Universitätsklinikum Ulm

Klinik für Anästhesiologie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. hc. M. Georgieff

# Oberflächenmarkerexpression auf Monozyten von Patienten mit nicht-infektiösen bzw. infektiösen Entzündungsreaktionen, d. h. mit Polytrauma, Sepsis, Hämophagozytischer Lymphohistiozytose, Langerhanszellhistiozytose und Overtrainingsyndrom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Maria Katharina Rullmann

Regensburg

2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred Weiß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Huber-Lang

Tag der Promotion: 14.11.2014

# Inhaltsverzeichnis

**Abkürzungsverzeichnis ..... III**

**1. Einleitung ..... 1**

**1.1. Monozyten/Makrophagen ..... 1**

**1.2. Immunphänotypisierung und Oberflächenmarker ..... 2**

**1.3. Krankheitsbilder ..... 5**

1.3.1. Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH) ..... 5

1.3.2. Langerhanszellhistiozytose (LCH) ..... 6

1.3.3. Overtrainingsyndrom (OTS) ..... 6

1.3.4. SIRS/Sepsis ..... 7

1.3.5. Polytrauma ..... 8

**1.4. Fragestellung ..... 9**

**2. Material und Methoden ..... 11**

**2.1. Patientenkollektiv ..... 11**

2.1.1. HLH ..... 11

2.1.2. LCH ..... 11

2.1.3. OTS ..... 12

2.1.4. Sepsis ..... 13

2.1.5. Polytrauma ..... 13

2.1.6. Kontrollgruppen ..... 14

**2.2. Materialien ..... 15**

**2.3. Probenaufbereitung ..... 16**

**2.4. Durchflusszytometrie ..... 16**

**2.5. Statistische Auswertung ..... 19**

**3. Ergebnisse ..... 21**

**3.1. Vergleich der Patientengruppen mit den gesunden Probanden ..... 23**

**3.2. Ergebnisse der Polytraumagruppe ..... 37**

3.2.1. Vergleich der Abnahmezeitpunkte innerhalb der Polytrauma-Gruppe ..... 37

3.2.2. Auffälligkeiten im posttraumatischen Verlauf ..... 38

3.2.3. Polytrauma vs. HLH ..... 46

3.2.4. Polytrauma vs. Sepsis ..... 47

**3.3. OTS vs. Kontrolle ..... 49**

**3.4. Leistungssportler vs. Kontrolle ..... 50**

**3.5. OTS vs. Leistungssportler** ..... **51**
**3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse** ..... **53**
**4. Diskussion** ..... **54**
**4.1. Oberflächenmarkerexpression der Patientengruppen im Vergleich zur Kontrolle** ..... **54**
4.1.1. CD4 ..... 54
4.1.2. CD11b ..... 55
4.1.3. CD14 ..... 56
4.1.4. CD16 ..... 57
4.1.5. CD45 ..... 59
4.1.6. CD64 ..... 60
4.1.7. CD95 ..... 61
4.1.8. CD163 ..... 62
4.1.9. HLA-DR ..... 63
**4.2. Expressionsmuster innerhalb der Gruppen** ..... **64**
**4.3. Auffälligkeiten im posttraumatischen Verlauf** ..... **66**
4.3.1. Score-Werte und klinische Besonderheiten ..... 67
4.3.2. CD11b/CD14 ..... 68
4.3.3. CD64 ..... 69
4.3.4. CD163 ..... 71
4.3.5. HLA-DR ..... 72
**4.4. Ähnlichkeiten im Expressionsmuster von Polytrauma, Sepsis und HLH** ..... **73**
**4.5. Expressionsmuster bei OTS im Vergleich zu Leistungssportlern** ..... **76**
**4.6. Schlussfolgerung** ..... **78**
**5. Zusammenfassung** ..... **81**
**6. Literaturverzeichnis** ..... **83**
**Danksagung** ..... **97**
**Curriculum vitae** ..... **98**

