verschiedenen Aufgaben.

Man unterscheidet zwei Effektorpopulationen: T-Helferzellen (CD3⁺/CD4⁺) und zytotoxische T-Zellen / T-Suppressorzellen (CD3⁺/CD8⁺).

1.3.2.4 T-Helferzellen (CD3⁺/CD4⁺)

Zu den Hauptaufgaben der T-Helferzellen (T_H), auch CD3⁺/CD4⁺-Zellen gehört die aktive Hilfe zur Etablierung einer gezielten Immunantwort. Sie leiten dabei die Effektormechanismen anderer Immunzellen, wie z.B. der B-Zellen und der Makrophagen, ein und koordinieren das Zusammenspiel der verschiedenen Immunzellen. Dies geschieht zum größten Teil über die Ausschüttung von Zytokinen/Chemokinen und der Regulation von Oberflächenrezeptoren. Anhand ihres Zytokin-Profiles unterscheidet man T_H1-Zellen und T_H2-Zellen.

Die T_H1-Zellen sezernieren IL-2, IFN_γ und TNF_β. Die T_H1-Zellen vermitteln verschiedene Funktionen im Zusammenhang mit Zytotoxizität und lokalen Entzündungsreaktionen, sie bekämpfen intrazelluläre, mikrobiologische Pathogene mit Hilfe von Makrophagen → zelluläre, zytotoxische Immunantwort.

Die T_H2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Die T_H2-Zellen stimulieren die B-Lymphozyten zur Proliferation und zur Antikörperproduktion und wirken damit primär im Sinne der humoralen Immunität als Schutz gegen „frei lebende“ Mikroorganismen → humorale Immunantwort (Roitt 1995; Santana 2003).

1.3.2.5 Zytotoxische T-Zellen / T-Suppressorzellen (CD3⁺/CD8⁺)

Fast alle zytotoxischen Aktivitäten von CD3⁺/CD8⁺-Zellen werden durch die Exozytose von Granula oder den Fas-Liganden – Fas-Rezeptor Signalweg vermittelt. Zytokine der CD3⁺/CD8⁺-Zellen wie TNF_α hingegen tragen nur einen kleinen Teil zur zytotoxischen Aktivität bei.

1.3.2.6 B-Lymphozyten

B-Zellen repräsentieren etwa 5-15% der zirkulierenden lymphatischen Zellen und sind durch die Anwesenheit von Oberflächenimmunglobulinen (IgA, IgD, IgE, IgG,

IgM) definiert. Diese Immunglobulinmarker werden von der Zelle selbst produziert. Diese Moleküle sind in die Oberflächenmembran der B-Zelle eingefügt und fungieren dort als spezifische Antigenrezeptoren.

Antikörper (Ak), auch Immunglobuline (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) genannt, stellen eine Gruppe von Serumolekülen dar, die von B-Lymphozyten produziert werden. Sie sind sozusagen die lösliche Form des Antigenrezeptors von B-Zellen. Alle Antikörper haben die gleiche Grundstruktur, unterscheiden sich jedoch in ihrer

Antigenbindungsstelle. Im Allgemeinen kann ein Antikörper ganz spezifisch nur ein Antigen binden. Während ein Teil des Antikörpers an das Antigen bindet (der Fab-Anteil), kann der andere Teil des Antikörpers (Fc-Anteil) an verschiedene Zellen des Immunsystems binden. So fungieren Antikörper als flexible Adaptoren, indem sie Bestandteilen des Immunsystems das Erkennen spezifischer Pathogene und ihrer Produkte ermöglichen. Neutrophile, Makrophagen und andere mononukleäre Phagozyten haben Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, über die sie Antikörpervermittelt Pathogene binden und dann phagozytieren können.

B-Lymphozyten und ihre Antikörper sind somit Hauptträger der humoralen Immunität. Daneben exprimieren die B-Zellen verschiedene CD-Marker und MHC-Klasse-II-Antigene, die mit der Aktivierung und der Verteilung der Zellen im Zusammenhang stehen, sowie für die Kooperation mit T-Zellen wichtig sind.

1.3.2.7 Natürliche Killerzellen

Die natürlichen Killerzellen (NK) sind Lymphozyten, die über die Oberflächenmarker CD56 und/oder CD16 eindeutig identifiziert werden können.

Eine direkte Stimulation mit IL-2 führt zur Aktivierung der natürlichen Killerzellen, die dann über Freisetzung ihrer azurophilen Granula unspezifische zytotoxische Funktionen ausüben.

Aktivierte NK-Zellen können nicht nur bestimmte Tumorzellen töten, sondern sind auch zytotoxisch für virusinfizierte Zellen und für Zielzellen, die mit IgG-Antikörpern beschichtet sind.

NK-Zellen können auch Interferon γ (IFN γ) und andere Zytokine freisetzen, die bei der Regulation der Hämatopoese und der Immunantwort eine Rolle spielen.

1.4 Entzündung

1.4.1 Entzündungsreaktion

Eine Entzündung ist die Reaktion des Körpers auf das Eindringen eines infektiösen Erregers, eine Antigenbelastung oder auf eine physikalische Schädigung, z.B. das Trauma einer Operation (Male, 1995).

Im Rahmen einer Gewebeschädigung, sowohl durch chirurgisch-akzidentelle, als auch durch elektive Traumen wird lokal am Ort der Gewebeschädigung, wie auch systemisch, eine Kaskade von immunologischen Ereignissen induziert (Heinrich, 1990). Bestandteile des Immunsystems müssen vermehrt an den Ort der Entzündung transportiert werden. Dabei spielen im Wesentlichen drei Vorgänge eine wichtige Rolle (Male, 1995):

- Die Blutversorgung des betroffenen Bereichs wird erhöht.
- Die Permeabilität der Kapillaren wird durch Refraktion der Endothelzellen erhöht. So kann das Endothel von Molekülen passiert werden, die normalerweise zu groß dafür wären. Auf diese Weise können Antikörper, Zytokine, Komplement und Moleküle anderer Plasmaenzymssysteme zum Entzündungsherd bzw. Ort des Traumas vordringen.
- Leukozyten treten aus den Kapillaren in das entzündete/geschädigte Gewebe aus. Sie unterliegen bei ihren gerichteten Bewegungen chemotaktischen Signalen.

1.4.2 Steuerung der Entzündung

Die Entwicklung entzündlicher Prozesse wird gesteuert von Zytokinen, von Produkten der Plasmaenzymssysteme und von vasoaktiven Mediatoren, die von Mastzellen, Basophilen und Thrombozyten freigesetzt werden. Unterschiedliche Entzündungsprozesse werden von unterschiedlichen Mediatoren gesteuert.

Die Kommunikation zwischen den beteiligten Zellen wird dabei im Wesentlichen von Zytokinen vermittelt. Sie regulieren sowohl Dauer als auch Stärke der Immunantwort, indem sie das Überleben, die Proliferation, Reifung, Differenzierung, Migration und eine Vielzahl anderer Parameter der Leukozyten beeinflussen. Zytokine sind in der Lage, im umgebenden Gewebe zu signalisieren und so z.B. eine lokale Ansammlung spezifischer Immunzellen und deren Aktivierung hervorzurufen.

Eine Klassifizierung der Zytokine kann man anhand ihrer biologischen Hauptaktivität vornehmen (Hack, 1997):

- Pro-Inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, TNF α und IFN γ
- Anti-Inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF β
- Zytokine, die zur Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten führen, wie IL-2 und IFN γ
- Zytokine, die ihre Hauptwirkung in der Entstehung und Entwicklung neuer Leukozyten haben (hämatopoetische Wachstumsfaktoren)
- Zytokine, die Einfluss auf Zellwachstum und Differenzierung haben
- Zytokine, die die Zellwanderung der verschiedenen Populationen kontrollieren, so genannte Chemokine

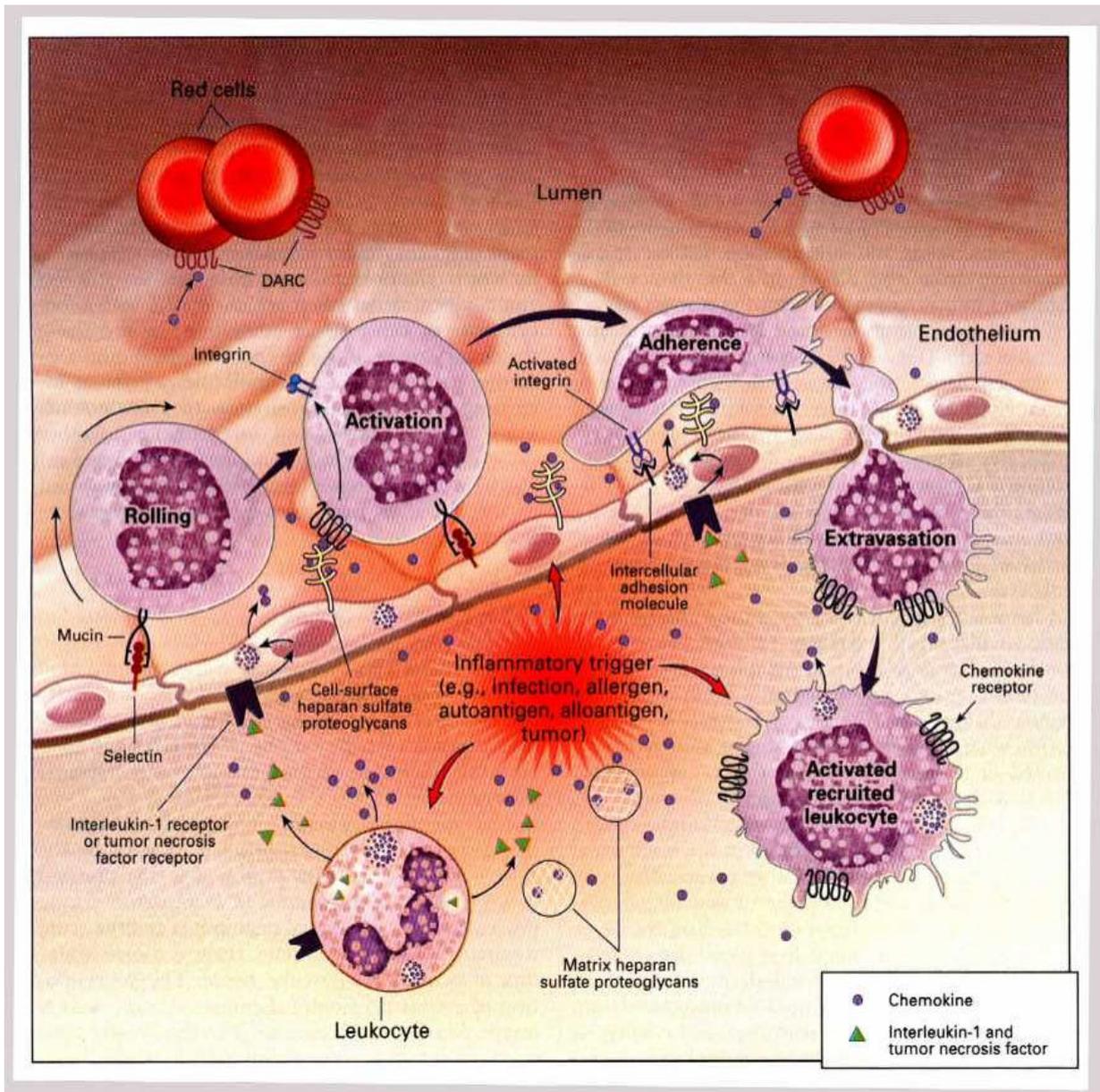


Abbildung 1: “Chemokine Regulation of Leukocyte Movement” aus Luster, A.D. (1998). Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New England J Medicine* 338(7): 436-42.

1.5 Chemokine und Chemokinrezeptoren

1.5.1 Chemokine

Bei den Chemokinen handelt es sich um eine Untergruppe der Zytokine. Die Chemokine sind kleine (~8-14 kDa), meist basische und lösliche Moleküle, die die Zellwanderung von verschiedenen Zellpopulationen steuern.

Bis heute sind beim Menschen ca. 50 Chemokine identifiziert worden.

Der Name entstand aus „chemotaktisch aktiven Zytokine“, sprich Chemokine.

Eine konservierte Sequenz von Aminosäuren dient zur Einteilung der einzelnen Chemokine in vier Gruppen (Nelson, 1998). Aus der Primärsequenz werden dazu vier konservierte Cysteine herangezogen, es gibt C-, CC-, CXC- und CXXXC-Chemokine. Das X repräsentiert jeweils eine zwischen den Cysteinen liegende Aminosäure. In Abbildung 1 ist ein Chemokin der CC-Gruppe dargestellt. Dieses CCL5-Chemokin auch RANTES genannt bindet z.B. an den CCR5-Rezeptor auf T_H1-Zellen.

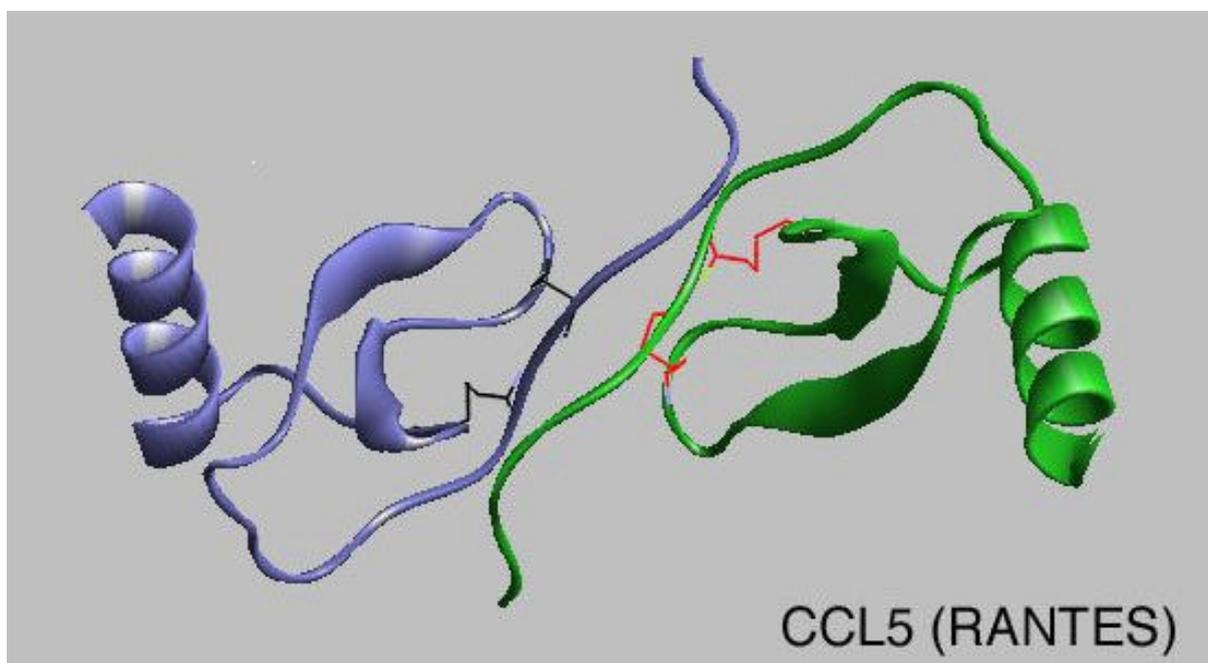


Abbildung 2: CCL5 (RANTES) – Chemokin aus <http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html>

Für viele der bekannten Chemokine existieren mehrere Namen (z.B. MCP, MIP, Eotaxin, RANTES) so dass kürzlich eine neue, einheitliche Nomenklatur eingeführt wurde, bei der die Reihenfolge der Cysteine mit einem L für Ligand und einer Zahl (z.B. CCL3, CCL5, CXCL3) kombiniert wurde (Zlotnik, 2000). Chemokine wirken hochgradig redundant (Mantovani, 1999), d.h. viele der bekannten Proteine wirken nicht nur auf eine Zellpopulation alleine. Zudem exprimieren die jeweiligen Leukozytenpopulationen mehrere Rezeptoren für Chemokine. Dabei können diese Rezeptoren mit den verschiedenen Chemokinen einer Klasse interagieren. So binden z.B. alle vier MCP-Moleküle (MCP-1-4) an den Rezeptor CCR2 (CC-Chemokin-Rezeptor-2), wobei aber MCP-2, MCP-3 und MCP-4 auch an die Rezeptoren CCR1 und CCR3 binden können (Mantovani, 1999). In der Abbildung 2 ist diese Redundanz in einem Schema dargestellt.

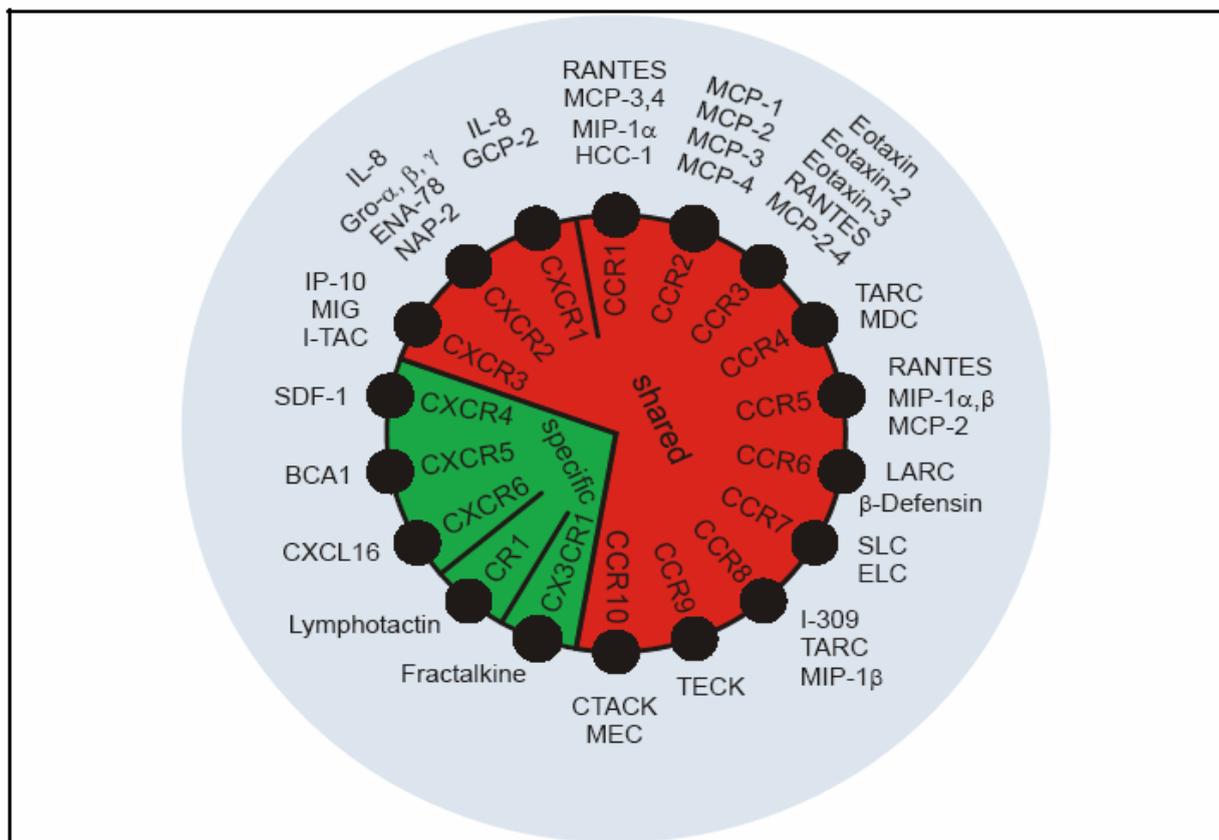


Abbildung 3: Redundanz einiger humaner Chemokinrezeptoren und deren Liganden aus Mantovani, A. (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. Immunol Today 20(6): 254-7.

Dies dient der Regulation und der zielgenauen Wanderung der Leukozyten im Gewebe und führt so zu einem eng verflochtenen Netzwerk an Interaktionen der bei der Immunantwort beteiligten Zellen. In der Abbildung 2 ist diese Redundanz in einem Schema dargestellt.

Als Produzent für Chemokine sind eine Vielzahl von Zellen bekannt, neben Leukozyten auch Zellen, die nicht dem Immunsystem angehören, wie z.B. Endothelzellen (Rollins, 1990) oder verschiedene Epithelien (Standiford, 1991; Choi, 1992). Ebenso vielfältig ist die Palette der Stimuli, die im Rahmen einer Entzündungsreaktion eine Chemokinproduktion auslösen können (Baggiolini, 1994). Entzündungsreaktionen des Körpers und damit auch Chemokinproduktionen werden ausgelöst durch das Eindringen eines infektiösen Erregers, eine Antigenbelastung oder durch eine physikalische Schädigung, z.B. das Trauma einer Operation (siehe 1.4.1 und 1.4.2).

Man geht davon aus, dass die freigesetzten Chemokine mit der Gewebematrix interagieren, insbesondere mit Proteoglycanen und Glycosaminoglycanen (Tanaka, 1993). Dadurch werden die Chemokine an ihrem Wirkungsort gehalten.

Wird z.B. IL-8 ins Gewebe gespritzt, so ist es noch mehrere Stunden danach aktiv (Colditz, 1990). Ähnliche Effekte konnten auch für MIP-1 β und RANTES gezeigt werden. Diese Beobachtungen tragen zu dem Konzept bei, dass die Leukozytenmigration eher durch einen festen, als durch einen löslichen Chemokingradienten vermittelt wird (Baggiolini, 1997).