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| ADCC | Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity |
| AH | Arterielle Hypertonie |
| AIS | Abbreviated Injury Scale |
| ALCL | Anaplastisches Großzellymphom |
| APC | Antigen Presenting Cell |
| ARDS | Acute Respiratory Distress Syndrome |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BWS | Brustwirbelsäule |
| CARS | Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CLL | Chronisch lymphatische Leukämie |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CTL | Cytotoxischer T-Lymphozyt |
| DAMP | Danger-/Damage Associated Molecular Pattern |
| DM | Diabetes mellitus |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| G-CSF | Granulocyte-Colony Stimulating Factor |
| GM-CSF | Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor |
| Hb | Hämoglobin |

| | |
|---|---|
| HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| HLA-DR | Human Leukocyte Antigen-DR |
| HLH | Hämophagozytische Lymphohistiozytose |
| Hp | Haptoglobin |
| HSP | Hitzeschockprotein |
| HWS | Halswirbelsäule |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| ISS | Injury Severity Score |
| LBP | Lipopolysaccharid-bindendes-Protein |
| LCH | Langerhanszellhistiozytose |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LWS | Lendenwirbelsäule |
| MCP | Macrophage Chemoattractant Protein |
| MFI | Mean Fluorescence Intensity |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| MODS | Multi Organ Dysfunction Syndrome |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| OTS | Overtrainingsyndrom |
| PAMP | Pathogen Associated Molecular Pattern |
| PE | Phycoerythrin |
| PGE2 | Prostaglandin E2 |

| | |
|---|---|
| PRR | Pathogen Recognition Receptor |
| SAB | Subarachnoidalblutung |
| SAPS | Simplified Acute Physiology Score |
| SCT | Stammzelltransplantation |
| SHT | Schädel-Hirn-Trauma |
| SIRS | Systemic Inflammatory Response Syndrome |
| SLE | Systemischer Lupus Erythematodes |
| SOFA | Sequential Organ Failure Assessment |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

# 1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression verschiedener Oberflächenantigene von Monozyten bei den Krankheitsbildern Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) bzw. Sepsis, Polytrauma, Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH), Langerhans-Zell-Histiozytose (LCH) und Overtraining Syndrom (OTS) untersucht. Bei diesen Krankheitsbildern ist eine pathophysiologische Rolle der Monozyten bekannt. Unklar ist jedoch, inwiefern sich die einzelnen Krankheitsbilder anhand des Expressionsmusters von Oberflächenmarkern unterscheiden lassen.

## 1.1. Monozyten/Makrophagen

Der Anteil der Monozyten im Blut beträgt 1-5%. Sie haben ihren Ursprung in der myeloiden Vorläuferreihe und zirkulieren einige Tage im Blut, bevor sie ins Gewebe einwandern und sich zu verschiedenen Arten von Makrophagen differenzieren [207]. Monozyten/Makrophagen spielen eine wichtige Rolle in der ersten Phase der Immunantwort. Mit polymorphkernigen Granulozyten und NK-Zellen gehören sie zu den Zellen des unspezifischen (angeborenen) Immunsystems und sind bedeutend an der Abwehr pathogener Mikroorganismen beteiligt, indem sie Antigene aufnehmen, prozessieren und an T-Helfer-Zellen präsentieren um eine spezifische Immunantwort auszulösen. Monozyten sind also Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Sie töten Pathogene auch direkt durch Phagozytose und oxidative Reaktionen. Außerdem lösen sie über proinflammatorische Mediatoren die Akute-Phase-Antwort aus und sezernieren verschiedene Transmitter wie Zytokine und Chemokine, die wiederum zur Migration von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe führen [124]. Monozyten werden anhand ihrer unterschiedlichen Expression der Oberflächenmoleküle CD14 und CD16 in drei Subpopulationen unterteilt, wobei diese in einer graduellen Beziehung stehen und sich in der Expression von Rezeptoren und Produktion von Zytokinen unterscheiden [225]. Zuerst wurden die sogenannten klassischen, CD14-positiven Monozyten entdeckt (CD14++CD16-). Zudem werden „intermediate“ (CD14+CD16+) und nicht-klassische (CD14+CD16++) Monozyten beschrieben, die sich durch Expression von CD16 auszeichnen. Die CD16-positiven Monozyten machen etwa 10% der gesamten Monozyten aus [20].