1.5.2 Chemokinrezeptoren

Bei den Rezeptoren (R) der Chemokine handelt es sich ausschließlich um 7-Transmembranproteine, deren Signaltransduktion an G-Proteine gekoppelt ist. Von einer Ausnahme abgesehen, binden die Chemokinrezeptoren nur Chemokine aus einer einzigen Klasse, so dass sich die Einteilung der Rezeptoren nach der Struktur der Liganden richtet.

Die Chemokinrezeptoren werden dementsprechend in CR (1), CCR (1-10), CXCR (1-6), CXXXCR (1) eingeteilt (Baggiolini et al., 1997, Luster, 1998).

Die Ausnahme der Chemokinrezeptoren bildet der DARC/Duffy-Rezeptor auf Erythrozyten, der sowohl CC-, als auch CXC-Chemokine binden kann (Darbonne, 1991).

Chemokinrezeptoren liegen in unterschiedlichen Konformationen vor. Durch monoklonale Antikörper konnte gezeigt werden, dass durch verschiedene dreidimensionale Strukturen unterschiedliche Antworten der Rezeptoren ausgelöst werden, z.B. Endozytose oder G-Protein-Kopplung (Blanpain, 2002).

1.5.3 Regulation der Chemokinrezeptoren auf verschiedenen Leukozytenpopulationen

Die Expression der Chemokinrezeptoren auf Leukozyten ist stark vom Aktivierungs- und Differenzierungszustand der Zellen abhängig. Aufgrund der Chemokinrezeptor-Expression lassen sich deswegen auch unterschiedliche Subpopulationen bei den Leukozyten erkennen.

Chemokine	Receptor	Cell Type
		
MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR1 CCR3	Eosinophil 
MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR2 CCR3	Basophil 
MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES I-309 MDC, HCC-1, TECK	CCR1 CCR2 CCR5 CCR6 ?	Monocyte 
Fractalkine	CX ₃ CR1	
SDF-1	CXCR4	
MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 TARC MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES MIP-3 β (ELC) PARC, SLC, 6CKine (Exodus-2)	CCR1 CCR2 CCR4 CCR5 CCR7 ?	Activated T cell 
Fractalkine	CX ₃ CR1	
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	
PARC, DC-CK1 Lymphotactin	? ?	Resting T cell 
SDF-1	CXCR4	
MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin 1, 2; RANTES TARC MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES MIP-3 γ (IARC, Exodus-1) MDC, TECK	CCR1 CCR2 CCR3 CCR4 CCR5 CCR6 ?	Dendritic cell 
SDF-1	CXCR4	
Interleukin-8, GCP-2 Interleukin-8, GCP-2; GRO- α , - β , - γ ; ENA-78; NAP-2; LIX	CXCR1 CXCR2	Neutrophil 
MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES	CCR2 CCR5	Natural killer cell 
Fractalkine	CX ₃ CR1	
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	

Abbildung 4: "Chemokines and their Receptors"
 aus Luster, A.D. (1998). Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. New England J Medicine 338(7): 436-42.

Neben der Einteilung der T-Zellen in T-Helferzellen (CD3⁺/CD4⁺) und zytotoxische T-Zellen / T-Suppressorzellen (CD3⁺/CD8⁺), können diese unter anderem anhand ihres Chemokinrezeptor-Profiles weiter unterteilt werden.

So unterscheiden sich T_H1-Zellen und T_H2-Zellen in ihrer Rezeptorexpression.

→ T_H1-Zellen exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3.

→ T_H2-Zellen exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR3 und CCR4.

1.5.4 Chemotaxis

Chemotaxis bezeichnet die zielgerichtete Bewegung von Zellen entlang dem Konzentrationsgradienten eines chemotaktischen Moleküls, in diesem Fall zu einem Entzündungsherd oder einer Immunreaktion, wie sie auch bei chirurgischem Trauma hervorgerufen wird.

Zahlreiche Mediatoren, wie z.B. Histamin können zwar die Gesamtmobilität von Immunzellen verstärken, lösen aber keine gerichtete Migration aus.

Diese Eigenschaft wird als Chemokinese bezeichnet und hauptsächlich den Wirkmechanismen zwischen Chemokinen und Chemokinrezeptoren zugeschrieben.

Um eine gerichtete Migration auszulösen, muss die Zelle auf die Gradienten der chemotaktischen Mediatoren ansprechbar sein. Das Konzentrationsgefälle zwischen zwei Polen einer Zelle wird mit nicht mehr als 0,1% eingeschätzt. Trotzdem erkennen die Zellen diesen Unterschied und bewegen sich entsprechend fort.

So können Chemokine zahlreiche unterschiedliche Zellen des Immunsystems aktivieren und zielgerichtet „taktieren“.

Die Zellen, die als erste am Ort des Entzündungsgeschehens angekommen, sind in dem aktivierten Zustand ihrerseits in der Lage, über Freisetzung von Chemokinen weitere Zellen anzulocken.

1.6 Veränderungen der zellulären und humoralen Immunität nach chirurgischen Eingriffen

Die T_H1-Zellen sezernieren IL-2, IFN_γ und TNF_β. Die T_H1-Zellen vermitteln verschiedene Funktionen im Zusammenhang mit Zytotoxizität (Induktion zytotoxischer T-Zellen) und lokalen Entzündungsreaktionen, sie bekämpfen intrazelluläre, mikrobiologische Pathogene mit Hilfe von Makrophagen
→ zelluläre, zytotoxische Immunantwort.

Die T_H2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Die T_H2-Zellen stimulieren die B-Lymphozyten zur Proliferation und zur Antikörperproduktion und wirken damit primär im Sinne der humoralen Immunität als Schutz gegen „frei lebende“ Mikroorganismen
→ humorale Immunantwort (Roitt 1995; Santana 2003), (siehe 1.3.2.4).

Nach einem auf den Organismus einwirkenden Insult kann als Frühfolge eine Immunstimulierung beobachtet werden, die, je nach Insultintensität, von einer bald einsetzenden Immunsuppression gefolgt wird. In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass es nach chirurgischen Eingriffen zu einer Schwächung der zellulären, zytotoxischen Immunabwehr kommt, die durch Depletion von T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1-Zellen) im peripheren Blut charakterisiert ist (Decker et al., 1996). Untersuchungen bei Patienten nach videoendoskopischen und konventionellen Cholezystektomien und nach Leistenhernienoperationen zeigen eine postoperative Suppression der zellulären T_H1-Immunantwort bei gleichzeitiger Stimulation der humoralen – durch T-Helferzellen vom Typ 2 (T_H2-Zellen) gekennzeichneten – Immunität.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verschiebung des T_H1/T_H2-Gleichgewichtes entsprechen der Schwere des Gewebstraumas erfolgt (Decker et al., 1996). Die Bedeutung und genauen Mechanismen der zellulären Immunsuppression oder Immunparalyse bei Entzündungen, chirurgischen Eingriffen und Traumen sind erst ansatzweise aufgeklärt.

Untersuchungen konnten zeigen, dass zunächst T_H1-Zellen und deren Zytokine in der peripheren Blutbahn quantitativ abnehmen und es dadurch zu einem Überwiegen von T_H2-Zellen und zu einer T_H2-Immunantwort kommt.

Eine mögliche Erklärung der Verschiebung des T_H1/T_H2-Gleichgewichtes nach einem Gewebetrauma stellt das unterschiedliche Migrationsverhalten von T_H1- und T_H2-Zellen dar. Es wurde gezeigt, dass bei der lokalen Rekrutierung von T-Helferzellen in das entzündete Gewebe die Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin eine zentrale Rolle spielen. Diese binden vor allem T_H1-Zellen, während T_H2-Zellen kaum festgehalten werden (Astrup et al., 1997; Sallusto et al., 1997).

In gleichem Sinne spiegelt auch die postoperative quantitative Abnahme der T_H1-Zytokine im Serum (IL-2, IL-12, IFN_γ und TNF_α) bzw. Zunahme der T_H1-Zytokine im Drainage-Sekret das Abwandern der T_H1-Zellpopulation in das traumatisierte Gewebe wider. Ebenso konnte eine postoperativ systemische Konzentrationszunahme der T_H2-Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-10) bestätigt werden (Franke, 2003). Die T_H1-Zellen führen zur Aktivierung zytotoxischer Abwehrmechanismen am Ort der Entzündung. Es konnte eine umgekehrte Korrelation zwischen den T_H1-Zellen im peripheren Blut und in der Drainageflüssigkeit nach chirurgischen Eingriffen festgestellt werden (Decker et al., 1996).

Dabei scheint die schnelle Verschiebung des T_H1/T_H2-Gleichgewichtes im peripheren Blut ein guter Indikator für die Schwere eines lokal chirurgischen Traumas zu sein.

1.7 Fragestellung

Die genauen Mechanismen der zellulären Immunsuppression oder Immunparalyse bei Entzündungen, chirurgischen Eingriffen und anderen Formen der körperlichen Belastung sind erst ansatzweise aufgeklärt. Ebenso ist über die lokale Akkumulation und Funktion von Immunzellen in der Peritonealflüssigkeit in Relation zu den Immunzellen im Blut nach elektiven chirurgischen Traumen bisher wenig bekannt.

Es konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen eines operativen Eingriffs zur postoperativen Suppression der zellulären, zytotoxischen T_H1-Immunantwort bei

gleichzeitiger Stimulation der humoralen – durch T-Helferzellen vom Typ 2 (T_H2-Zellen) gekennzeichneten – Immunität kommt.

Die Fragestellung ist, auf welche Weise es bei chirurgischen Eingriffen zu dieser Herabregulierung der zellulären, zytotoxischen Immunität, und der damit verbundenen Erniedrigung der T_H1-Zellen im peripheren Blut kommt.

Die Tatsache, dass außerdem festgestellt werden konnte, dass T_H1-Zellen in der Drainageflüssigkeit nach chirurgischen Eingriffe akkumulieren, unterstützt die These, dass T_H1-Zellen zum Ort des chirurgischen Traumas bzw. der lokalen Entzündung abwandern.

Neben Adhäsionsmolekülen wie Selektinen und Integrinen, sowie Zytokinen scheinen Chemokine und deren Rezeptoren eine Schlüsselrolle bei lokalen Zellrekrutierungsprozessen zu spielen. Man nimmt an, dass das gezielte Abwandern von T_H1-Zellen aus dem peripheren Blut an den Ort des chirurgischen Traumas bzw. der lokalen Entzündung chemotaktisch gesteuert ist.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist eine Bewertung der Rolle der Chemokinrezeptoren bei der Migration von T-Helferzellen an den Ort des chirurgischen Traumas bzw. der lokalen Entzündung.

Ziel ist es, durch genauere Kenntnisse der postoperativen Mechanismen der Immunsuppression, potentielle Ansatzpunkte für zukünftige Therapien zu entwickeln.

2. Patienten und Methoden

2.1 Studienart

Bei der Studie handelt es sich um eine prospektive Untersuchung.

Es wurden immunregulative Parameter bei Patienten untersucht, die einem abdominal-chirurgischen Trauma unterzogen wurden.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn genehmigt und auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt.

2.2 Patientenauswahl

Insgesamt wurden 21 Patienten in die Studie aufgenommen, an denen unterschiedliche elektive abdominal-chirurgische Eingriffe vorgenommen wurden. Das intraoperative Trauma war bei allen Patienten groß genug, um intra- und postoperativ ausreichend Drainagesekret für die Untersuchungen gewinnen zu können.

Bei den untersuchten Patienten handelt es sich um elf männliche und zehn weibliche Patienten.

Einer Operation an Magen oder Speiseröhre wurden insgesamt zehn Patienten unterzogen, davon sieben männliche und drei weibliche Patienten. Zur Anwendung kamen folgende chirurgische Operationsverfahren:

Es wurden fünf laparoskopische Fundoplikationen mit Hiatoplastik durchgeführt, jeweils bei Patienten mit Refluxösophagitis II° im Rahmen von Hiatusinsuffizienzen, bzw. Hiatushernien. Eine Patientin mit Magencarcinom (histologisches Stadium: pT1, G1) wurde einer Gastrektomie unterzogen. Bei einer Patientin mit einem gastrointestinalen Stromatumor des Magens, der Pankreas und Colon transversum

infiltrierte, wurde eine En-bloc-Resektion des Tumors durchgeführt. Bei einem Patienten mit einem fortgeschrittenen Adenocarcinom des Magenausgangs wurde im Rahmen einer explorativen Laparotomie eine Gastroenterostomie angelegt. Einer Patientin wurde bei tubulärem Antrumadenom und chronischer Cholezystitis einer Magenwandexzision und Cholezystektomie unterzogen. Einmal wurde eine abdomino-rechtsthorakale und collare Ösophagusresektion bei Ösophaguscarcinom (histologisches Stadium: pT1, pN1) durchgeführt. Das Alter der Patienten zum Operationszeitpunkt lag zwischen 32 und 73 Lebensjahren.

Einer Operation an Leber oder Gallenblase wurden insgesamt vier Patienten unterzogen, davon zwei männliche und zwei weibliche Patienten. Zur Anwendung kamen folgende chirurgische Operationsverfahren:

Bei einem Patienten mit symptomatischer Cholezystolithiasis wurde eine laparoskopische Cholezystektomie durchgeführt. Zwei Patienten erhielten eine konventionelle, offene Cholezystektomie. Eine atypische Leberteilresektion und eine Cholezystektomie wurden bei einem Patienten mit einer Lebermetastase eines Sigmacarcinoms im Segment V der Leber durchgeführt. Das Alter der Patienten zum Operationszeitpunkt lag zwischen 64 und 73 Lebensjahren.

Einer Operation am Darm wurden insgesamt sieben Patienten unterzogen, davon zwei männliche und fünf weibliche Patienten. Zur Anwendung kamen folgende chirurgische Operationsverfahren:

Zweimal wurde jeweils bei stenosierender Sigmadivertikulitis eine laparoskopisch assistierte Sigmaresektion durchgeführt. Dreimal wurde eine offene Sigmakontinenzresektion durchgeführt, zweimal war hierbei die Operationsindikation durch ein Adenocarcinom des Sigmas gegeben (histologische Stadien: pT2, N0, M0, G2 und pT3, N0, M0, G2), einmal durch eine Outlet-Obstruktion, die durch ein Cul-de-sac Syndrom verursacht wurde. Ebenso wurde ein Patient mit einem tiefen Rektumcarcinom (histologisches Stadium: pT2, N0, M0), bei dem eine tiefe anteriore Rektumresektion durchgeführt wurde, sowie ein Patient mit metastasiertem Colonicarcinom, welches Pankreasschwanz und Milz infiltrierte und bei dem neben einer Hemicolektomie links, eine Splenektomie und eine Pankreaslinksresektion durchgeführt wurde, in die Studie aufgenommen. Alter der Patienten zum Operationszeitpunkt lag zwischen 45 und 77 Lebensjahren.

Tabelle 1: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der soziodemographischen Daten der Patienten

	Magen- Operation	Leber-/ Gallen- Operation	Darm- Operation	Operationen Gesamt
Alter (J)	52 \pm 3,4	69 \pm 3,1	65 \pm 2,8	62 \pm 2,7
Geschlechter- Verhältnis (m:w)	7:3	2:2	2:5	11:10

2.3 Probengewinnung

2.3.1 systemisch im Blut

Die Blutentnahme für die Messungen der Parameter im peripheren Blut erfolgte entweder durch Punktion einer peripheren Vene oder über einen liegenden zentralen Venenkatheter. Es erfolgten standardisierte Entnahmen 24 Stunden vor dem operativen Eingriff, sowie 24 und 48 Stunden nach Beendigung der Operation. Die dabei gewonnenen Blutproben wurden jeweils mit Heparin versetzt (Liquemin N 5000, 100 μ l/10ml). Die pro Patient entnommene Gesamtblutmenge betrug während des gesamten Untersuchungszeitraums weniger als 60ml.

2.3.2 lokal im Wundsekret

Intraoperativ wurde einmalig, eine Stunde nach Eröffnung des Bauchraumes, Sekret aus dem Douglasraum in ein steriles Röhrchen abgesaugt. Bei Beendigung der Operation wurde eine Easy-Flow-Drainage in den Douglasraum eingelegt. Das sich dort ansammelnde Sekret wurde in sterilen Drainagebeuteln aufgefangen und jeweils nach 24 und 48 Stunden abgelassen. Die Easy-Flow-Drainage wurde mit Heparin

benetzt. Der Auffangbeutel wurde mit 5ml Ringer-Lösung, 5ml Humanalbumin und 100µl Liquemin befüllt. Zur Probengewinnung wurden je 15 ml Drainageflüssigkeit entnommen.

2.4 Analysemethoden

2.4.1 Aufarbeitung und Markierung der Zellen

Mononukleäre Zellen wurden zunächst über die Standard Ficoll-Hypaque-Dichte-Gradient Zentrifugation (Pharmacia, Schweden) isoliert. Etwa 1×10^6 mononukleäre Zellen wurden im RPMI 1640 Medium (Biochrom, Deutschland) kultiviert und mit 100U/ml Penicillin, sowie 100µg/ml Streptomycin (Biochrom, Deutschland) ergänzt. Die Akkumulation und Anfärbung der Zellen wurde, wie von Jung et al., 1993 beschrieben, vorgenommen: die Zellen wurden bei 37°C mit 5nM Phorbol ester (PMA; Sigma, Deutschland) und 1µM Ionomycin (Sigma, Deutschland) stimuliert, bevor nach einer Stunde 1µg/ml Brefeldin A (Sigma, Deutschland) als Inhibitor des Membran-Ionen-Transports hinzugegeben wurde.

Die Zellen wurden mit PBS (Phosphate-Buffered Saline; Merck, Deutschland) fixiert. Mit 0,1% Saponinpuffer (0,1% in PBS; Riedel-de-Haen, Belgien) wurde anschließend die Zellmembran permeabilisiert. Die Zellen wurden dann mit unkonjugierten Antikörpern gegen CCR5 und CXCR3 (Sallusto, Basel/Schweiz) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die membranpermeabilisierenden Puffersubstanzen wurden nun ausgewaschen und mittels fluoreszierender Antikörper gegen CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gekennzeichnet. Die Evaluierung erfolgte mit Hilfe des Durchflußzytometers.

2.4.2 Durchflußzytometrie

Die Messung der Oberflächenmoleküle (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) der T-Lymphozyten, sowie der Chemokinrezeptoren (CCR5 und CXCR3) erfolgte mit Hilfe der FACSCalibur Durchflußzytometrie (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Die Multiparameter-Durchflußzytometrie ist eine universelle Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von zellulären Streulichteigenschaften und Fluoreszenzmessungen. Ihr Prinzip beruht auf der simultanen Messung verschiedener physikalischer und biochemischer Zelleigenschaften in einer Lösung auf Einzelzell-Ebene (Ruiz-Arguelles et al., 1992; Raffael et al., 1988; Stehen et al., 1990). Die Technik der Multiparameter-Durchflußzytometrie erlaubt die Charakterisierung verschiedener Zellpopulationen mit unterschiedlichen Zelloberflächenantigenen, die mit dem entsprechenden fluoreszierenden Antikörper markiert sind.

Zur Analyse wurden die vorbereiteten, präparierten, fixierten und fluoreszierenden Zellen in Suspension mit Überdruck in eine Messküvette gegeben. Der Zellstrom wurde durch die ihn umgebende Trägerflüssigkeit stark beschleunigt und an einem Laserstrahl vorbeigeleitet, wodurch die hydrodynamische Fokussierung erfolgte. Im Durchlicht wurde die ungefähre Größe jeder einzelnen Zelle, das Ausmaß an Granularität und verschiedene Fluoreszenzen und damit verschiedene Oberflächenmarker bzw. Chemokinrezeptoren in einer 90°-Ablenkung des Lichtstrahles gemessen. Um zu garantieren, dass die relativen Fluoreszenzwerte zwischen den Experimenten vergleichbar waren, wurde täglich zwischen den Messungen unterschiedlicher Proben eine Justierung und Eichung des Gerätes durchgeführt. Wenn notwendig erfolgte eine Justierung für jeden Zelltyp. Die Justierung und Eichung erfolgte mit „Calibrite-Beads“ (fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Mikrokügelchen, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) in Verbindung mit der Autocomputersoftware. Ein Röhrchen mit 200µl FACS-Flow wurde mit einem Tropfen Calibrite-Beads versetzt und in ein weiteres Röhrchen mit 600ml FACS-Flow gegeben. Neben den ungefärbten Beads wurde je ein Tropfen Fluoreszein-Isothiozyanat(FITC)-markierter und Phycoerythrin(PE)-markierter Beads

hinzugefügt. Gemäß den Vorgaben des Programms wurde die Spannung des Photomultipliers, die Sensivität des Gerätes sowie die Kompensation der Emissionsüberlappung zwischen den FITC- und den PE- markierten Beads eingestellt. Alle flowzytometrischen Protokolle wurden in Übereinstimmung mit den NCCLS-Bestimmungen H 42-T der Flowzytometrie durchgeführt (NCCLS, 1992).

2.5 Untersuchte Parameter

Zur Klassifizierung der Lymphozyten erfolgten die Untersuchungen verschiedener Oberflächenmarker der CD-Klassifikation.