## 1.2. Immunphänotypisierung und Oberflächenmarker

Die verschiedenen Zellen des Immunsystems werden anhand der Expression bestimmter Zelloberflächenmarker, sogenannter cluster of differentiation (CD), klassifiziert. Mittels monoklonaler Antikörper und Durchflusszytometrie lassen sich diese Antigene bestimmen und so Rückschlüsse auf Art und Aktivierungszustand der Zellen ziehen. Die in dieser Arbeit untersuchten Oberflächenmarker werden im Folgenden kurz vorgestellt:

### CD 4

CD4 ist ein Glykoprotein, das zuerst auf regulatorischen und T-Helfer-Lymphozyten entdeckt wurde. Es fungiert hier als Corezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle und erhöht die Avidität der Bindung zwischen antigenpräsentierender Zelle und T-Zell-Rezeptorkomplex [168]. Außerdem ist CD4 zusammen mit Chemokinrezeptoren Bindungsstelle für das Glykoprotein(gp)120 des HIV-1 [27]. Ein weiterer Ligand ist das proinflammatorische Interleukin (IL-)16, das unter anderem über CD4 eine Rekrutierung von T-Zellen an Entzündungsorte bewirkt [127]. Auf Zellen der myeloiden Reihe wie Monozyten und Makrophagen wird CD4 ebenfalls exprimiert, jedoch ist die Expression geringer und es handelt sich eventuell um eine veränderte Isoform des Moleküls [104, 128]. Über die Funktion der Monozyten-typischen Isoform ist bisher nur wenig bekannt [78].

### CD11b (MAC-1, IntegrinαM, CR3)

Leukozytenadhäsionsrezeptoren vermitteln die Bindung von Zellen an Endothel. Sie enthalten eine β-Kette (CD18), die im Falle von Monozyten und neutrophilen Granulozyten mit dem Molekül CD11b assoziiert ist. Dieser Komplex interagiert mit den interzellulären Adhäsionsmolekülen ICAM-1 (aktiviertes Endothel bei Inflammation) und ICAM-2 (ruhendes Endothel) [187]. Damit spielt der Rezeptor eine Rolle bei der transendothelialen Migration von Monozyten [2] und als Rezeptor für den Komplementfaktor iC3b bei der Phagozytose von opsonierten Zielzellen. Andere Liganden sind Haptoglobin, Faktor X, Fibrinogen und LPS im Komplex mit LBP [8, 212, 219].

### CD14

CD14 ist ein Glykoprotein das als myeloider Differenzierungsmarker typischerweise auf Monozyten exprimiert wird, aber auch auf Granulozyten und B-Lymphozyten zu finden ist. CD14 gehört zu den sogenannten pattern recognition receptors (PRR) und ist der Rezeptor für den Komplex aus dem Lipopolysaccharid gram-negativer Bakterien und LBP; aber

auch Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien wie Lipoteichonsäure und Peptidoglykane können an CD14 binden und führen zu einer Aktivierung der Zellen. LPS bewirkt eine verstärkte Expression von CD14 [131], wohingegen es bei Immunsuppression beispielsweise durch Medikamente oder im Rahmen einer Sepsis zu einer verminderten Expression kommt [29, 178]. Außerdem spielt CD14 eine Rolle bei der Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen [178].

CD16 (FcγRIII)

CD16 ist Bestandteil des niedrigaffinen Fcγ-Rezeptors Typ III, der Immunglobuline bindet und eine Rolle bei Zellaktivierung und antikörpervermittelten Zytotoxizität (ADCC) spielt. CD16 wird auf bestimmten Monozyten-Untergruppen exprimiert. Dabei handelt es sich um sogenannte „proinflammatorische“ „intermediate subset“ CD14++CD16+ Monozyten und „nicht-klassische“, CD14+CD16++, Monozyten, die sich u.a. in der Produktion von Zytokinen und ihrem transendothelialen Migrationsverhalten unterscheiden und bei entzündlichen Erkrankungen expandieren [164, 223].

CD45 (leucocyte common antigen)

CD45 wird auf allen kernhaltigen Zellen der hämatopoetischen Reihe in hohem Maße exprimiert und gilt als Prototyp der transmembranen Tyrosinphosphatase. Sie reguliert die Signaltransduktion über Zytokinrezeptoren und beeinflusst so verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Zellzyklus [49, 155]. Zudem ist CD45 beteiligt an Neutrophilen-Chemotaxis, dem respiratory burst von Phagozyten und der Integrin-vermittelten Adhäsion von Makrophagen [122]. Das Molekül wird in verschiedenen Spleißvarianten exprimiert. Veränderungen in der CD45-Konfiguration können zu Autoimmunerkrankungen oder Immundefizienzen wie z.B. im Rahmen der severe combined immunodeficiency (SCID) führen.

CD64 (FCγRI)

CD64 wird auf Monozyten (vor allem der „klassischen“ Subgruppe CD14+CD16-) und Makrophagen konstitutiv exprimiert und ist ein hochaffiner Rezeptor für den Fc-Teil des Immunglobulin G. CD64 vermittelt die Phagozytose von IgG-gebundenen Antigenen im Rahmen der ADCC. Zudem bindet CD64 das Akute-Phase-Protein CRP [202] und präsentiert Antigene an T-Zellen. CD64 zählt zu den aktivierenden Fcγ-Rezeptoren. Eine verstärkte Expression dieser Moleküle setzt die Aktivierungsschwelle von Monozyten

herab und führt nach Bindung von IgG zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF-α, die zu einer Stimulation und Persistenz der Immunantwort führen [165, 174]. Die monozytäre Expression von CD64 kann durch IFN-γ und G-CSF hochreguliert werden [152], antiinflammatorische Zytokine führen hingegen zu verringerter Expression [59].

CD95 (Fas, Apo-1)

CD95 gehört zur TNF-Rezeptor-Superfamilie und ist ein Rezeptor des extrinsischen Apoptoseweges, der für Aktivierungs-abhängigen Zelltod, T-Zell-vermittelte Zytotoxizität, Entwicklung und Homöostase von T- und B-Lymphozyten und Proliferation von Tumorzellen bedeutsam ist. Bei Ligandenbindung kommt es zu einer Signalkaskade, die über verschiedene Caspasen den programmierten Zelltod auslöst [147]. Dieser dient zur Eliminierung nicht länger benötigter Immunzellen und somit zur kontrollierten Beendigung der Immunantwort [147]. Es gibt Hinweise, dass CD95 abhängig vom Reifegrad des Monozyten über andere Signalwege auch Aktivierungssignale vermittelt und zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine aus Monozyten und Makrophagen führt [153].

CD163

CD163 ist ein Scavenger-Rezeptor, der ausschließlich auf Monozyten (besonders CD14++) und Makrophagen exprimiert wird und eine Schlüsselrolle in antiinflammatorischen Prozessen und Wundheilung spielt [176]. CD163 bindet den bei der Hämolyse von Erythrozyten entstehenden Komplex aus Hämoglobin und Haptoglobin. Dies führt zur Endozytose des Komplexes und Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen [111]. Matrixmetalloproteinasen können das membrangebundene CD163 lysieren, sodass die lösliche Form s(soluble)CD163 freigesetzt wird [46]. Erhöhte Mengen an sCD163 findet man bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen [38]. Als Scavenger-Rezeptor kann CD163 zudem Bakterien binden, worauf eine Freisetzung proinflammatorischer Zytokine folgt [57].

HLA-DR

HLA-DR gehört zu den MHC-Klasse-II-Molekülen. Diese befinden sich auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen wie Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Lymphozyten. Die Aufgabe der MHC-Klasse-II-Moleküle besteht darin, prozessierte

extrazelluläre Antigene an CD4+-T-Helferzellen zu präsentieren. Der Komplex aus MHC-Molekül und gebundenem Fremd-Peptid bildet den Liganden für T-Zellen und ist somit die Voraussetzung für die Erkennung eines Antigens durch T-Zellen und deren nachfolgende Aktivierung und Expansion [147]. Daraus folgt, dass es bei verringerter Expression von HLA-DR zu einer verminderten Aktivierung des spezifischen Immunsystems kommt. HLA-DR spielt außerdem ein Rolle bei der Aktivierung von Phagozyten durch bakterielle Superantigene [161] und dient als Surrogatparameter für monozytäre Funktionsfähigkeit [51].

## 1.3. Krankheitsbilder

Diese Arbeit sollte Hinweise auf die Rolle von Monozyten unter verschiedenen inflammatorischen Bedingungen geben. Dazu wurden Patienten mit den folgenden Erkrankungen untersucht, die alle eine Hyperinflammation oder Immunsuppression und pathologische Funktion von Monozyten gemeinsam haben:

### 1.3.1. Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH)

Bei der HLH handelt es sich um einen lebensbedrohlichen Zustand der Hyperinflammation, der durch eine überschießende, jedoch ineffektive Immunantwort entsteht. Eine Schlüsselrolle spielen dabei übermäßig aktivierte Lymphozyten und Histiozyten, die Organe infiltrieren und vermehrt Zytokine produzieren. Infolge dessen kommt es zu den typischen, jedoch unspezifischen Symptomen der HLH: Zytopenie, Hämophagozytose, Hepatosplenomegalie und prolongiertem Fieber. Im Blutbild findet man unter anderem eine Hyperferritinämie, erhöhte Triglyceride und Transaminasen sowie erniedrigtes Fibrinogen [7, 98]. Auslöser der HLH ist eine gestörte Funktion des Immunsystems, die entweder angeboren (Familiäre HLH) oder erworben sein kann. Im Mittelpunkt steht dabei eine verminderte Funktion von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxischen T-Zellen (CTL) [179, 192]. Der Immundefekt ist vor allem auf Mutationen in Genen zurückzuführen, die eine Rolle bei der Exozytose-vermittelten Zytotoxizität spielen, wie z.B. das Perforin–Gen [190]. Normalerweise führen aus zytotoxischen Granula freigesetzte Serinproteasen zu einer Apoptose der Zielzellen. Dieser Mechanismus dient zum einen der Eliminierung intrazellulärer Pathogene, zum anderen der Lymphozytenhomöostase und Beendigung einer Immunantwort. Durch pathologisch persistierende Aktivität der NK-,T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen werden große Mengen an Zytokinen ausgeschüttet, hierbei sind vor allem IFN-γ, löslicher IL-2 Rezeptor (sCD25), TNF-α, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und IL-18 zu nennen [86, 98, 179]. Neben der familiären Form, bei der

das Bild der HLH als Hauptmanifestation auftritt, findet sich der Phänotyp auch im Zusammenhang mit anderen Immundefizienz-Erkrankungen wie dem Chédiak-Higashi-Syndrom oder dem Griscelli-Syndrom, bei denen ähnliche zelluläre Signalwege von einer Mutation betroffen sind [13]. Die erworbene HLH wird vor allem im Zusammenhang mit Infektionskrankheiten, z.B. mit Viren der Herpesgruppe wie EBV und CMV [22, 45, 172], malignen Erkrankungen wie Lymphomen und bei Patienten mit iatrogener Immunsuppression nach Organtransplantation oder Chemotherapie beschrieben [115, 184].

### 1.3.2. Langerhanszellhistiozytose (LCH)

Die LCH ist eine seltene Erkrankung die ebenfalls zu den Histiozytosen gezählt wird und durch eine lokale oder generalisierte Proliferation von pathologischen, CD1a/CD207-positiven Langerhanszellen gekennzeichnet ist. Diese Zellen ähneln den epidermalen Langerhanszellen, einer Form von Dendritischen Zellen, entsprechen jedoch aufgrund ihres Oberflächenexpressionsmusters unreifen Zellen. Durch die untypische Rezeptorexpression kommt es zu fehlerhaftem, pathogenem Verhalten der LCH-Zellen [10]. Ob sie reaktiv entstehen oder neoplastischen Ursprungs sind, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden [43]. Die Läsionen sind auch durch eine Invasion anderer Immunzellen wie Makrophagen, T-Lymphozyten und NK-Zellen gekennzeichnet. Die beteiligten Zellen führen zu massiver, sich gegenseitig amplifizierender Zytokinausschüttung, die systemische Symptome wie Fieber bedingt und Osteolysen sowie Fibrosierung von Organen zur Folge haben kann [54]. Die klinische Präsentation ist variabel und reicht von einzelnen, spontan remittierenden Knochenläsionen bis hin zur Multisystemerkrankung, die schlimmstenfalls zu Organversagen führen kann. Kinder sind am häufigsten betroffen. Bei ihnen kommt es meist zu einem disseminierten Befall innerer Organe und des zentralen Nervensystems. Bei Erwachsenen beobachtet man vor allem pulmonale, ossäre und kutane Läsionen. Durch Beteiligung der Hypophyse kann es auch zu endokrinologischen Störungen wie Diabetes insipidus kommen. Entsprechend der Variabilität der Erkrankung gibt es verschiedene Therapieansätze, die von wait-and-see über immunsuppressive Therapie bis hin zur Knochenmarkstransplantation reichen.