Tabelle 2: Untersuchte Zelloberflächenmarker und deren Zelllokalisierung

Oberflächenmarker (OFM)	Zelllokalisierung
CD3 ⁺	T-Lymphozyten
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	T-Helferzellen
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	T-Suppressorzellen (= zytotoxische T-Zellen)

Neben der Einteilung der T-Lymphozyten in T-Helferzellen (CD3⁺/CD4⁺) und zytotoxische T-Zellen / T-Suppressorzellen (CD3⁺/CD8⁺), können diese unter anderem anhand ihres Chemokinrezeptor-Profiles weiter unterteilt werden.

So unterscheiden sich T_H1-Zellen und T_H2-Zellen in ihrer Rezeptorexpression:

→ T_H1-Zellen exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3.

→ T_H2-Zellen exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR3 und CCR4.

Tabelle 3: Untersuchte Chemokinrezeptoren auf verschiedenen Zellpopulationen

Chemokinrezeptor	untersuchte Zellpopulationen
CCR5	- T-Helferzellen - T-Suppressorzellen (= zytotoxische T-Zellen) - Nicht-T-Zellen
CXCR3	- T-Helferzellen - T-Suppressorzellen (= zytotoxische T-Zellen) - Nicht-T-Zellen

2.6 Statistische Methoden

2.6.1 Deskriptive Statistik

Bei den vorliegenden Daten handelt es sich um intervallskalierte Daten. Es wurden zum einen die gemessenen absoluten Werte untersucht, als auch in einem zweiten Schritt die relativen Werte, wobei die postoperativ gewonnenen Ergebnisse in Relation zu den prae- bzw. intraoperativ gewonnenen Ausgangswerten gesetzt wurden. Dazu wurden die Ausgangswerte jeweils gleich 100 (Prozent) gesetzt und die späteren Werte entsprechend umgerechnet. Von diesen Maßzahlen, welche einer Intervall- bzw. Absolutskala angehören, wurden die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) und die Standardabweichung der Stichprobe ermittelt. Der Standardfehler des Mittelwertes dient als Maß für die Unsicherheit der Schätzung des arithmetischen Mittelwertes.

Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Testes wurde für die intervallskalierten Daten getestet, ob sie einer Normalverteilung genügen. Er berechnet die maximale Distanz zwischen den Daten und der idealen kumulierten Häufigkeit. Der p-Wert als Signifikanz dieser Abweichung entspricht der Wahrscheinlichkeit des Auftretens dieses Wertes unter der Annahme, dass es sich bei den Daten um eine normalverteilte Grundgesamtheit handelt. Ein hoher p-Wert spricht also für eine Normalverteilung (Braeunig und Fitch, 1994; Ramm und Hofmann, 1987).

Die Daten wurden außerdem auf Korrelationen als relatives Maß für die lineare Abhängigkeit zweier Variablen untersucht. Für die normalverteilten und damit intervallskalierten Daten erfolgte die Berechnung des Korrelationskoeffizienten mit Hilfe der Pearson Korrelation. Die nicht normalverteilten Daten wurden mit der Spearman Rangkorrelation auf lineare Abhängigkeit untersucht. Der Korrelationskoeffizient r gibt den Grad der linearen Abhängigkeit an, d.h. $r = 1$ bedeutet völlige Determiniertheit, $r = 0$ keine lineare Abhängigkeit. Das Vorzeichen des Koeffizienten gibt an, ob es sich um eine positive oder negative Korrelation handelt, also ob die Werte der einen Variablen die gleiche Richtung der Linearität besitzen wie die Vergleichsvariable oder linear entgegengesetzt (negative Korrelation). Zusätzlich zum Korrelationskoeffizienten wird die einseitige Signifikanz zur Korrelation angegeben, welche mit $p < 0,05$ angibt, dass die Wahrscheinlichkeit für das zufällige Zustandekommen der berechneten Korrelation unter 5% liegt und somit von der linearen Abhängigkeit der beiden Variablen ausgegangen werden kann (Braeunig und Fitch, 1994; Ramm und Hofmann, 1987).

2.6.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Statistikprogramms Microsoft Excel[®] und WinSTAT[®] für Windows XP durchgeführt. Je nach Art der Daten erfolgten die Anwendung der verschiedenen statistischen Methoden und die statistische Auswertung.

Die Signifikanz wird mit dem so genannten p-Wert angegeben, wobei ein p-Wert $<0,05$ als schwach signifikant definiert wird, $p < 0,01$ als signifikant und $p < 0,001$ als hochsignifikant.

Bei den intervallskalierten Daten wurden verschiedene statistische Verfahren angewendet, in Abhängigkeit davon, ob die für einige Tests bestehende Voraussetzung der Normalverteilung der Stichprobengruppen gegeben war oder nicht. Bei den Daten der vorliegenden Studie handelt es sich außerdem stets um abhängige Stichproben. Lagen zwei intervallskalierte, normalverteilte abhängige Stichprobengruppen vor, so wurden die Ergebnisse mit dem t-Test für abhängige Stichproben miteinander verglichen, ansonsten wurde der Wilcoxon-Test für abhängige, nicht normalverteilte Daten benutzt. Waren die Varianzen der beiden Stichproben gleich (F-Test), so wurde der homogene T-Test angewandt. Bei Vorliegen heterogener Varianzen (Varianzen-Unterschiede der Stichproben sind im F-Test mit $p < 0,05$ signifikant) wurden die Prüfgröße t sowie die Zahl der Freiheitsgrade anders definiert und führten zu einem veränderten p-Wert, welcher für den heterogenen Fall Gültigkeit hat. Der t-Test ermittelt, ob zwischen den Mittelwerten zweier Messreihen ein signifikanter Unterschied besteht.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden die oben genannten, immunregulativen Parameter im Vollblut und im Drainagesekret von Patienten untersucht, die einem abdominalchirurgischen Trauma unterzogen wurden. Im Folgenden sind die Ergebnisse der jeweiligen Parameter aufgeführt.

Es wurden bei allen Parametern zum einen die Absolutwerte analysiert und verglichen. Zum anderen wurden ebenfalls bei allen Parametern der praeoperative Vollblut-Wert bzw. der intraoperative Drainagesekret-Wert als 100 Prozent festgelegt und dann die postoperativen Werte in Relation zu diesem gesetzt, da in einigen Fällen die Relativwerte eine prägnantere Aussage liefern als die Absolutwerte.

3.1 CD3⁺-Lymphozyten

Die folgende Tabelle 4 zeigt die Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CD3⁺-Lymphozyten im Vollblut und im Drainagesekret zu den drei verschiedenen Abnahmezeitpunkten prae- bzw. intraoperativ, 24 Stunden postoperativ und 48 Stunden postoperativ.

Tabelle 4: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CD3⁺-Lymphozyten zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

CD3 ⁺ - Lymphozyten	Vollblut		Drainage		Signifikanz p
	MW	\pm S.E.M.	MW	\pm S.E.M.	
prae-/intraoperativ	67,49	2,57	68,96	2,11	< 0,05
24h postoperativ	63,34	2,49	67,07	2,44	< 0,001
48h postoperativ	65,78	2,05	67,63	2,75	< 0,05
CD3⁺- Lymphozyten (100%)					
prae-/intraoperativ	100,00		100,00		
24h postoperativ	94,46	3,02	95,20	3,39	Ø
48h postoperativ	98,44	2,34	99,37	5,76	Ø

Die in Tabelle 4 aufgeführten Mittelwerte für CD3⁺-Lymphozyten zeigen einen schwach signifikanten Unterschied zwischen den praeoperativ gemessenen Vollblut-Werten und den intraoperativ gemessenen Drainagesekret-Werten. So dass während einer Operation bereits mehr CD3⁺-Lymphozyten am Ort des chirurgischen Traumas als im Vollblut sind. 24 Stunden nach chirurgischem Trauma sind die CD3⁺-Lymphozyten im Vollblut hochsignifikant gegenüber dem praeoperativen Wert abgesunken. Im Drainagesekret zeigt sich hingegen in dem gleichen Zeitraum nur eine schwach signifikante Verminderung, so dass 24 Stunden postoperativ ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den CD3⁺-Lymphozyten im Vollblut gegenüber denen im Drainagesekret besteht.

Außerdem zeigt sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Vollblut- und Drainagesekret-Werte zu allen drei Abnahmezeitpunkten ($r = 0,91$ bis $0,94$).

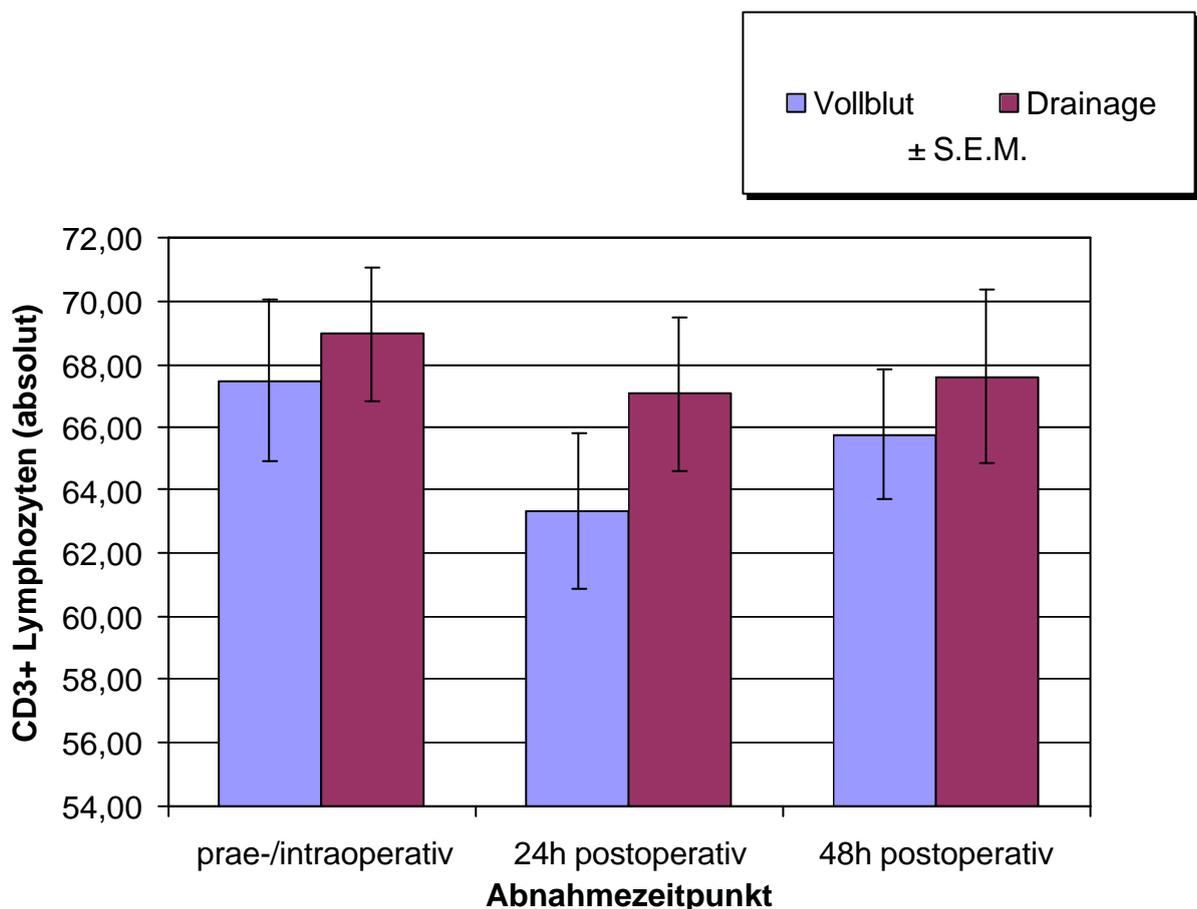


Abbildung 5: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CD3⁺-Lymphozyten (absolut) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkt

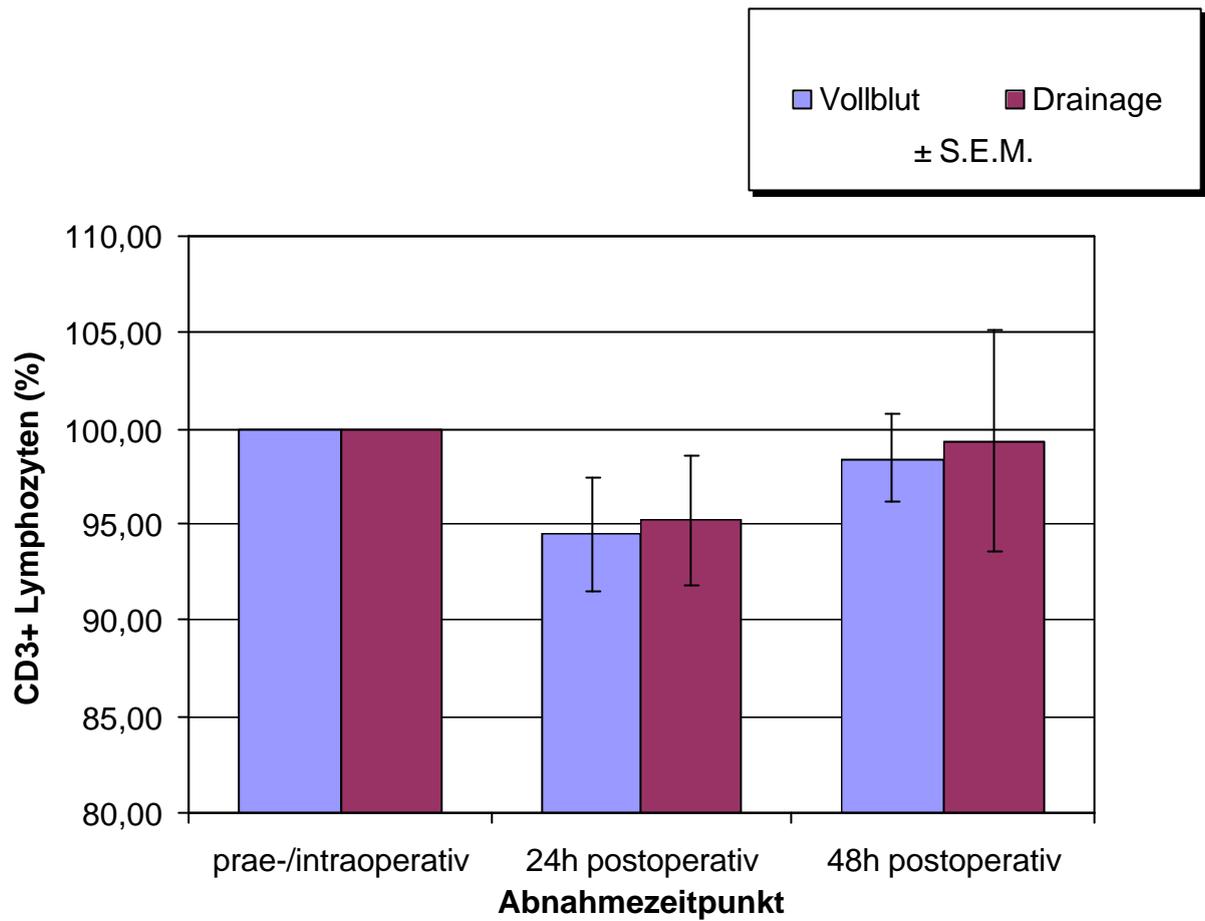


Abbildung 6: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CD3⁺-Lymphozyten (in %) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkt

3.2 CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten

Tabelle 5: Mittelwerte (± S.E.M.) der CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

CD3 ⁺ /CD4 ⁺ Lymphozyten	Vollblut		Drainage		Signifikanz p
	MW	± S.E.M.	MW	± S.E.M.	
prae-/intraoperativ	45,75	2,15	40,38	2,49	< 0,05
24h postoperativ	44,34	1,97	43,38	3,15	∅
48h postoperativ	47,41	2,03	43,90	3,27	∅
CD3⁺/CD4⁺ Lymphozyten (100%)					
prae-/intraoperativ	100		100		
24h postoperativ	99,26	5,27	103,17	6,43	∅
48h postoperativ	105,12	4,13	109,57	6,65	∅

Die Gruppe der CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten ist eine Untergruppe der Gesamtheit der CD3⁺-Lymphozyten und auch benannt als T-Helferzellen.

Wie an den Mittelwerten in der Tabelle 5 dargestellt, kommt es 24 Stunden nach chirurgischem Trauma zu einem kurzfristigen Absinken der CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten im Vollblut. Aber schon 48 Stunden nach einer Operation zeigt sich wieder eine Vermehrung der CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten im Vollblut, die sogar schwachsignifikant über dem praeoperativen Ausgangswert liegt.

Im Drainagesekret kommt im Verlauf von 48 Stunden nach einer Operation zu einem signifikanten Anstieg der CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten (=T-Helferzellen).

Der Konzentrationsabfall der CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten im Vollblut nach 24 Stunden korreliert hochsignifikant (r = 0,99) gegenläufig mit dem Anstieg der CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten-Konzentration im Drainagesekret. Somit kann von einem Abwandern der T-Helferzellen vom Vollblut zum Ort des chirurgischen Traumas ausgegangen werden.

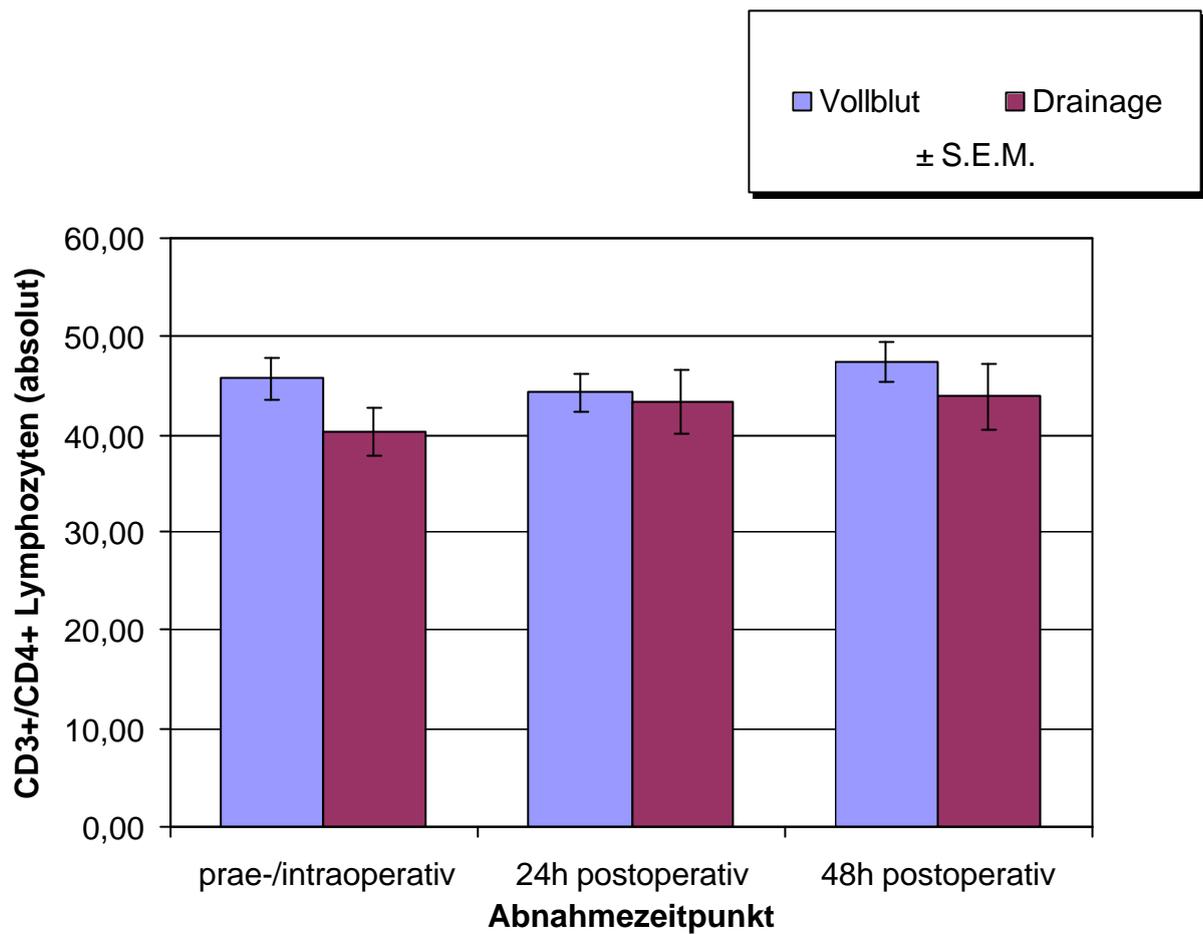


Abbildung 7: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten (absolut) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkt

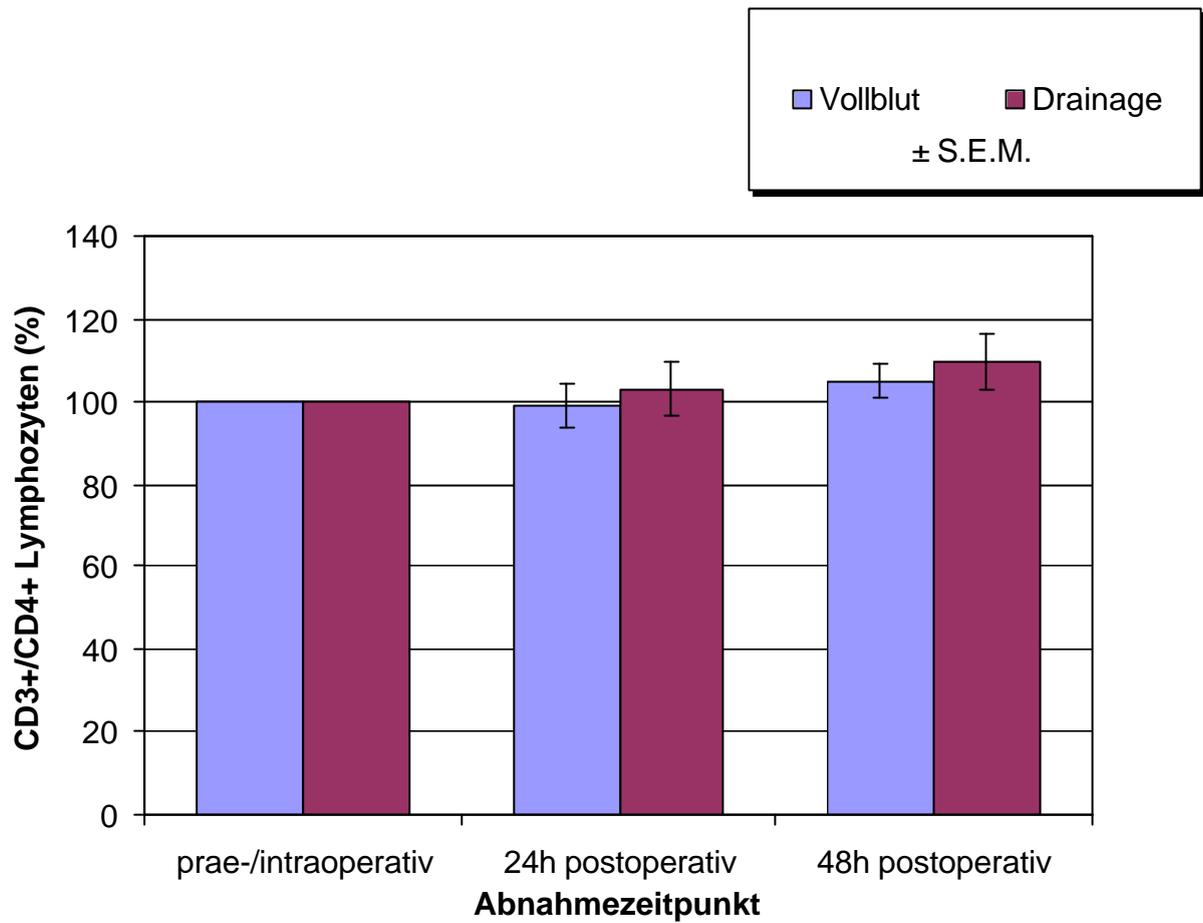


Abbildung 8: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten (in %) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkt

3.3 CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten

Tabelle 6: Mittelwerte (± S.E.M.) der zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

CD3 ⁺ /CD8 ⁺ Lymphozyten	Vollblut		Drainage		Signifikanz p
	MW	± S.E.M.	MW	± S.E.M.	
prae-/intraoperativ	21,75	2,25	28,69	2,45	∅
24h postoperativ	19,02	1,70	23,78	2,3	∅
48h postoperativ	18,71	2,10	24,83	2,64	< 0,001
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ Lymphozyten (100%)					
prae-/intraoperativ	100		100		
24h postoperativ	92,63	6,75	85,03	5,13	∅
48h postoperativ	88,69	7,12	92,33	12,12	∅

Die CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten stellen eine weitere Untergruppe der Gesamtheit der CD3⁺-Lymphozyten. Sie werden auch T-Suppressorzellen oder zytotoxische T-Zellen genannt.

Die Auswertung der Absolutwerte zeigt, dass die CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten innerhalb eines Tages nach einer Operation sowohl im Vollblut, als auch im Drainagesekret abnehmen. Dabei kommt es nach 24 Stunden im Vollblut zu einer hochsignifikanten Konzentrationsabnahme, im Drainagesekret zu einer signifikanten Reduktion der CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten.

Die 48-Stunden-Ergebnisse lassen erkennen, dass es im Vollblut weiterhin zu einer Verminderung der T-Suppressorzellen kommt, wohingegen im Drainagesekret eine schwach signifikante Zunahme zu verzeichnen ist.

Die Absolutwerte ergeben 48 Stunden postoperativ einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den niedrigeren Vollblut- und den höheren Drainagesekret-Werten. Für die entsprechenden Relativwerte finden sich keine Signifikanzen.

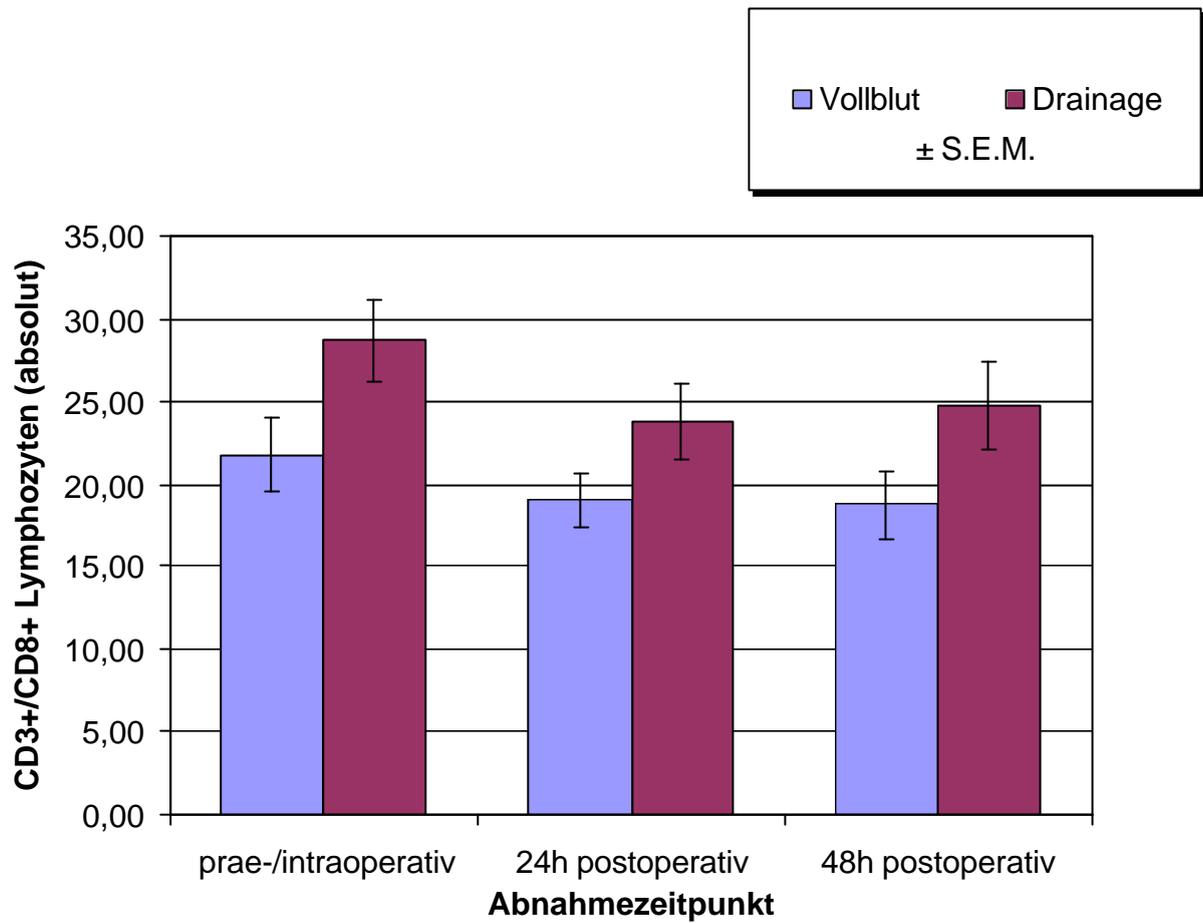


Abbildung 9: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten (absolut) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkt

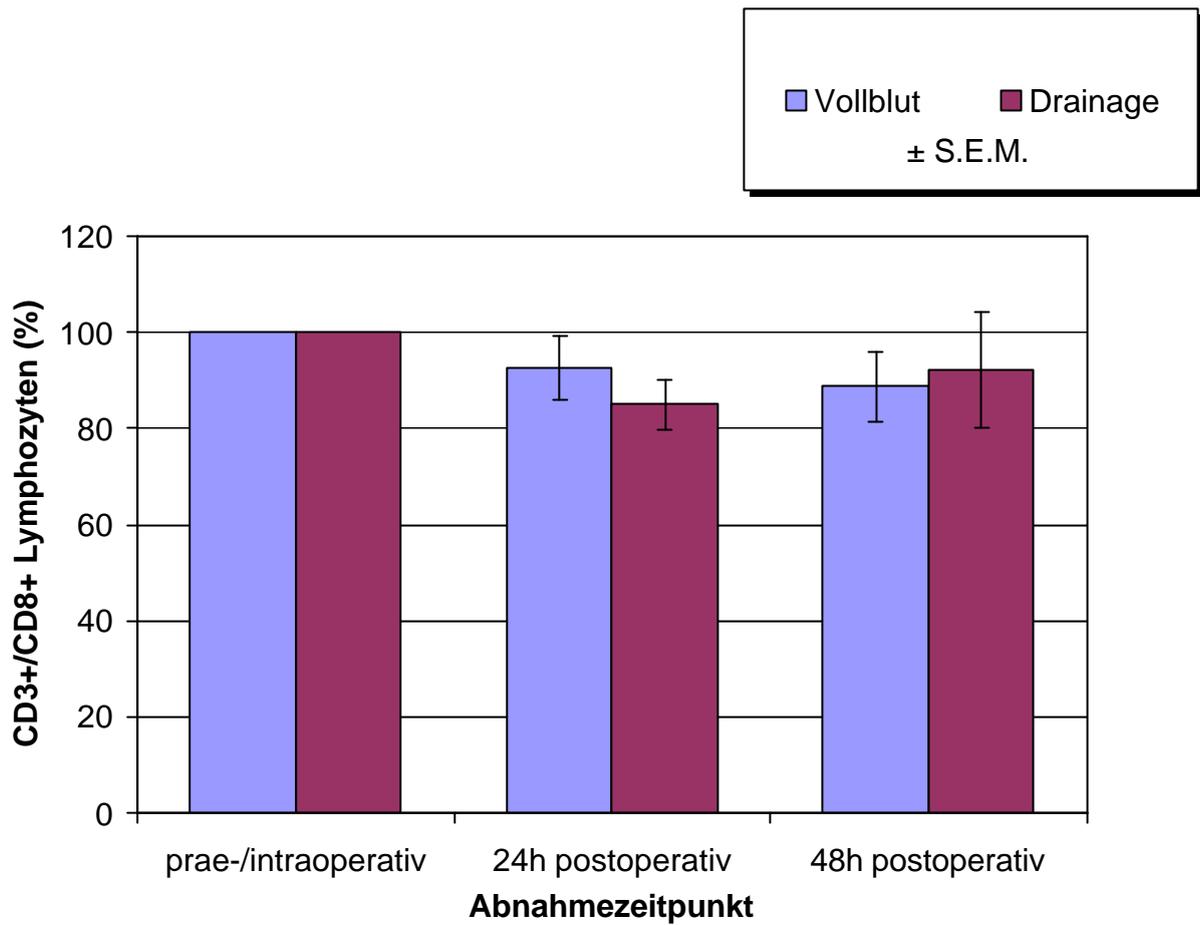


Abbildung 10: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten (in %) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkt

3.4 CCR5 exprimierende T-Helferzellen

Tabelle 7: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CCR5 exprimierende T-Helferzellen zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

CCR5 expr. T-Helferzellen	Vollblut		Drainage		Signifikanz p
	MW	\pm S.E.M.	MW	\pm S.E.M.	
prae-/intraoperativ	0,49	0,16	1,25	0,26	Ø
24h postoperativ	0,64	0,41	0,76	0,37	Ø
48h postoperativ	0,70	0,32	0,59	0,29	Ø
CCR5 expr. T-Helferzellen (100%)					
prae-/intraoperativ	100		100		
24h postoperativ	275,54	192,20	77,69	45,49	Ø
48h postoperativ	204,55	143,81	36,75	16,95	Ø

Neben der Einteilung der T-Lymphozyten in T-Helferzellen (CD3⁺/CD4⁺) und T-Suppressorzellen (CD3⁺/CD8⁺), können diese unter anderem anhand ihres Chemokinrezeptor-Profiles weiter unterteilt werden.

Man unterscheidet bei den T-Helferzellen in T_H1-Zellen und T_H2-Zellen.

T_H1-Zellen exprimieren im wesentlichen die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3, somit sind die CCR5 exprimierenden T-Helferzellen den T_H1-Zellen gleichzusetzen.

Die in Tabelle 7 aufgeführten Berechnungen lassen erkennen, dass sämtliche Vergleiche der Werte keine signifikanten Unterschiede aufweisen.

Im Vollblut kommt es zu einer schwachen Zunahme der CCR5 exprimierenden T-Helferzellen, die jedoch nicht signifikant ist. Im Drainagesekret lässt sich eine schwache, ebenfalls nicht signifikante Abnahme der CCR5 exprimierenden T-Helferzellen erkennen. Es besteht keine Korrelation zur Richtung der Linearität der CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten (= T-Helferzellen).

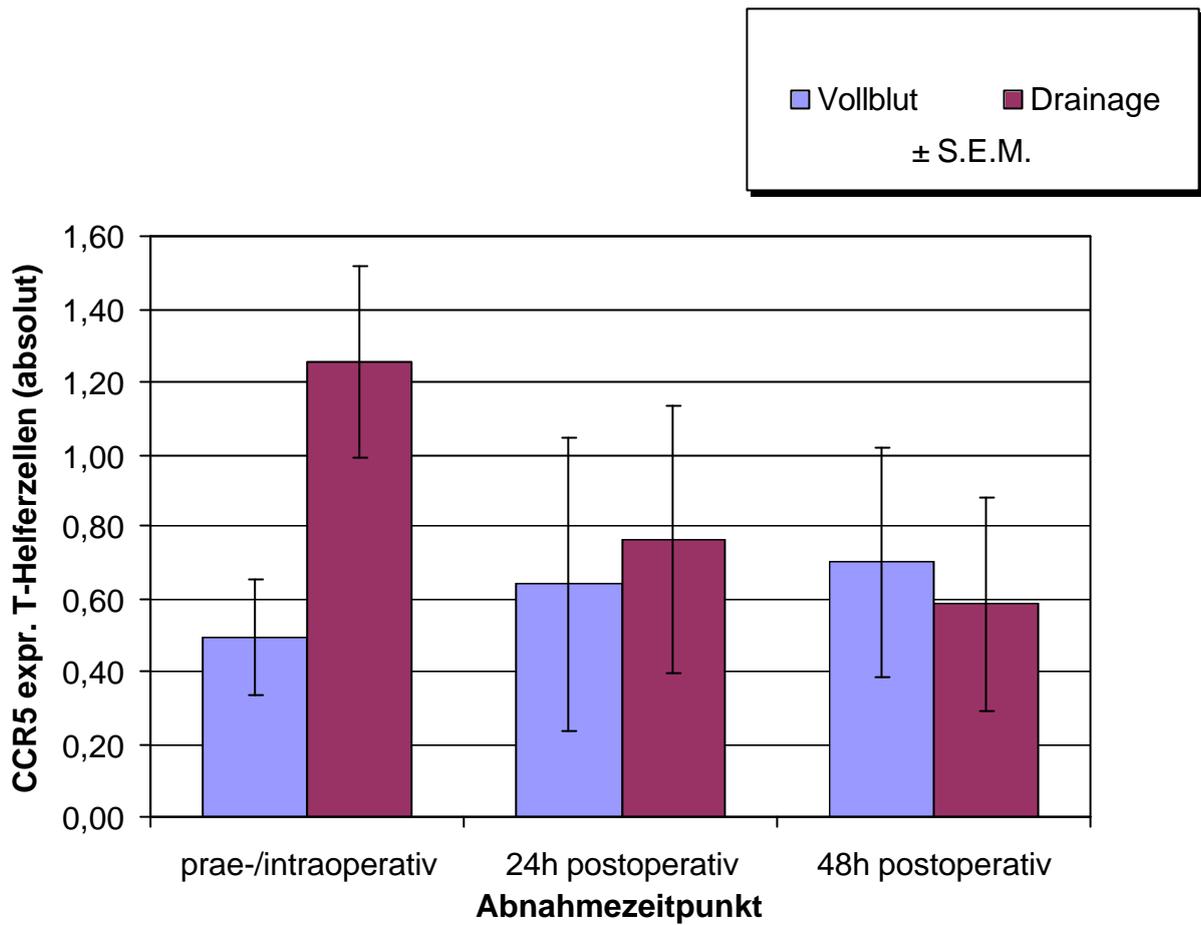


Abbildung 11: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CCR5 exprimierenden T-Helferzellen (absolut) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

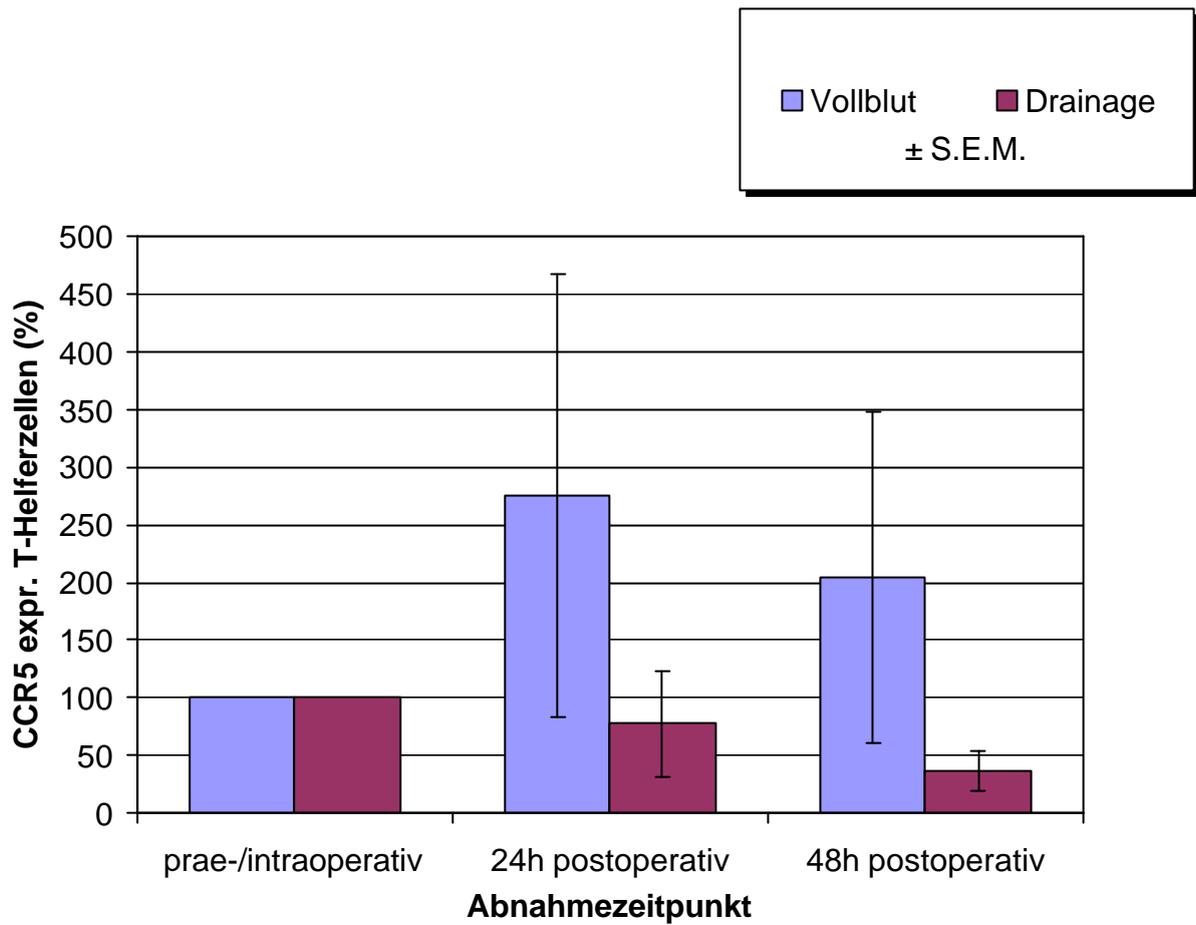


Abbildung 12: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CCR5 exprimierenden T-Helferzellen (in %) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

3.5 CXCR3 exprimierende T-Helferzellen

Tabelle 8: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CXCR3 exprimierende T-Helferzellen zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

CXCR3 expr. T-Helferzellen	Vollblut		Drainage		Signifikanz p
	MW	\pm S.E.M.	MW	\pm S.E.M.	
prae-/intraoperativ	37,95	3,16	42,97	3,46	\emptyset
24h postoperativ	38,28	3,44	41,31	3,95	\emptyset
48h postoperativ	37,82	3,49	51,54	5,73	<0,05
CXCR3 expr. T-Helferzellen (100%)					
prae-/intraoperativ	100		100		
24h postoperativ	101,47	4,95	110,34	15,97	\emptyset
48h postoperativ	94,52	5,05	137,07	20,25	<0,001

Neben dem CCR5-Chemokinrezeptor exprimieren die T_H1-Zellen auch den Chemokinrezeptor CXCR3, somit sind auch die CXCR3 exprimierenden T-Helferzellen den T_H1-Zellen gleichzusetzen.