### 1.3.3. Overtrainingsyndrom (OTS)

Als Overtrainingsyndrom wird ein Zustand bezeichnet, in dem sich die Leistung eines Athleten trotz exzessiven Trainings verschlechtert. Begleitend kommt es zu einer Reihe physiologischer, psychologischer und immunologischer Auffälligkeiten. Zu den Symptomen zählen vor allem Fatigue, Depression, Konzentrationsschwierigkeiten, Schlaf-

und Appetitstörungen, Agitation, Veränderungen der Herz- und Atemfrequenz, Lymphknotenschwellungen, Arthralgien und Myalgien. Im Blutbild findet man z.B. erniedrigte Eisen- und Ferritinwerte sowie erniedrigtes Hämoglobin, zudem erhöhte Harnsäurekonzentration und Cortisolspiegel. Lymphopenie, verringerte NK-Zellfunktion und eine Schwächung der mukosalen Abwehr führen zu erhöhter Infektanfälligkeit [65, 129]. Bis dato konnte dem OTS keine eindeutige Ätiologie zugeschrieben werden [110]. Man geht jedoch davon aus, dass es durch Maladaptation des Organismus an außerordentlichen Stress entsteht. Durch intensives Training ohne ausreichende Regenerationsphase kommt es zu wiederholten Mikrotraumata im Bewegungsapparat, die zu lokalen Inflammationsreaktionen und Zytokinausschüttung führen [169, 185]. Dadurch werden zirkulierende Monozyten aktiviert und setzen selbst proinflammatorische Zytokine wie IL-1β, IL-6 und TNFα frei. Dies führt schließlich zu einer chronischen systemischen Entzündungsreaktion, die verschiedene psychische, neuroendokrine und immunologische Symptome zur Folge hat [110, 135, 186].

### 1.3.4. SIRS/Sepsis

Das systemic inflammatory response syndrome (SIRS) bezeichnet eine systemische Entzündungsreaktion des Körpers, die sowohl nicht-infektiösen als auch infektiösen Ursprungs sein kann. Im letzteren Fall spricht man von einer Sepsis. Die Definitionen der verschiedenen Schweregrade sind in Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1: Sepsisdefinitionen der ACCP/SCCM Konsensuskonferenzen von 1991 bzw. 2001 [1, 119]. SIRS: systemic inflammatory response syndrome, MODS: multi organ dysfunction syndrome, PaCO2: arterieller Kohlendioxidpartialdruck

| | |
|---|---|
| **SIRS** | Hypo-oder Hyperthermie (<36°C oder >38°C) |
| | Tachykardie (>90/min) |
| | Tachypnoe (>20/min) und/oder PaCO2 <4,3 kPa(33mmHg) und/oder maschinelle Beatmung |
| | Leukozytose >12.000/µl oder Leukopenie <4.000/µl und/oder Linksverschiebung >10% im Differentialblutbild |
| **Sepsis** | SIRS und Infektion (klinisch oder mikrobiologisch nachgewiesen) |
| **Schwere Sepsis** | Sepsis mit infektionsbezogener Organdysfunktion |

*Fortsetzung auf der nächsten Seite*

| | |
|---|---|
| **Septischer Schock** | Sepsis-induzierte Hypotonie trotz adäquatem Volumenstatus |
| **MODS** | Multiorganversagen |

Die zentrale Aufgabe von Monozyten/Makrophagen bei Sepsis besteht hierbei in der Erkennung von Pathogenen, deren Aufnahme und Präsentation an andere Immunzellen und schließlich ihrer Elimination. Spezielle Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRR) des angeborenen Immunsystems wie beispielsweise CD14 oder Toll-like-Rezeptoren (TLR), erkennen bestimmte, evolutionär konservierte Muster von Pathogenen, die als pathogen-associated molecular pattern (PAMP) bezeichnet werden. Die Bindung dieser Moleküle führt zu Signalkaskaden, die eine vermehrte Genexpression diverser Mediatoren bewirken [5, 97]. Die initiale Reaktion des Immunsystems auf Pathogene besteht aus einer Ausschüttung proinflammatorischer Botenstoffe. Zu diesen zählen Zytokine wie IL-1β, IL-6 und TNFα, Chemokine, Leukotriene und Adhäsionsmoleküle [34]. Je nach Schwere der Infektion breitet sich diese anfangs lokale Reaktion systemisch aus und es kommt zum SIRS. Dem steht die antiinflammatorische Antwort des compensatory antiinflammatory response syndrome (CARS) entgegen, das durch inhibitorische Mediatoren wie IL-10, TGF-β, PGE2 und Inhibitoren der PRR-Kaskade gekennzeichnet ist [25]. Diese Gegenregulation kann auf die anfängliche Hyperinflammation folgen oder überlappend auftreten. Ist sie zu stark, kann es zu einer Anergie der Immunzellen und Immunsuppression kommen, die für weitere Infektionen und einen schlechten Verlauf prädisponiert. Doch auch eine Hyperinflammation mit dauerhafter Aktivierung der Inflammationskaskade kann bedrohliche Folgen wie beispielsweise eine pathologische Aktivierung des Gerinnungssystems haben. Somit hängt die Immunrekonstitution vom Gleichgewicht dieser Mechanismen ab und macht die individuelle Therapie der Sepsis schwierig.