Im Vollblut steigt die Konzentration der CXCR3 exprimierenden T-Helferzellen 24 Stunden nach einer Operation kurzfristig an, ist aber 48 Stunden postoperativ wieder annähernd auf den Ausgangswert abgesunken. Insgesamt sind diese Veränderungen nicht signifikant.

Im Drainagesekret kommt es 24 Stunden postoperativ zu einer leichten, nicht signifikanten Abnahme der CXCR3 exprimierenden T-Helferzellen.

Nach 48 Stunden zeigt sich im Drainagesekret eine signifikante Konzentrationszunahme der CXCR3 exprimierenden T-Helferzellen. Dieses spiegelt sich auch in einem hochsignifikanten Unterschied in den Relativwerten zu diesem Abnahmezeitpunkt wieder. Hier besteht eine signifikante Korrelation ($r = 0,89$) zum Verhalten der CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten (= T-Helferzellen).

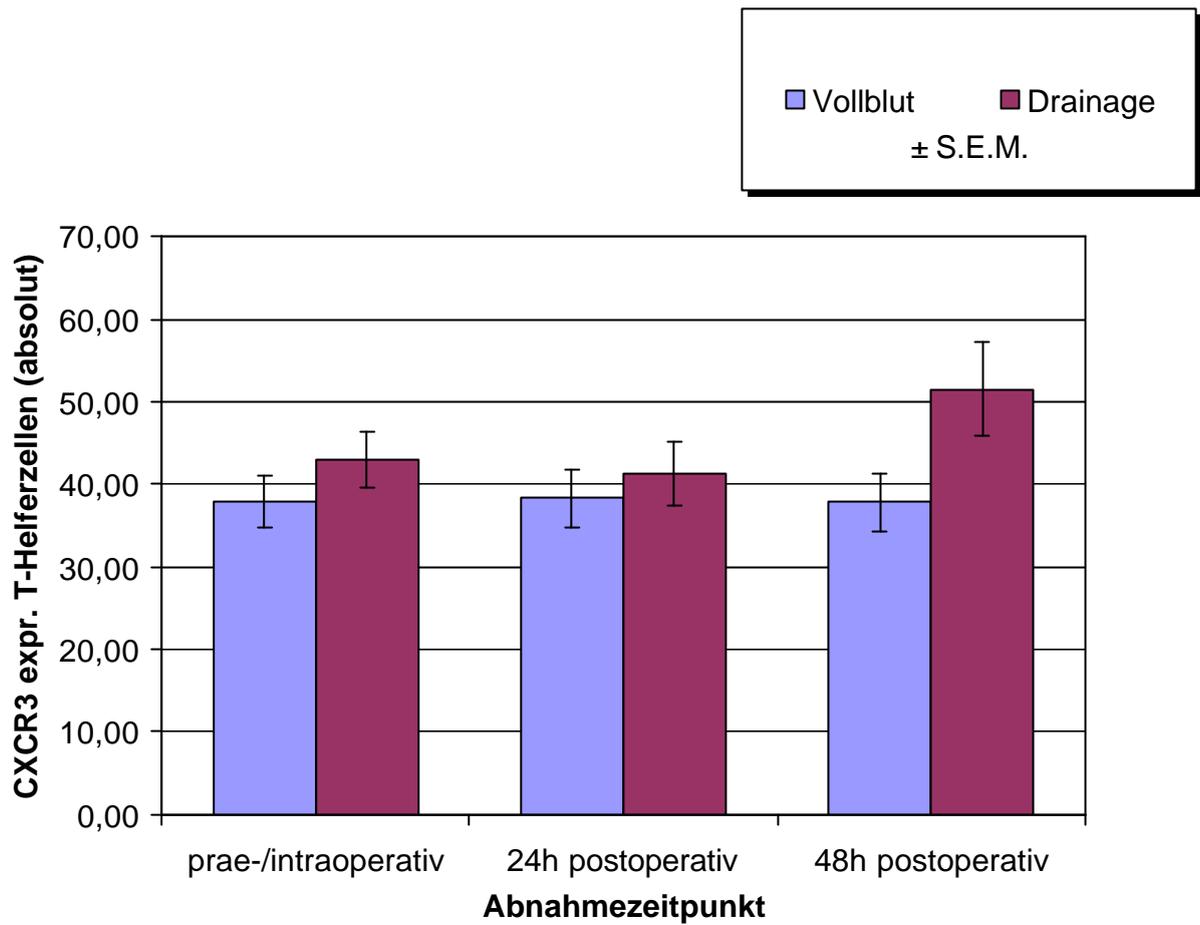


Abbildung 13: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CXCR3 exprimierenden T-Helferzellen (absolut) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

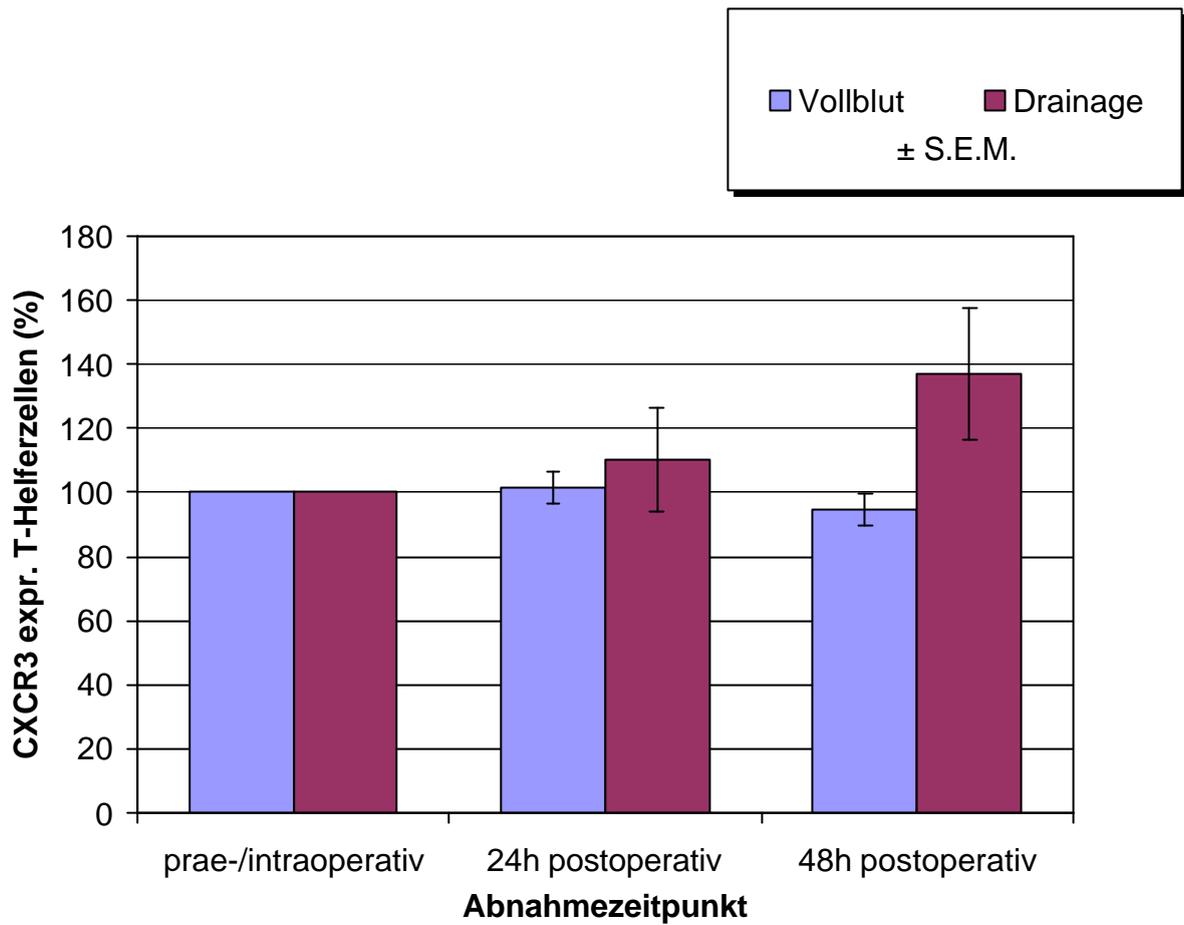


Abbildung 14: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CXCR3 exprimierenden T-Helferzellen (in %) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

3.6 CCR5 exprimierende T-Suppressorzellen

Tabelle 9: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CCR5 exprimierende T-Suppressorzellen zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

CCR5 expr. T-Suppressorzellen	Vollblut		Drainage		Signifikanz P
	MW	\pm S.E.M.	MW	\pm S.E.M.	
prae-/intraoperativ	0,25	0,11	1,92	0,65	Ø
24h postoperativ	0,19	0,08	2,17	2,00	Ø
48h postoperativ	1,21	0,40	1,99	1,09	Ø
CCR5 expr. T-Suppressorzellen (100%)					
prae-/intraoperativ	100		100		
24h postoperativ	118,12	58,87	76,32	66,44	Ø
48h postoperativ	313,05	83,19	133,00	43,49	Ø

Die T-Suppressorzellen, auch zytotoxische T-Zellen genannt, entsprechen der Gruppe der CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten (siehe 3.3 auf Seite 38).

Sie exprimieren wie die T-Helferzellen unter anderem die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3, allerdings sind für die T-Suppressorzellen (CD3⁺/CD8⁺) anhand ihrer Chemokinrezeptoren bisher keine Untergruppierungen bekannt.

Für die CCR5 exprimierenden T-Suppressorzellen (Tabelle 9) zeigen sich bei den vergleichenden Berechnungen zwischen Vollblut und Drainagesekret zu keinem der Abnahmezeitpunkte signifikante Unterschiede.

Allein im Vollblut ist eine schwach signifikante Konzentrationszunahme der CCR5 exprimierenden T-Suppressorzellen nach 48 Stunden zu verzeichnen.

Die Vergleiche der Relativwerte ergeben keine Signifikanzen.

Ferner bestehen keine Korrelationen zu den Werten der CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten im Drainagesekret.

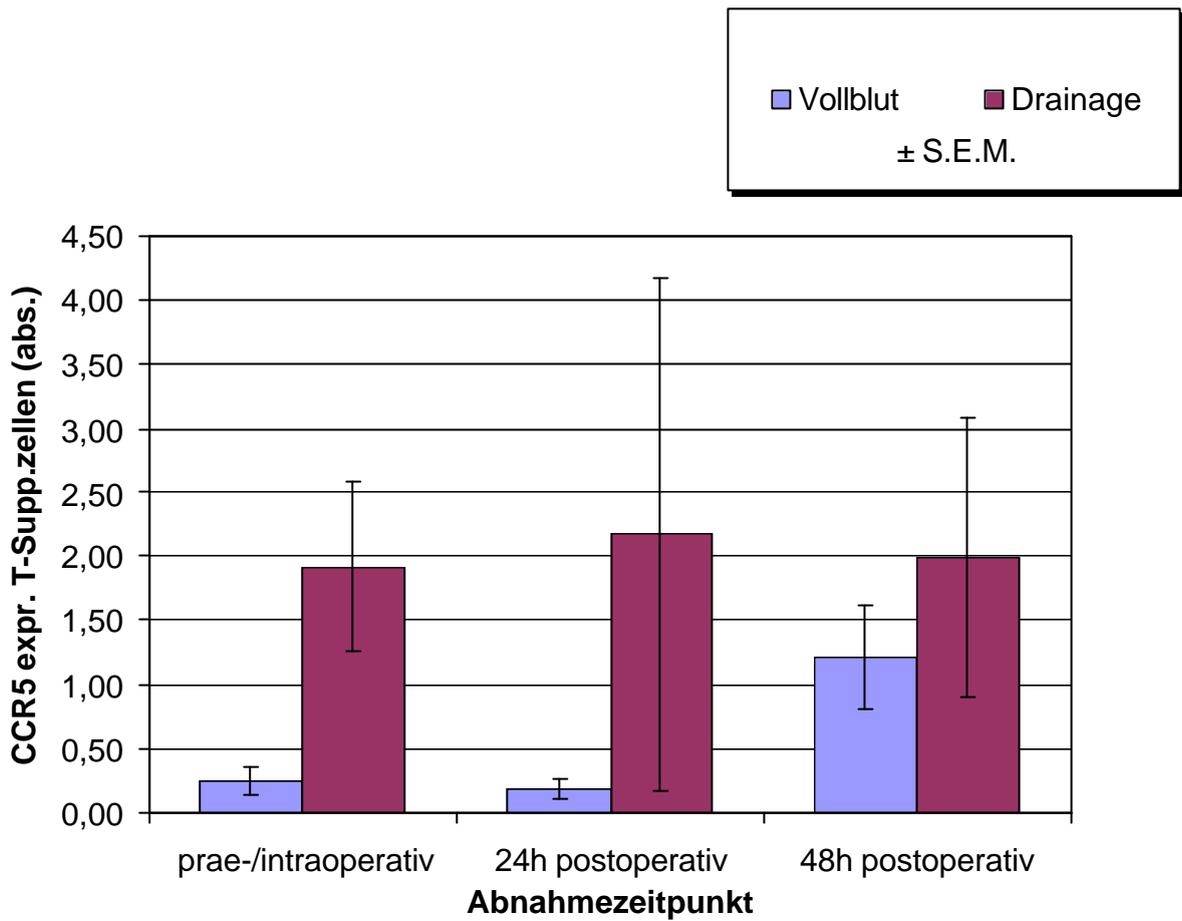


Abbildung 15: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CCR5 exprimierenden T-Suppressorzellen (absolut) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

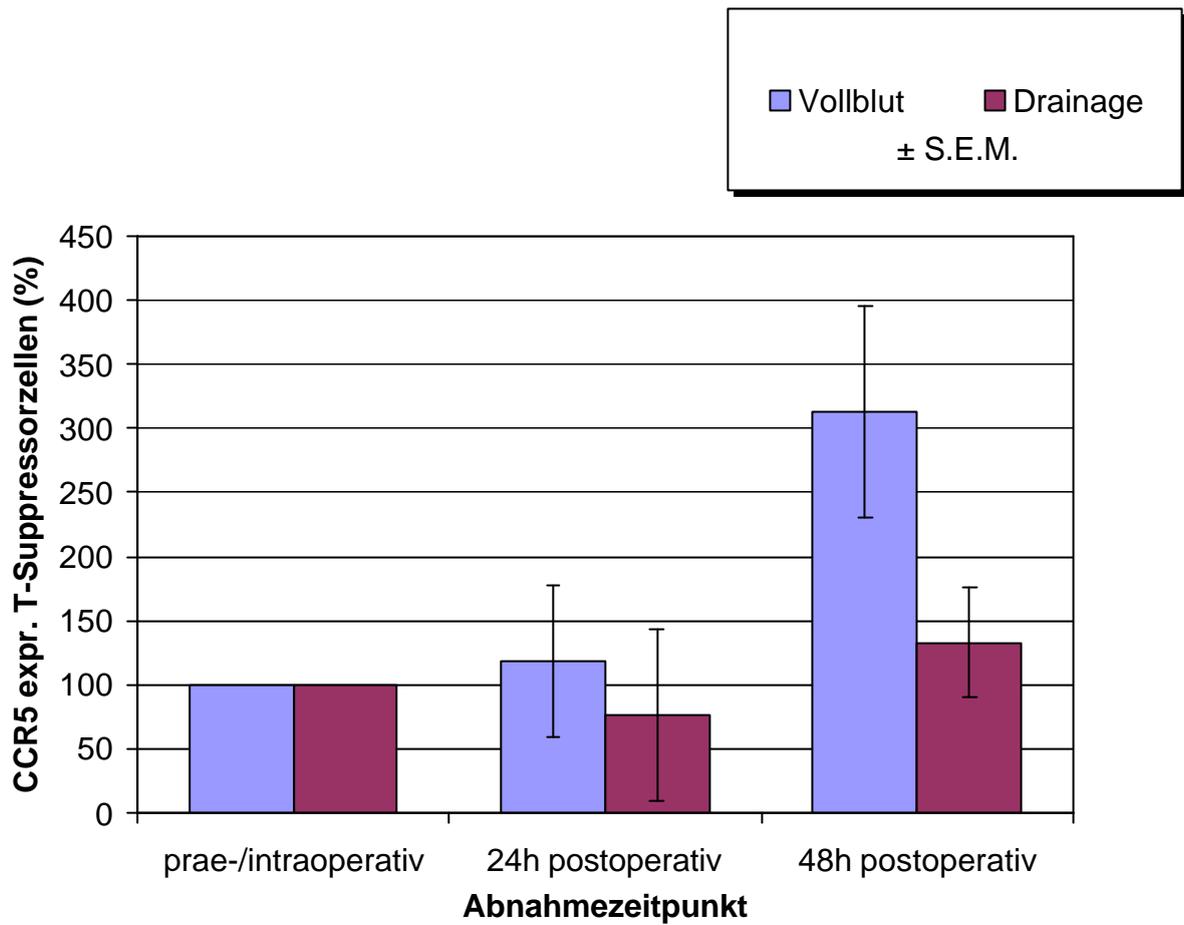


Abbildung 16: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CCR5 exprimierenden T-Suppressorzellen (in %) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

3.7 CXCR3 exprimierende T-Suppressorzellen

Tabelle 10: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CXCR3 exprimierende T-Suppressorzellen zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

CXCR3 expr. T-Suppressorzellen	Vollblut		Drainage		Signifikanz p
	MW	\pm S.E.M.	MW	\pm S.E.M.	
prae-/intraoperativ	73,03	2,26	80,25	2,97	< 0,001
24h postoperativ	75,59	3,13	77,86	2,87	< 0,01
48h postoperativ	76,35	3,43	84,47	3,92	< 0,001
CXCR3 expr. T-Suppressorzellen (100%)					
prae-/intraoperativ	100		100		
24h postoperativ	104,96	5,47	101,62	6,63	< 0,05
48h postoperativ	105,40	5,19	107,06	4,87	< 0,001

Die in Tabelle 10 dargestellten Berechnungen zeigen für die CXCR3 exprimierenden T-Suppressorzellen im Vergleich zum Vollblut eine signifikant bis hochsignifikant höhere Konzentration im Drainagesekret zu allen drei Abnahmezeitpunkten.

In gleicher Weise kommt dies auch bei den Relativwerten 48 Stunden postoperativ zum Ausdruck.

Im Drainagesekret ist von intraoperativ bis 48 Stunden postoperativ eine signifikante Konzentrationszunahme der CXCR3 exprimierenden T-Suppressorzellen zu verzeichnen.

Es besteht eine hochsignifikante Korrelation ($r = 0,96$) zu dem Verhalten der CXCR3 exprimierenden T-Helferzellen nach chirurgischem Trauma im Drainagesekret (siehe 3.5 auf Seite 44), sowie eine signifikante Korrelation ($r = 0,87$) zu den entsprechenden Werten der CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten im Drainagesekret (siehe 3.3 auf Seite 38).

Hingegen besteht keine Korrelation zur Richtung der Linearität der CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten im Vollblut.

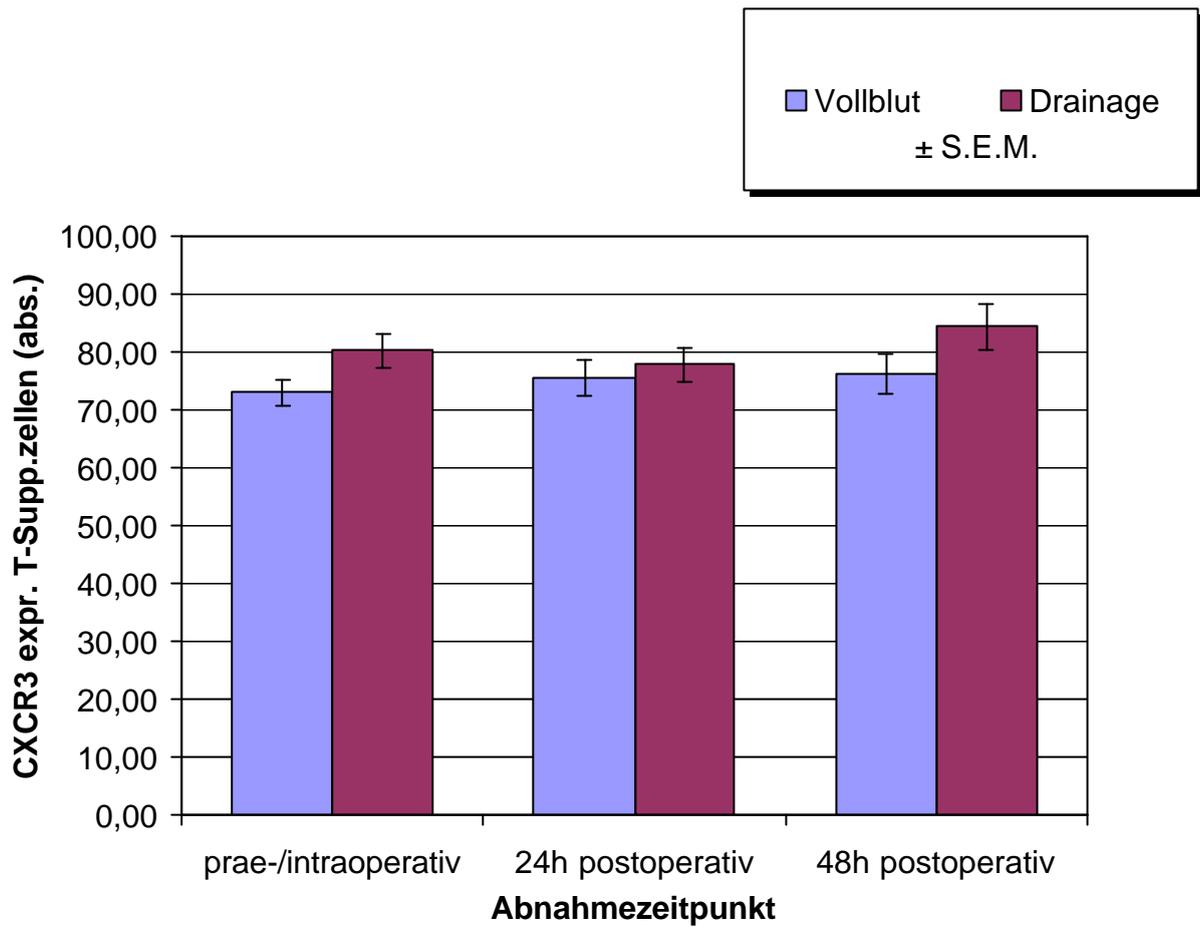


Abbildung 17: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CXCR3 exprimierenden T-Suppressorzellen (absolut) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

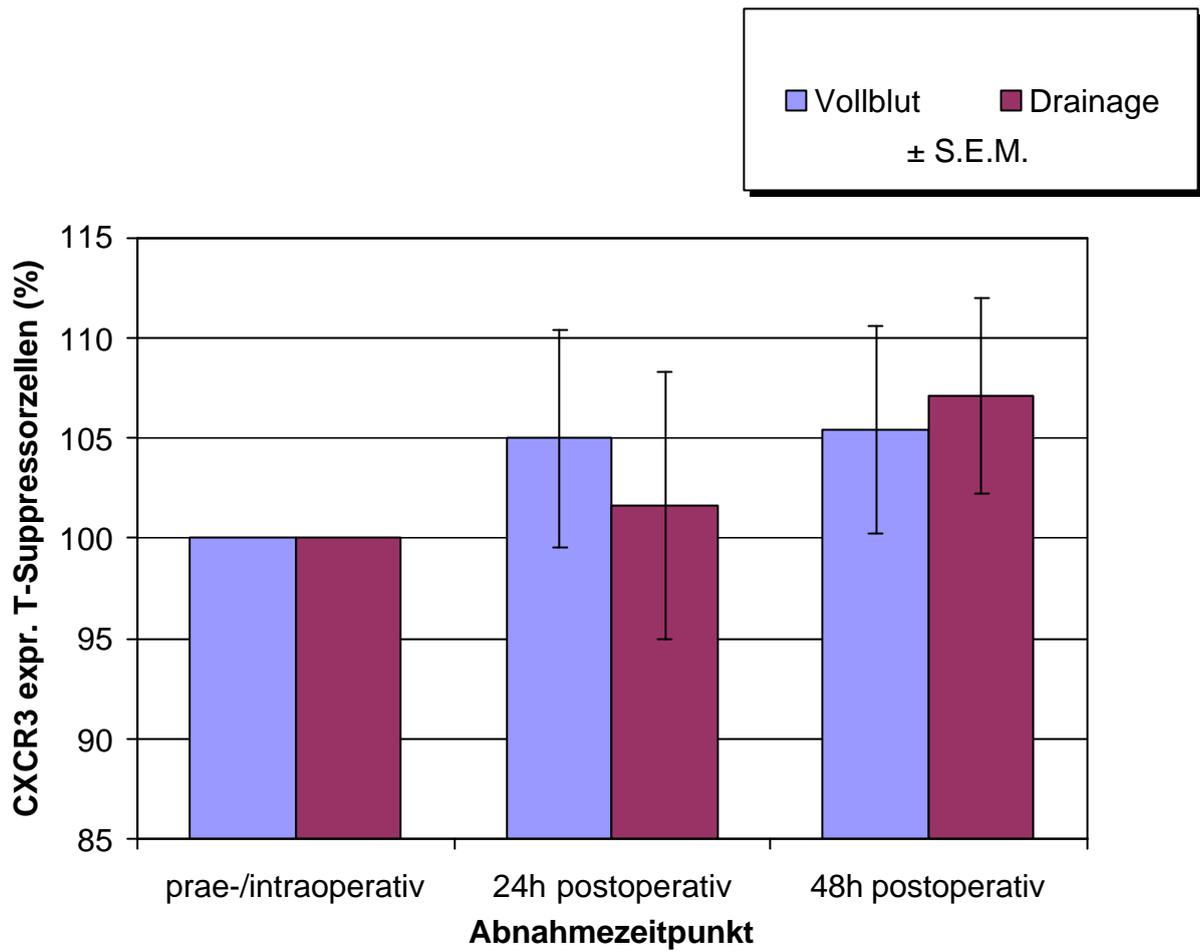


Abbildung 18: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CXCR3 exprimierenden T-Suppressorzellen (in %) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

3.8 CCR5 exprimierende Nicht-T-Zellen

Tabelle 11: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CCR5 exprimierende Nicht-T-Zellen zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

CCR5 expr. Nicht-T-Zellen	Vollblut		Drainage		Signifikanz p
	MW	\pm S.E.M.	MW	\pm S.E.M.	
prae-/intraoperativ	1,25	0,30	3,38	0,99	Ø
24h postoperativ	0,73	0,27	2,37	1,71	Ø
48h postoperativ	0,04	0,01	2,75	0,86	Ø
CCR5 expr. Nicht-T-Zellen (100%)					
prae-/intraoperativ	100		100		
24h postoperativ	54,34	8,53	46,74	20,15	Ø
48h postoperativ	3,55	0,68	94,53	35,13	Ø

Die Gruppe der Nicht-T-Zellen, die den Chemokinrezeptor CCR5 exprimieren, wird zum einen von den mononukleären Phagozyten gebildet.

Diese Gruppe der mononukleären Phagozyten lässt sich in die phagozytierenden Monozyten = Makrophagen und in die antigen-präsentierenden Zellen = APC (auch dendritic cells genannt) unterteilen (siehe 1.3.1.1 auf Seite 3/4), die allesamt den CCR5-Chemokinrezeptor exprimieren (Luster, 1998), (siehe Abbildung 4 auf Seite 18).

Zum anderen wird der CCR5 von den natürlichen Killerzellen exprimiert, die zur Gruppe der Lymphozyten gehören (siehe 1.3.2.7 auf Seite 10).

Für diese Gruppe der CCR5 exprimierenden Nicht-T-Zellen lassen sich in sämtlichen Vergleichen keine signifikanten Unterschiede aufweisen (siehe Tabelle 11).

Im Vollblut kommt es nach 24 und nach 48 Stunden zu einer Abnahme der Konzentration, die jedoch nicht signifikant ist. Im Drainagesekret kommt es 24 postoperativ ebenfalls zu einer nicht signifikanten Konzentrationsabnahme. Für die Relativwerte der CCR5 exprimierenden Nicht-T-Zellen bestehen ebenfalls keine Signifikanzen.

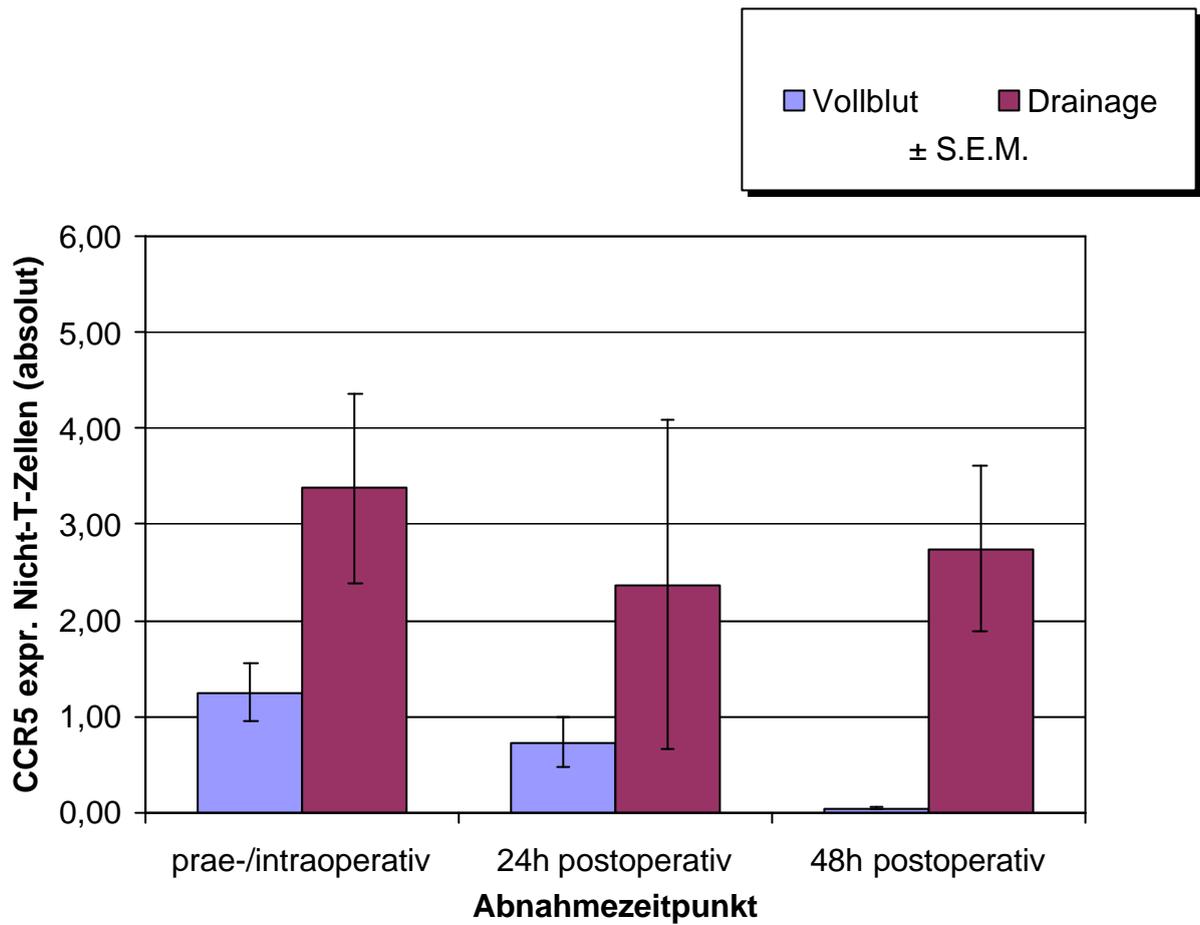


Abbildung 19: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CCR5 exprimierenden Nicht-T-Zellen (absolut) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

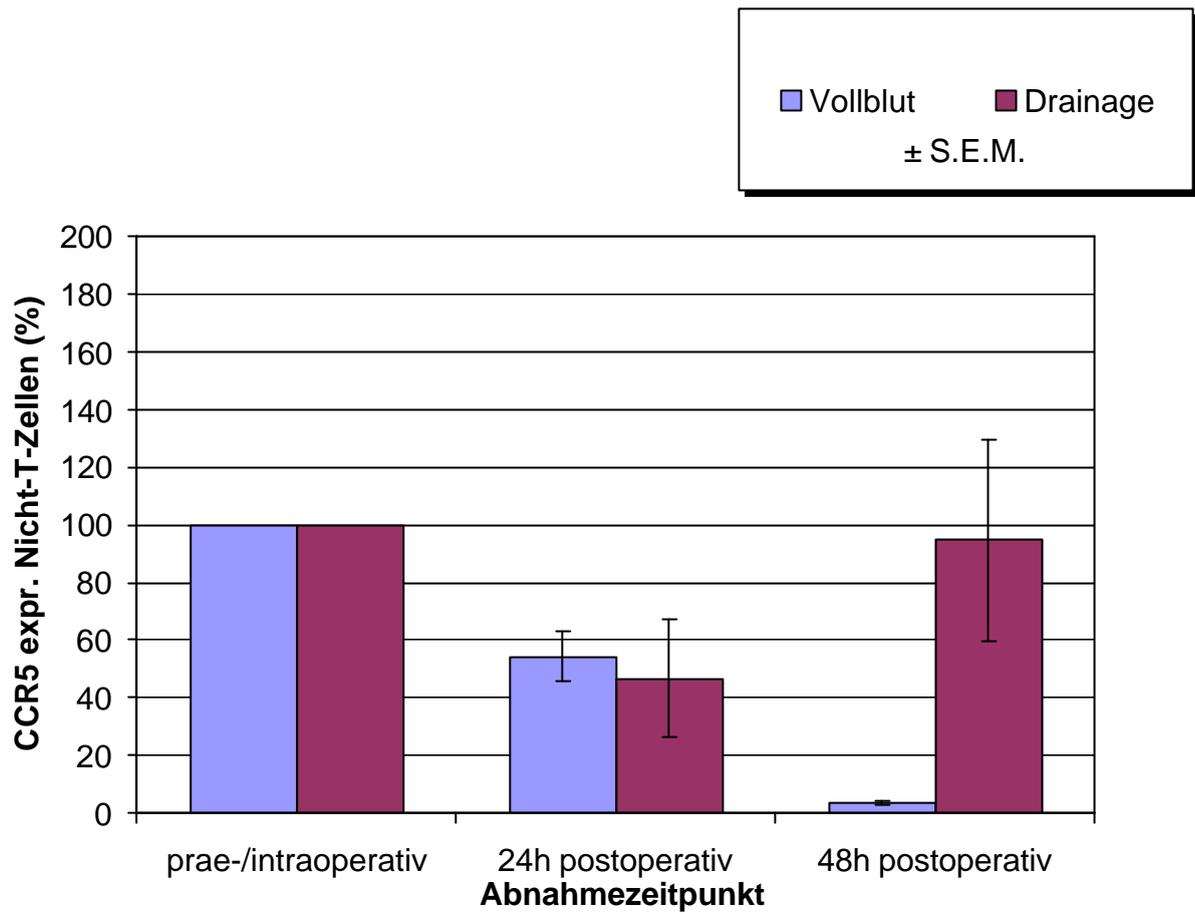


Abbildung 20: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CCR5 exprimierenden Nicht-T-Zellen (in %) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

3.9 CXCR3 exprimierende Nicht-T-Zellen

Tabelle 12: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CXCR3 exprimierende Nicht-T-Zellen zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

CXCR3 expr. Nicht-T-Zellen	Vollblut		Drainage		Signifikanz p
	MW	\pm S.E.M.	MW	\pm S.E.M.	
prae-/intraoperativ	31,64	4,40	27,23	3,80	\emptyset
24h postoperativ	36,57	4,45	13,99	5,17	< 0,05
48h postoperativ	39,07	5,00	18,55	4,03	< 0,05
CXCR3 expr. Nicht-T-Zellen (100%)					
prae-/intraoperativ	100		100		
24h postoperativ	118,91	9,16	58,65	26,47	< 0,05
48h postoperativ	132,95	20,95	73,58	20,31	< 0,05

Die Nicht-T-Zellen, die den Chemokinrezeptor CXCR3 exprimieren, repräsentieren sich durch die natürlichen Killerzellen, die zur Gruppe der Lymphozyten gehören (siehe 1.3.2.7 auf Seite 10 und Abbildung 4 auf Seite 18).

Tabelle 12 zeigt auf, dass die Konzentration der CXCR3 exprimierenden Nicht-T-Zellen im Vollblut sowohl 24 als auch 48 Stunden nach einer Operation schwach signifikant höher ist als in den Vergleichswerten des Drainagesekrets. Dies lässt sich zum einen an den Absolutwerten und zum anderen auch an den Relativwerten mit einheitlichen Signifikanzen von $p < 0,05$ nachweisen.

Im Vollblut kommt es nach 24 und nach 48 Stunden postoperativ zu einer schwach signifikanten Zunahme der CXCR3 exprimierenden Nicht-T-Zellen.

Im Drainagesekret zeigt sich 24 Stunden postoperativ eine schwach signifikante Konzentrationsabnahme gegenüber dem intraoperativen Wert. 48 Stunden nach einer Operation ist allerdings bereits wieder eine Zunahme der Konzentration der CXCR3 exprimierenden Nicht-T-Zellen aufzuweisen, die jedoch in ihrem Ausmaß nicht signifikant gegenüber dem 24-Stunden-Wert ist.

Zwischen den Vollblut- und Drainagesekret-Werten bestehen 24 und 48 Stunden postoperativ hochsignifikant gegenläufige Korrelationen ($r = 0,97$ bzw. $0,98$).

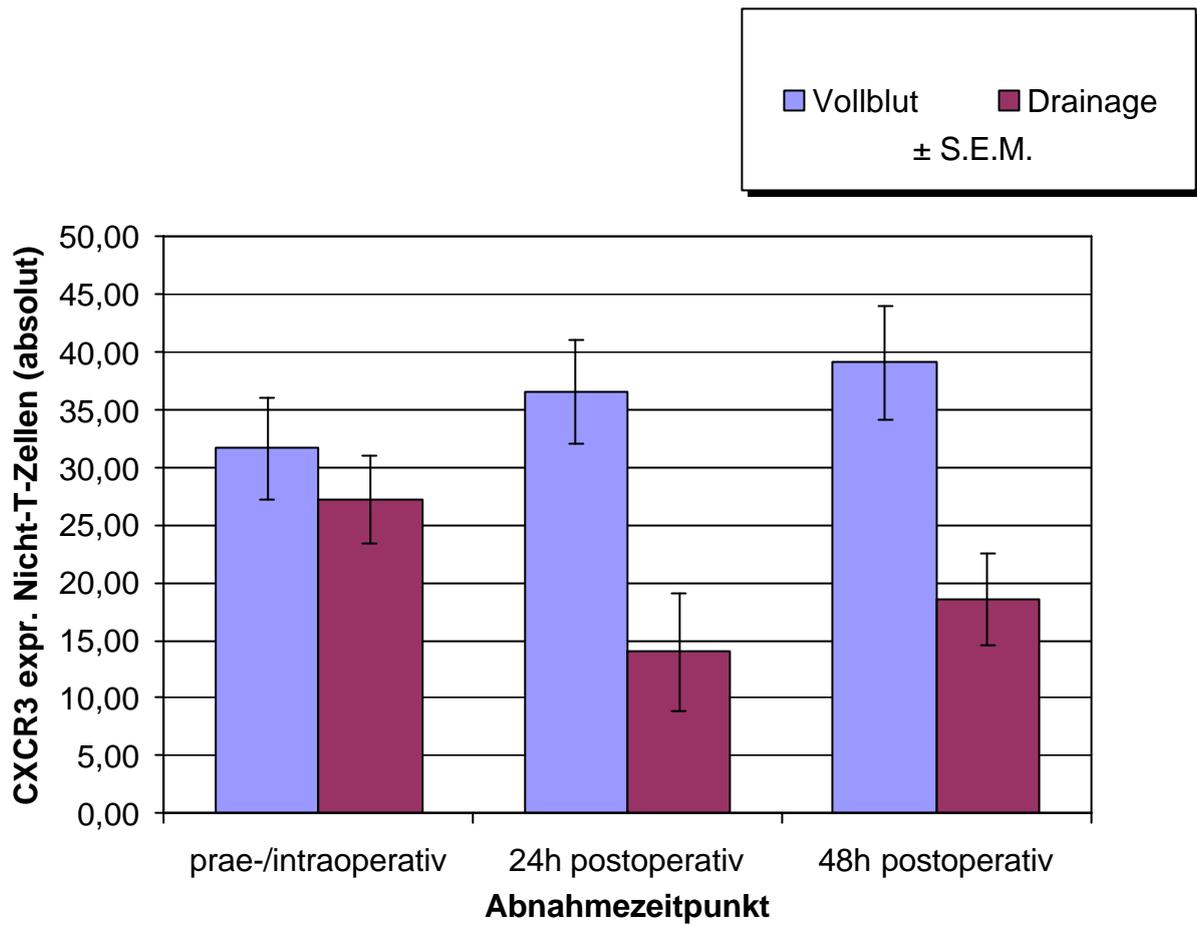


Abbildung 21: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CXCR3 exprimierenden Nicht-T-Zellen (absolut) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

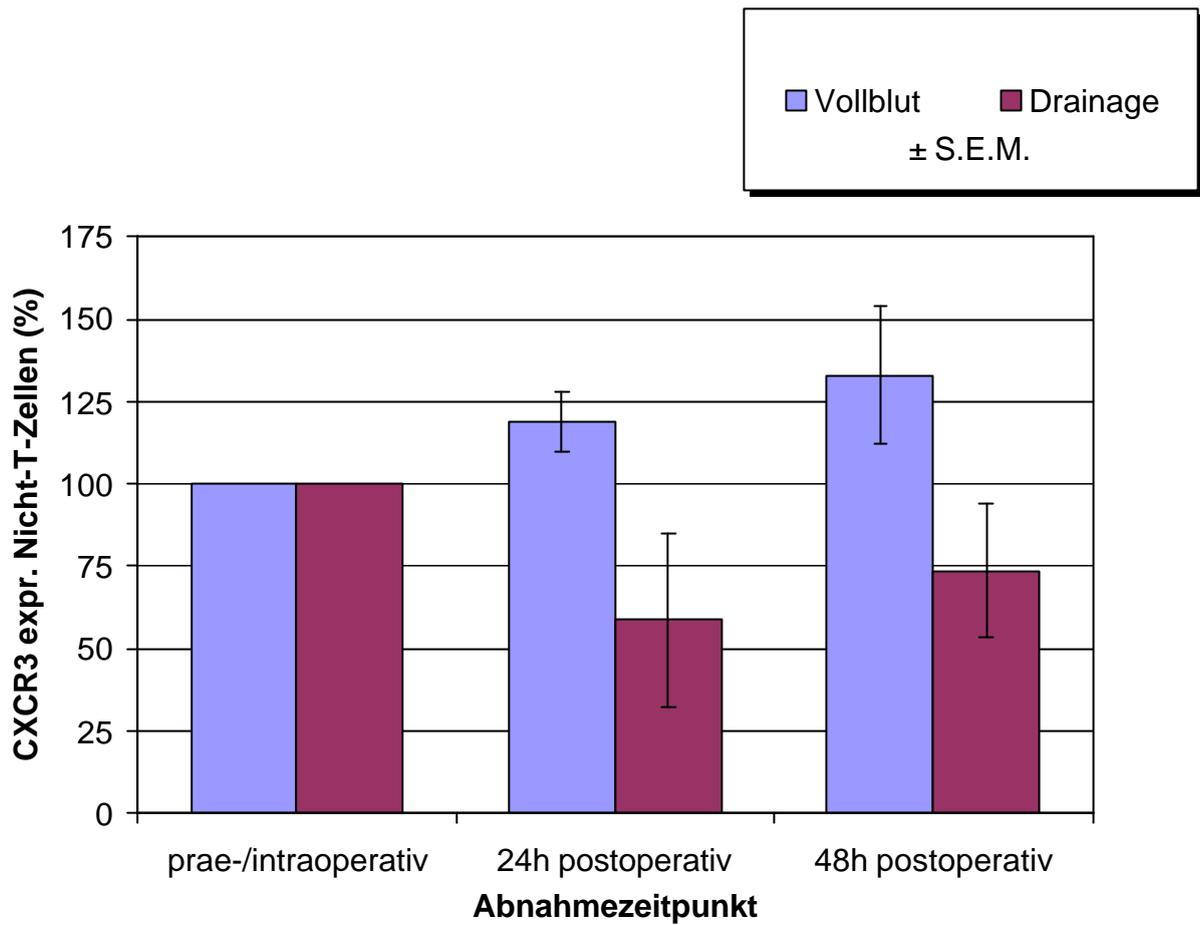


Abbildung 22: Mittelwerte (\pm S.E.M.) der CXCR3 exprimierenden Nicht-T-Zellen (in %) zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten

4. Diskussion

Eine Operation ist ein Eingriff in die Integrität des menschlichen Organismus. Diese Trauma führt, vergleichbar einer lokalen Entzündung, zu komplexen immunologischen Reaktionen.

Eine Entzündung ist die Reaktion des Körpers auf das Eindringen eines infektiösen Erregers, eine Antigenbelastung oder einfach auf eine physikalische Schädigung. Im Falle eines chirurgischen Traumas summieren sich diese Ereignisse.

Die Abwehrreaktion des menschlichen Organismus besteht darin, vermehrt Bestandteile des Immunsystems an den Verletzungsort bzw. Infektionsherd zu transportieren.

Zu diesem Zweck erhöht sich die Blutzufuhr zum Ort der Immunreaktion, die Kapillarpermeabilität nimmt zu und Leukozyten treten aus den Kapillaren in das umgebende Gewebe aus. Im Gewebe wandern sie chemotaktisch gesteuert auf den Infektionsort zu.

Chemotaxis bezeichnet die zielgerichtete Bewegung von Zellen entlang dem Konzentrationsgradienten eines chemotaktischen Moleküls, in diesem Fall zu einem Entzündungsherd oder einer Immunreaktion, wie sie auch bei chirurgischem Trauma hervorgerufen wird.

Zahlreiche Mediatoren, wie z.B. Histamin können zwar die Gesamtmobilität von Immunzellen verstärken, lösen aber keine gerichtete Migration aus.

Diese Eigenschaft wird als Chemokinese bezeichnet und hauptsächlich den Wirkmechanismen zwischen Chemokinen und Chemokinrezeptoren zugeschrieben.

Viele Untersuchungen auf diesem Gebiet stützen die These, dass T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1 -Zellen) zum Ort des chirurgischen Traumas bzw. der lokalen Entzündung abwandern. So konnte aufgezeigt werden, dass es nach chirurgischen Eingriffen zu einer Schwächung der zellulären, zytotoxischen Immunabwehr kommt, die durch eine Reduzierung der T_H1 -Zellen im Blut charakterisiert ist (Decker et al., 1996). Diese postoperative Suppression der zellulären T_H1 -Immunantwort ist gleichzeitig durch eine Stimulation der humoralen, durch T-Helferzellen vom Typ 2 vermittelten,

Immunität gekennzeichnet. Decker et al. legten dar, dass die Verschiebung des T_H1/T_H2 -Gleichgewichts entsprechen der Schwere des Gewebetraumas erfolgt. Viele unterschiedliche Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren gezeigt, dass immunologische Messgrößen als neue Bewertungsschemata für die Schwere eines operativen Gewebetraumas herangezogen werden können.

Die Erforschungen der postoperativen Mechanismen der Immunsuppression soll aber nicht nur dazu dienen, chirurgische Eingriffe besser quantifizieren und evaluieren zu können, sondern soll in einem weiteren Schritt zum Ziel haben, dass durch die neu gewonnenen Erkenntnisse dieser immunregulativer Mechanismen bessere Ansatzpunkte für zukünftige Therapien entwickelt werden können.

Die Vorstellungen sind dahingehend, durch die Gabe von neu entwickelten Immun-Modulatoren mögliche Komplikationen, die der postoperativen Immunsuppression zuzuschreiben sind, wie zum Beispiel Infektionen, Sepsis und Wundheilungsstörungen, zu unterdrücken oder zumindest effektiver als bisher therapieren zu können.

Da die Mechanismen der peri- und postoperativen Immunregulation erst ansatzweise aufgeklärt sind, stellt sich vor dieser Zielsetzung die wichtige Fragestellung, wie es bei chirurgischen Eingriffen zur Herabregulierung der cytotoxischen Immunität und der damit verbundenen Erniedrigung der T-Helferzellen vom Typ1 kommt.

Chemokine und deren Rezeptoren scheinen bei den lokalen Zellrekrutierungs-Prozessen eine Schlüsselrolle zu spielen (Baggiolini et al., 1997, Sozzani et al., 1996, Murphy et al., 1994).

Vor diesem Hintergrund erfolgten die Untersuchungen der vorbeschriebenen Lymphozytensubpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker und der von verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimierten Chemokinrezeptoren, um zu klären, welche Rolle die Chemokinrezeptoren bei der Migration von T-Helferzellen an den Ort des chirurgischen Traumas bzw. der lokalen Entzündung spielen.

Zu diesem Zwecke wurden die Parameter im Vollblut mit denen in der peritonealen Drainageflüssigkeit vor, während und nach einem elektiv chirurgischen Eingriff verglichen.

Lymphozytensubpopulationen

CD3⁺-Lymphozyten

Die Lymphozyten, die den CD3⁺-Oberflächenmarker exprimieren, gehören alle zur Gruppe der T-Lymphozyten. Der vollständige T-Zell-Rezeptorkomplex enthält eine TCR-Einheit und daran assoziiert einen Satz von fünf Polypeptiden, den man als CD3⁺-Komplex bezeichnet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass es infolge eines chirurgischen Traumas zu einer signifikanten Abnahme der T-Lymphozyten-Konzentration im Vollblut kommt. Darin spiegelt sich eine postoperative Immunsuppression wieder, die jedoch unspezifisch ist, da die Gruppe der CD3⁺-positiven Zellen keine Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Zellarten unter den T-Lymphozyten zulässt.

CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten

Die Untergruppe von Lymphozyten, die zusätzlich den CD4-Marker exprimieren (CD3⁺/CD4⁺) werden auch T-Helferzelle (T_H-Zelle) genannt.

Zu den Hauptaufgaben der T-Helferzellen (T_H), auch CD3⁺/CD4⁺-Zellen gehört die aktive Hilfe zur Etablierung einer gezielten, zellvermittelten Immunantwort. Sie leiten dabei die Effektormechanismen anderer Immunzellen, wie z.B. der B-Zellen und der Makrophagen, ein und koordinieren das Zusammenspiel der verschiedenen Immunzellen (Roitt, 1996). Dies geschieht zum größten Teil über die Ausschüttung von Zytokinen/Chemokinen und der Regulation von Oberflächenrezeptoren.

Die aufgeführten Untersuchungsergebnisse legen dar, dass es nach einer Operation zu einem signifikanten Anstieg der CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten-Konzentration in der peritonealen Drainageflüssigkeit kommt. Im Vollblut hingegen kommt es 24 Stunden postoperativ zu einem leichten Abfall der CD3⁺/CD4⁺-Zellen, so dass man eine gerichtete Bewegung der T-Helferzellen vom Vollblut zum Ort des chirurgischen

Traumas annehmen kann. Dies bestätigt die generelle Lehrmeinung, dass am Ort einer Immunreaktion eine verstärkte Einwanderung von Zellen festzustellen ist, und dass CD4-positive-Zellen in der akuten Phase des Geschehens überwiegen (Male, 1996).

Allerdings lassen sich anhand der Untersuchungen der CD3⁺/CD4⁺-Helferzellen keine Aussagen über das Verhalten der untergeordneten T_H1-Zellen und T_H2-Zellen treffen.

T_H1-Zellen und T_H2-Zellen lassen sich unter anderem anhand ihres Zytokin-Profiles unterscheiden.

Die T_H1-Zellen sezernieren IL-2, IFN_γ und TNF_β. Die T_H1-Zellen vermitteln verschiedene Funktionen im Zusammenhang mit Zytotoxizität und lokalen Entzündungsreaktionen, sie bekämpfen intrazelluläre, mikrobiologische Pathogene mit Hilfe von Makrophagen → zelluläre, zytotoxische Immunantwort.

Die T_H2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Die T_H2-Zellen stimulieren die B-Lymphozyten zur Proliferation und zur Antikörperproduktion und wirken damit primär im Sinne der humoralen Immunität als Schutz gegen „frei lebende“ Mikroorganismen → humorale Immunantwort (Roitt 1995; Santana 2003).

Ferner konnte nachgewiesen werden, dass man T_H1-Zellen und T_H2-Zellen auch anhand ihrer Chemokinrezeptoren differenzieren kann, da diese auf aktivierten T_H1- und T_H2-Zellen unterschiedlich exprimiert werden (Baggiolini, 1997, Bonecchi et al., 1998, Sallusto, 1999, Breitfeld, 2000).

Die Rezeptoren CCR5 und CXCR3 werden im wesentlichen auf aktivierten T_H1-Zellen gefunden, während aktivierte T_H2-Zellen die Rezeptoren CCR3 und CCR4 exprimieren (Bonecchi et al., 1998).

Diese Chemokinrezeptoren jedoch nicht spezifisch für die T_H1- oder T_H2-Zellen. So werden zum Beispiel die CCR5- und CXCR3-Rezeptoren auch von T-Suppressorzellen (CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten) und von Nicht-T-Zellen, wie Makrophagen, antigen-präsentierenden Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert (Luster, 1998), (siehe Abbildung 4 auf Seite 18).

CD3+/CD8+ Lymphozyten

Die Untergruppe mit dem CD8-Marker (CD3⁺/CD8⁺), die überwiegend zytotoxische Eigenschaften hat, wird deshalb auch zytotoxische T-Zelle (T_C-Zelle) oder T-Suppressorzelle genannt.

Zytotoxische T-Zellen binden ihre Zielzellen, indem sie Determinanten des Antigens und des MHC erkennen (Rook, 1996). Fast alle zytotoxischen Aktivitäten von CD3⁺/CD8⁺-Zellen werden durch die Exozytose von Granula oder den Fas-Liganden – Fas-Rezeptor Signalweg vermittelt. Der Fas-Ligand (FasL) ist ein Mitglied der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Familie. Er bindet an den Fas-Rezeptor (= CD95) und induziert dadurch den kontrollierten Zelltod, die Apoptose (Cohen, 1997). Während CD95 auf einer Vielzahl von Zellen vorkommt, wird der Ligand hauptsächlich auf aktivierten CD3⁺/CD8⁺-Zellen exprimiert (Nagata, 1995).

Die zytotoxischen T-Zellen entfalten ihre zellabtörende Wirkung durch Degranulation. Dadurch kommt es zur Freisetzung der lysierenden Enzyme, die in der Lage sind die Zielzelle zu zerstören. Zytokine der CD3⁺/CD8⁺-Zellen wie TNF_α hingegen tragen nur einen kleinen Teil zur zytotoxischen Aktivität bei.

Bei den CD3+/CD8+ Lymphozyten wiesen die Untersuchungen 24 Stunden nach elektiv chirurgischem Trauma eine hochsignifikante Konzentrationsabnahme im Vollblut und eine signifikante Konzentrationsabnahme im Drainagesekret auf. Die 48-Stunden-Ergebnisse lassen erkennen, dass es im Vollblut weiterhin zu einer Verminderung der T-Suppressorzellen kommt, wohingegen im Drainagesekret eine schwach signifikante Zunahme zu verzeichnen ist.

Der Abfall der Vollblutwerte von CD3+/CD8+-Zellen bestätigt die postoperative Immunsuppression. Ebenso scheint der hochsignifikante Unterschied zwischen Vollblut- und Drainagesekret-Werten nach 48 Stunden auch für die T-Suppressorzellen eine gerichtete Bewegung zum Ort des chirurgischen Trauma darzulegen.

Chemokinrezeptoren

Bei den Rezeptoren (R) der Chemokine handelt es sich ausschließlich um 7-Transmembranproteine, deren Signaltransduktion an G-Proteine gekoppelt ist. Von einer Ausnahme abgesehen, binden die Chemokinrezeptoren nur Chemokine aus einer einzigen Klasse, so dass sich die Einteilung der Rezeptoren nach der Struktur der Liganden richtet.

Die Chemokinrezeptoren werden dementsprechend in CR (1), CCR (1-10), CXCR (1-6), CXXXCR (1) eingeteilt (Baggiolini et al., 1997, Luster, 1998).

Die Ausnahme der Chemokinrezeptoren bildet der DARC/Duffy-Rezeptor auf Erythrozyten, der sowohl CC-, als auch CXC-Chemokine binden kann (Darbonne, 1991).

Chemokinrezeptoren werden von verschiedenen Leukozyten-Populationen exprimiert. Die Expression hängt unter anderem von Aktivierungs- und Differenzierungsgrad der Zelle ab (Baggiolini et al., 1997, Luster, 1998).

So werden zum Beispiel die Rezeptoren CCR5 und CXCR3 auf aktivierten T_H1-Zellen gefunden, aber auch auf T-Suppressorzellen und auf Nicht-T-Zellen.

Die Chemokine werden in vier strukturelle Untergruppen aufgeteilt (C-, CC-, CXC- und CXXXC-Chemokine).

Zu den Wirkstoffen der CC-Klasse gehören MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES.

Zu den Wirkstoffen der CXC-Klasse gehören IP-10, MIG und I-TAC.

Chemokine scheinen einen großen Einfluss auf die gerichteten Bewegungen von Leukozyten zu haben. Sie spielen neben Selektinen und Integrinen eine Rolle bei lokalen Zellrekrutierungsprozessen:

- Aktivierung im Blut zirkulierender Leukozyten
 - Anheftung und Bindung an die Endothelzellen der Gefäßwand und
 - Durchtritt der Leukozyten zwischen den Endothelzellen (Extravasation)
- (siehe Abbildung 1, Seite 13), (Luster, 1998).

Am Ort eines Entzündungsgeschehens besteht eine hohe Chemokin-Konzentration. Diese gewährleistet die Chemotaxis, das heißt die zielgerichtete Bewegung der Zellen entlang dem Konzentrationsgradienten, in diesem Fall zu einem

Entzündungsherd oder einer Immunreaktion, wie sie auch bei chirurgischem Trauma hervorgerufen wird.

Im Rahmen eines Entzündungsprozesses wurden Chemokine in allen möglichen Geweben des menschlichen Körpers gefunden, so dass man davon ausgehen kann, dass die meisten, wenn nicht sogar alle Zellen, in der Lage sind, Chemokine zu sezernieren. Die Stimulation geht dabei von Zytokinen der frühen Entzündungsreaktion aus, wie IL-1 und TNF α (Luster, 1998).

Die Tatsache, dass man die Sekretion von Chemokinen bei einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen - wie zum Beispiel bakterieller Pneumonie, ARDS, Asthma, Arthritiden, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Psoriasis, bakterieller Meningitis und anderen – nachgewiesen hat (Luster, 1998), verdeutlicht, dass sie für das Anschoppen von Immunzellen am Ort der Entzündung verantwortlich sind.

Siveke et al. (1998) konnten zeigen, dass die CC-Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES chemotaktische Effekte auf T_H1-Zellen, jedoch nicht auf T_H2-Zellen ausüben.

Aus diesem Grund vermutet man, dass auch beim Abwandern von T_H1-Zellen zum Ort des chirurgischen Traumas (Decker et al., 1996) chemotaktische Signale eine Rolle spielen.

Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass es 48 Stunden nach einem chirurgischen Eingriff zu einem signifikanten Anstieg der CXCR3 exprimierenden T-Helferzellen in der peritonealen Drainageflüssigkeit kommt. Dieses spiegelt sich auch in einem hochsignifikanten Unterschied in den Relativwerten zu diesem Abnahmezeitpunkt wieder. Die Berechnungen der 48-Stunden-Werte weisen eine signifikante Korrelation ($r = 0,89$) zum Verhalten der CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten (= T-Helferzellen) in diesem Zeitraum auf.

Im Vergleich dazu nimmt die Konzentration der CXCR3 exprimierenden T-Helferzellen im Vollblut leicht ab, diese Abnahme ist jedoch nicht signifikant.

Die peritoneale Drainageflüssigkeit kann bezüglich der messbaren immunologischen Parameter dem Ort des chirurgischen Traumas bzw. der dadurch hervorgerufenen Entzündungsreaktion gleichgesetzt werden. Dies zeigen auch Untersuchungen von Luster (1998), der bei Patienten mit pulmonalen Erkrankungen (bakterielle

Pneumonie, ARDS, Asthma, Sarkoidose) und bei Patienten mit viraler Meningitis deutliche Konzentrationsanstiege von Chemokinen und T-Lymphozyten in der broncho-alveolären Flüssigkeit bzw. im Liquor nachweisen konnte, die mit dem Grad der Entzündung korrelierten.

Die nachgewiesene Zunahme der CXCR3 exprimierenden T-Helferzellen im peritonealen Drainagesekret nach 48 Stunden, sowie die signifikante Korrelation zu den CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten deuten darauf hin, dass der Chemokinrezeptor CXCR3 auf T-Helferzellen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von T-Lymphozyten zum Ort des chirurgischen Traumas spielt.

Da bekannt ist, dass der CXCR3-Rezeptor unter der Gruppe der T-Helferzellen im wesentlichen von den T_H1-Zellen exprimiert wird (Baggiolini, 1997, Bonecchi et al., 1998, Sallusto, 1999, Breitfeld, 2000), kann festgehalten werden, dass die chemotaktischen Einflüsse auf den CXCR3-Rezeptor beim Abwandern von T_H1-Zellen zum Ort des chirurgischen Traumas (Decker et al., 1996) von Bedeutung sind. Auf den CXCR3 Rezeptor wirken nur die chemotaktischen Signale der CXC-Chemokine, deren Wirkstoffe IP-10, MIG und I-TAC sind (Luster, 1998).

Demzufolge kann man postulieren, dass die Wirkstoffe IP-10, MIG und I-TAC in der peritonealen Drainageflüssigkeit ebenfalls erhöht sein müssten. Dies zu bestätigen, wird Ziel weiterer Untersuchungen auf diesem Gebiet sein.

Für die CCR5 exprimierenden T-Helferzellen konnten hingegen weder im Vollblut noch im peritonealen Drainagesekret signifikante Konzentrationsveränderungen ermittelt werden. Daraus muss man folgern, dass der CCR5-Rezeptor, der ebenfalls von der Subpopulation der T_H1-Zellen exprimiert wird (Baggiolini, 1997, Bonecchi et al., 1998), im Rahmen lokaler Zellrekrutierungsprozesse nach chirurgischem Trauma keine, oder nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Die CC-Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES, die nachgewiesenermaßen chemotaktische Effekte auf T_H1-Zellen haben (Siveke et al., 1998), scheinen demzufolge im Rahmen der postoperativen Immunreaktionen von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Die Annahme, dass eher die Chemokine der CXC-Klasse mit ihren Wirkstoffe IP-10, MIG und I-TAC am Ort des chirurgischen Traumas produziert werden und ihre chemotaktischen Eigenschaften über die CXC-Rezeptoren entfalten, wird von den Untersuchungsergebnissen der CXCR3 exprimierenden T-Suppressorzellen untermauert.

Für diese Lymphozyten-Gruppe konnte 48 Stunden postoperativ ebenfalls eine signifikante Konzentrationszunahme im Drainagesekret ermittelt werden. Im Vergleich zum Vollblut besteht zu allen drei Abnahmezeitpunkten eine signifikant bis hochsignifikant höhere Konzentration an CXCR3 exprimierenden T-Suppressorzellen im Drainagesekret. In gleicher Weise kommt dies auch bei den Relativwerten 48 Stunden postoperativ zum Ausdruck.

Es besteht eine hochsignifikante Korrelation ($r = 0,96$) zu dem Verhalten der CXCR3 exprimierenden T-Helferzellen nach chirurgischem Trauma im Drainagesekret.

Für die von T-Suppressorzellen exprimierten CCR5-Rezeptoren konnten vergleichbar zu den Berechnungen der T-Helferzellen keine Signifikanzen gefunden werden, so dass auch hiermit die These unterstützt wird, dass die Chemokine der CC-Klasse mit ihren Wirkstoffen MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES im Rahmen postoperativer Immunregulation eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen.

Um einen Vergleich zu den T-Lymphozyten zu haben, wurden dieselben Untersuchungen auch an Nicht-T-Zellen durchgeführt.

Die Nicht-T-Zellen, die den CXCR3-Rezeptor exprimieren, repräsentieren sich durch die natürlichen Killerzellen (Luster, 1998), die zur Gruppe der Lymphozyten gehören. Aktivierte natürliche Killerzellen können über die Freisetzung ihrer azurophilen Granula unspezifische zytotoxische Funktionen ausüben.

Die Untersuchungen zeigen im Gegensatz zu den CXCR3 exprimierenden T-Lymphozyten, dass es nach einem chirurgischen Trauma nicht zu einem Anstieg, sondern zu einer schwach signifikanten Konzentrationsabnahme der CXCR3 exprimierenden natürlichen Killerzellen im peritonealen Drainagesekret kommt. Im Vollblut hingegen nimmt diese Zellart nach einer Operation schwach signifikant zu.

Diese den T-Lymphozyten (T-Helferzellen und T-Suppressorzellen) gegenläufigen Berechnungen legen die Vermutung nahe, dass die Wirkmechanismen der entsprechenden Chemokine bei den lokalen Zellrekrutierungsprozessen, wie Aktivierung im Blut zirkulierender Leukozyten, Anheftung und Bindung an die Endothelzellen der Gefäßwand und Durchtritt der Leukozyten zwischen den Endothelzellen (Extravasation), möglicherweise T-Lymphozyten-spezifisch sind, und demzufolge nicht auf andere Zellen, wie hier die natürlichen Killerzellen, übertragen werden können.

Die Gruppe der Nicht-T-Zellen, die den Chemokinrezeptor CCR5 exprimieren, setzt sich zusammen aus den mononukleären Phagozyten (Makrophagen und antigen-präsentierende Zellen) und den natürlichen Killerzellen, die zur Gruppe der Lymphozyten gehören (Luster, 1998, siehe Abbildung 4 auf Seite 18). Für diese Gruppe der CCR5 exprimierenden Nicht-T-Zellen ließen sich in sämtlichen Vergleichen keine signifikanten Unterschiede aufweisen, so dass man davon ausgehen kann, dass diese Zellen nach einer Operation nicht einer gerichteten Bewegung unterliegen, die aufgrund eines durch CC-Chemokine vermittelten Reizes erfolgt.

Die in dieser Arbeit dargelegten Untersuchungen bestätigen eine lokale Zellrekrutierung von T-Helferzellen (CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten) am Ort des chirurgischen Trauma.

Zur Rolle der Chemokinrezeptoren bei der Migration von T-Helferzellen an den Ort des chirurgischen Traumas bzw. der lokalen Entzündung konnte gezeigt werden, dass der Chemokinrezeptor CXCR3 von Bedeutung ist. Da dieser unter den T-Helferzellen im wesentlichen auf den T_H1-Zellen exprimiert wird, kann man ihm eine Beteiligung am Abwanderungsprozess von T_H1-Zellen aus dem peripheren Blut zum Ort des chirurgischen Traumas zuschreiben.

Daraus lässt sich folgern, dass die Chemokine der CXC-Klasse mit ihren Wirkstoffen IP-10, MIG und I-TAC in den postoperativen Immunregulationsvorgängen ebenfalls eine wichtige Rolle einzunehmen scheinen, was auch durch die vergleichbaren Untersuchungen an T-Suppressorzellen bestätigt werden konnte.

Im Gegensatz dazu scheint der CCR5 Rezeptor bei den immunregulativen Mechanismen nach einer Operation keine, oder nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, gleiches gilt somit für die entsprechenden CC-Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES.

Wie vergleichbare Untersuchungen, die einen Konzentrationsanstieg von Chemokinen und Chemokinrezeptoren vor allem im Rahmen entzündlicher Erkrankungen beschrieben haben (Mack et al., 2001, Bruhl et al., 2001, Segerer 1999 u.a.), so konnte auch die vorliegende Studie am Ort der lokalen Entzündung infolge eines operativen Traumas einen Konzentrationsanstieg des Chemokinrezeptors CXCR3 auf T-Lymphozyten aufzeigen.

So spielen der CXCR3-Chemokinrezeptor und seine Chemokine sicherlich bei den lokalen Zellrekrutierungsprozessen nach einer Operation eine chemotaktische Rolle. Diese Rolle ist allerdings neben der von Adhäsionsmolekülen, wie P- und E-Selektin (Austrup et al., 1997, Sallusto et al., 1997), Integrinen, sowie auch neben der von Zytokinen einzuordnen.

Die Zukunftsvisionen bestehen darin, über die Entwicklung von Chemokinrezeptor-Agonisten oder Antagonisten therapeutisch-modulierend in die regulativen Vorgänge des postoperativen Immungeschehens einzugreifen.

Ferner könnten monoklonale Antikörper, ähnlich den natürlichen Liganden, ein geeignetes Vehikel sein, um nach Bindung an den Chemokinrezeptor pharmakologisch aktive Substanzen in intrazelluläre Kompartimente zu bringen.

Durch perioperatives Monitoring der posttraumatischen immunologischen Reaktionen und Identifizierung von Störungen, die potentiell zu einer erhöhten Infektions- und Komplikationsrate führen, könnten Voraussetzungen für neue, immunologisch-orientierte Präventivmaßnahmen und Therapieansätze geschaffen werden.

5. Zusammenfassung

Eine Operation ist ein Eingriff in die Integrität des menschlichen Organismus. Diese Trauma führt, vergleichbar einer lokalen Entzündung, zu komplexen immunologischen Reaktionen. Die Abwehrreaktion des menschlichen Organismus besteht darin, vermehrt Bestandteile des Immunsystems an den Verletzungsort bzw. Infektionsherd zu transportieren. Zu diesem Zweck erhöht sich die Blutzufuhr zum Ort der Immunreaktion, die Kapillarpermeabilität nimmt zu und Leukozyten treten aus den Kapillaren in das umgebende Gewebe aus. Im Gewebe wandern sie chemotaktisch gesteuert auf den Infektionsort zu.

Entsprechend der Schwere des Gewebetraumas wandern T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1 -Zellen) zum Ort des chirurgischen Traumas bzw. der lokalen Entzündung ab. So konnte aufgezeigt werden, dass es nach chirurgischen Eingriffen zu einer Schwächung der zellulären, zytotoxischen Immunabwehr kommt, die durch eine Reduzierung der T_H1 -Zellen im Blut charakterisiert ist (Decker et al., 1996).

Vor diesem Hintergrund erfolgten die Untersuchungen von Lymphozyten-Subpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker und der von verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimierten Chemokinrezeptoren, um zu klären, welche Rolle die Chemokinrezeptoren bei der Migration von T-Helferzellen an den Ort des chirurgischen Traumas bzw. der lokalen Entzündung spielen. Die Untersuchungen wurden an 21 Patienten nach elektiven abdominal-chirurgischen Eingriffen vergleichend im Vollblut und im peritonealen Drainagesekret vorgenommen.

Die in der vorliegenden Studie dargelegten Untersuchungen bestätigen eine lokale Zellrekrutierung von T-Helferzellen ($CD3^+/CD4^+$ -Lymphozyten) am Ort des chirurgischen Trauma.

Zur Rolle der Chemokinrezeptoren bei der Migration von T-Helferzellen an den Ort des chirurgischen Traumas bzw. der lokalen Entzündung konnte gezeigt werden, dass der Chemokinrezeptor CXCR3 von Bedeutung ist. Da dieser unter den T-Helferzellen im wesentlichen auf den T_H1 -Zellen exprimiert wird, kann man ihm eine Beteiligung am Abwanderungsprozess von T_H1 -Zellen aus dem peripheren Blut zum Ort des chirurgischen Traumas zuschreiben.

Daraus lässt sich folgern, dass die Chemokine der CXC-Klasse mit ihren Wirkstoffen IP-10, MIG und I-TAC in den postoperativen Immunregulationsvorgängen ebenfalls eine wichtige Rolle einzunehmen scheinen, was auch durch die vergleichbaren Untersuchungen an T-Suppressorzellen bestätigt werden konnte.

Im Gegensatz dazu zeigt die Arbeit, dass der CCR5 Rezeptor bei den immunregulativen Mechanismen nach einer Operation keine, oder nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

6. Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APC	antigen-presenting-cells = Antigen-präsentierende Zellen
ARDS	acute respiratory distress syndrom
B-Zellen	Lymphozyten-Untergruppierung
C	Celsius
CL, CCL, CXCL und CXXXCL	Chemokin-Typen (C = Cystein, X = Aminosäure)
CR, CCR, CXCR und CXXXCR	Chemokin-Rezeptoren-Typen (C = Cystein, X = Aminosäure)
CD	Cluster of Differentiation, Lymphozyten-Oberflächenrezeptoren
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ -Zellen	T-Helferzellen
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ -Zellen	T-Suppressorzellen = zytotoxische T-Zellen
ECF-A	eosinophiler chemotaktischer Faktor der Anaphylaxie
ELISA	enzym-linked immunosorbant assay
Fab	Antigen-bindender Anteil des Antiköpers
FACS	fluorescent activated cell sorter
Fc	Immunzellen-bindender Anteil des Antikörpers
FcR	Rezeptoren / Bindungsstellen für Antikörper auf Immunzellen
g	Gramm
G	Grading
h	Stunde(n)
IFN _γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin (A, D, E, G und M)

IL	Interleukin
IP-10	interferon-inducible protein 10
I-TAC	interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
J	Journal
J	Jahre
kDa	Kilo-Dalton
L	Ligand
LGL-Zellen	große granuläre Lymphozyten, Lymphozyten-Untergruppierung
m	männlich
M	Metastasenstadium (M 0/1)
MCP	Membran-Cofaktor-Protein
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
Min	Minute(n)
MIP	macrophage inflammatory protein (MIP-1 α/β)
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
N	Lymphknotenstadium (N 0-2)
n	Anzahl der Patienten
NK	natürliche Killerzellen
OFM	Oberflächenmarker
OP	Operation
p	Signifikanz

pN	pathologisches Lymphknotenstadium (pN0-2)
pT	pathologisches Tumorstadium (pT 1-4)
r	Korrelationskoeffizient
RANTES	regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes
T	Tumorstadium (T 1-4)
T-Zellen	Lymphozyten-Untergruppierung
T _C -Zellen	zytotoxische T-Zellen
T _{H0} -Zellen	naive T-Zellen
T _{H1} -Zellen	T-Helferzellen Typ 1
T _{H2} -Zellen	T-Helferzellen Typ 2
TCR	T-Zell-Antigenrezeptor (TCR 1 und 2)
TGF	tumor growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	und andere
w	weiblich

7. Literaturverzeichnis

Austrup, F., D. Vestweber, E. Borges, M. Lohning, R. Bauer, U. Herz, H. Renz, R. Hallmann, A. Scheffold, A. Radbruch and E. Hamann (1997). P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissue. *Nature* **385**: 81-83.

Baggiolini, M., B. Dewald and B. Moser (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines, CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* **55**: 97-179.

Baggiolini, M., B. Dewald and B. Moser (1997). Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* **15**: 675-705.

Blanpain, C., J. M. Vanderwinden, J. Cihak, V. Wittamer, E. Le Poul, H. Issafras, M. Stangassinger, G. Vassart, S. Marullo, D. SchIndorff, M. Parmentier and M. Mack (2002). Multiple active states and oligomerization of CCR5 revealed by functional properties of monoclonal antibodies. *Mol Biol Cell* **13**(2): 723-37.

Bleul, C. C., L. Wu, J. A. Hoxie, T. A. Springer and C. R. Mackay (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1925-30.

Bonecchi, R., G. Bianchi, P.P. Bordington, D. D'Ambrosio, R. Lang, A. Borsatti, S. Sozzani and P. Allavena (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 helper cells and Th2s. *J Exp Med* **187**: 129-34.

Boring, L., J. Gosling, S.W. Chensue, S.L. Kunkel, R.V. Farese jr., H.E. Broxmeyer and I.F. Charo (1997). Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C-chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest* **100**(10): 2552-61

Breitfeld, D., L. Ohl, E. Kremmer, J. Ellwart, F. Sallusto, M. Lipp and R. Forster (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* **192**(11): 1545-52.

Bromley, S. K., W. R. Burack, K. G. Johnson, K. Somersalo, T. N. Sims, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen and M. L. Dustin (2001). The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* **19**: 375-96.

Bruhl, H., K. Wagner, H. Kellner, M. Schattenkirchner, D. Schlondorff and M. Mack (2001). Surface expression of CC- and CXC-chemokine receptors on leucocyte subsets in inflammatory joint diseases. *Clin Exp Immunol* **126**(3): 551-9.

Campbell, J. J., G. Haraldsen, J. Pan, J. Rottman, S. Qin, P. Ponath, D. P. Andrew, R. Warnke, N. Ruffing, N. Kassam, L. Wu and E. C. Butcher (1999). The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* **400**(6746): 776-80.

- Campbell, J.J., J. Hedrick, A. Zlotnik, M.A. Siani, D.A. Thompson and E.C. Butcher (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* **279**: 381-82.
- Clevers, H., B. Alarcon, T. Wileman and C. Terhorst (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* **6**: 629-62.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326(Pt 1)**: 1-16.
- Colcher, D., G. Pavlinkova, G. Beresford, B. J. Booth, A. Choudhury and S. K. Batra (1998). Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. *Q J Nucl Med* **42(4)**: 225-41.
- Croft, M. and C. Dubey (1997). Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Crit Rev Immunol* **17(1)**: 89-118.
- Decker, D., M. Schöndorf, F. Bidlingmaier, A. Hirner and A. v. Rücker (1996). Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 T-helper cell balance, suggesting downregulation of cell mediated and upregulation of antibody mediated immunity commensurate to the trauma. *Surgery* **119**: 316-25.
- Gerard, C. and B. J. Rollins (2001). Chemokines and disease. *Nat Immunol* **2(2)**: 108-15.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen and M. L. Dustin (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285(5425)**: 221-7.
- Grewal, I. S. and R. A. Flavell (1996). The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* **153**: 85-106.
- Hack, C. E., L. A. Aarden and L. G. Thijs (1997). Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol* **66**: 101-95.
- Hancock, W. W., B. Lu, W. Gao, V. Csizmadia, K. Faia, J. A. King, S. T. Smiley, M. Ling, N. P. Gerard and C. Gerard (2000). Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J Exp Med* **192(10)**: 1515-20.
- Hudson, P. J. and C. Souriau (2003). Engineered antibodies. *Nat Med* **9(1)**: 129-34.
- Izikson, L., R. S. Klein, I. F. Charo, H. L. Weiner and A. D. Luster (2000). Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med* **192(7)**: 1075-80.
- Janeway, C. A. a. T., P. (1997). *Immunologie*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Ju, S. T., H. Cui, D. J. Panka, R. Ettinger and A. Marshak-Rothstein (1994). Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4+ Th1 and CD8+ cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(10): 4185-9.

Kaplan, D. (1996). Autocrine secretion and the physiological concentration of cytokines. *Immunol Today* **17**(7): 303-4.

Kroemer, G., N. Zamzami and S. A. Susin (1997b). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* **18**(1): 44-51.

Lagasse, E. and I. L. Weissman (1996). Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J Immunol Methods* **197**(1-2): 139-50.

Luster, A.D. (1998). Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New England J Medicine* **338**(7): 436-42.

Lumsden, J. M., S. J. Prasad, R. J. Peach and F. Ronchese (2003). The effects of B7-dependent costimulation on T cell division and survival in vivo and in vitro are dependent on antigen concentration. *Eur J Immunol* **33**(8): 2074-82.

Mack, M., H. Bruhl, R. Gruber, C. Jaeger, J. Cihak, V. Eiter, J. Plachy, M. Stangassinger, K. Uhlig, M. Schattenkirchner and D. Schlondorff (1999). Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis. *Arthritis Rheum* **42**(5): 981-8.

Mack, M., J. Cihak, C. Simonis, B. Luckow, A. E. Proudfoot, J. Plachy, H. Bruhl, M. Frink, H. J. Anders, V. Vielhauer, J. Pfirstinger, M. Stangassinger and D. Schlondorff (2001). Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol* **166**(7): 4697-704.

Mack, M. and D. Schlondorff (2000). Downmodulation and Recycling of Chemokine Receptors. *Chemokine Protocols*. A. E. Proudfoot. Totowa, Humana Press Inc. **138**: 191-196.

Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, S. Manes and A. C. Martinez (2001). Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* **19**: 397-421.

Miller, F. (2000). Introduction to Chemokine Families and the Cells they affect. University of Stony Brook, School of Medicine, Pathology Department. 2000. Figure 1-5

Murai, M., H. Yoneyama, A. Harada, Z. Yi, C. Vestergaard, B. Guo, K. Suzuki, H. Asakura and K. Matsushima (1999). Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest* **104**(1): 49-57.

- Murphy, P. M., M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim and C. A. Power (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **52**(1): 145-76.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* **88**(3): 355-65.
- Nelson, P. J. and A. M. Krensky (1998). Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around. *Curr Opin Immunol* **10**(3): 265-70.
- Perez de Lema, G., H. Maier, E. Nieto, V. Vielhauer, B. Luckow, F. Mampaso and D. Schlondorff (2001). Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* **12**(7): 1369-82.
- Plater-Zyberk, C., A. J. Hoogewerf, A. E. Proudfoot, C. A. Power and T. N. Wells (1997). Effect of a CC chemokine receptor antagonist on collagen induced arthritis in DBA/1 mice. *Immunol Lett* **57**(1-3): 117-20.
- Ramsdell, F., M. S. Seaman, R. E. Miller, K. S. Picha, M. K. Kennedy and D. H. Lynch (1994). Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. *Int Immunol* **6**(10): 1545-53.
- Randolph, D. A., G. Huang, C. J. Carruthers, L. E. Bromley and D. D. Chaplin (1999). The role of CCR7 in TH1 and TH2 cell localization and delivery of B cell help in vivo. *Science* **286**(5447): 2159-62.
- Reed, J. C. (1997). Cytochrome c: can't live with it--can't live without it [comment]. *Cell* **91**(5): 559-62.
- Rodriguez-Frade, J. M., M. Mellado and A. C. Martinez (2001). Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends Immunol* **22**(11): 612-7.
- Roitt, I. M., J. Brostoff and D.K. Male (1996). *Immunology*. London, Mosby, Time Mirror International Publishers Limited. Deutsche Auflage (1997), Stuttgart, Thieme Verlag.
- Rollins, B. J., T. Yoshimura, E. J. Leonard and J. S. Pober (1990). Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* **136**(6): 1229-33.
- Russell, J. H. and T. J. Ley (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20**: 323-70.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**(6754): 708-12.

Sallusto, F., D. Lenig, C. R. Mackay and A. Lanzavecchia (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* **187**(6): 875-83.

Sallusto, F., C. R. Mackay and A. Lanzavecchia (1997). Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* **277**(5334): 2005-7.

Santana, M. A. and Y. Rosenstein (2003). What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. *J Cell Physiol* **195**(3): 392-401.

Segerer, S., Y. Cui, F. Eitner, T. Goodpaster, K. L. Hudkins, M. Mack, J. P. Cartron, Y. Colin, D. Schlondorff and C. E. Alpers (2001). Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection. *Am J Kidney Dis* **37**(3): 518-31.

Segerer, S., K. M. Mac, H. Regele, D. Kerjaschki and D. Schlondorff (1999). Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney diseases. *Kidney Int* **56**(1): 52-64.

Siveke, J. and A. Hamann (1998). T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunology* **160**: 550-54

Sozzani, S., M. Locati, P. Allavena, J. Van Damme and A. Montavani (1996). Chemokines: a superfamily of chemotactic cytokines. *Int J Lab Res* **26**: 69-82.

Tanaka, Y., D. H. Adams and S. Shaw (1993). Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today* **14**(3): 111-5.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**(5203): 1456-62.

Witt, D. P. and A. D. Lander (1994). Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr Biol* **4**(5): 394-400.

Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**(2): 121-7.

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Lehrer, Unterstützer und Chef Herrn Prof. Dr. med. Hans Schwering, außerplanmäßiger Professor für Chirurgie an der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster und Chefarzt der chirurgischen Abteilung des akademischen Lehrkrankenhauses Marienhospital Euskirchen für die Überlassung des Themas meiner Dissertation, sowie die immer freundliche und kompetente Hilfestellung bei dieser Arbeit.

Bei Frau PD Dr. med. Dorothee Decker, Oberärztin der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, bedanke ich mich ganz herzlich für die sehr freundliche, schnelle und fachkompetente Beratung.

Meinem Verlobten und zukünftigen Mann Eduard Brück danke ich ganz besonders für seine andauernde liebevolle Unterstützung und die großartige Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Danke, dass du einfach immer für mich da warst.

Ein ganz großer Dank geht an meine Eltern Ute und Helmut Adam sowie an meinen Bruder Andreas Adam für ihre immerwährende Unterstützung, ihr Interesse und ihren stetigen Zuspruch. Meinen Eltern danke ich ganz besonders für alles, was sie mir ermöglicht haben und noch immer tun.

Meinen Kollegen danke ich für die hilfreichen Anregungen und Tipps.
Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre stets aufmunternden Worte und für ihre Geduld.