### 1.3.5. Polytrauma

Eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems kann auch ohne pathogenen Erreger geschehen, wenn es durch Gewebeschaden z.B. durch Ischämie oder Nekrosen nach Verletzung zur Freisetzung sogenannter „danger“- bzw. „damage“-Signale kommt. In Analogie zu den PAMPS bei Infektionen spricht man bei der Entstehung des „sterilen“ SIRS von DAMPS- danger- bzw. damage-associated molecular patterns [134,

162]. Zu diesen zählen Moleküle, die sich normalerweise intrazellulär befinden und durch Zellschaden freigelegt werden, wie beispielsweise Hitzeschockproteine (HSP), Matrixkomponenten, hydrophobe Moleküle, extrazelluläres Hämoglobin, Nucleotide und Abbauprodukte von Hyaluron, die bei Beschädigung von Gefäßen entstehen; zudem die Zytokine TNF-α, IL-1β und IFN-γ [23, 74]. Durch Bindung dieser Moleküle an APC werden Signalkaskaden in Gang gesetzt, die die Freisetzung von Entzündungsmediatoren bewirken. Zudem kommt es durch verletzungsbedingte Aktivierung neuroendokriner Systeme, Störungen in der Mikrozirkulation und metabolische Veränderungen zu einer weiteren Beeinflussung des Immunstatus [105]. Durch überschießende Produktion proinflammatorischer Mediatoren kann sich auch in diesem Fall ein SIRS und/oder CARS entwickeln [25]. Zusätzlich zur primären Gewebeschädigung durch das Trauma kann durch endogene und exogene Faktoren ein zweites Trauma entstehen (second hit), das möglicherweise entscheidend für den post-traumatischen Verlauf mit eventueller Entwicklung eines MODS ist. Zu den endogenen Faktoren gehören beispielsweise Zirkulationsstörungen und Hypoxie, Ischämie-Reperfusionsschäden, metabolische Azidose und Infektionen. Operationen und Bluttransfusionen zählen zu den exogenen „second hits“ [53]. Versagen die Schutzmechanismen des Körpers angesichts der Schwere der primären und sekundären Verletzungen und besteht ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischer Reaktion, kann es zu irreversiblen Organschäden kommen [1]. Störungen der Mikrozirkulation, Endothelschäden, Hypoxie und Untergang von Parenchymzellen durch Apoptose oder Nekrose können zu Organdysfunktion und schließlich multiplem Organversagen führen [89, 204].

## 1.4. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit geht es um die Evaluierung monozytärer Oberflächenexpressionsmuster bei Krankheitsbildern, die zwar klinisch unterschiedlich sind, jedoch möglicherweise gemeinsame immunologische Wegstrecken aufweisen. Dazu wurde die Expression von CD-Markern, die selektiv für einen bestimmten Immunstatus sind, auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den oben genannten Patientengruppen untersucht. Ziel war es, weitere Erkenntnisse über die pathophysiologische Rolle von Monozyten zu gewinnen und immunologische Parallelen der untersuchten Krankheitsbilder aufzudecken, wobei sich ein besonderer Schwerpunkt der Arbeit der Funktion der Monozyten beim Polytrauma widmet.

1. Wie unterscheiden sich die Expressionsmuster der verschiedenen Patientengruppen von denen der gesunden Versuchspersonen?

2. Sind die einzelnen Gruppen in ihrem CD-Markerprofil homogen oder unterscheiden sich die Patienten auch innerhalb einer Gruppe voneinander?

3. Welche Auffälligkeiten ergeben sich im posttraumatischen Verlauf?

4. Wie unterscheidet sich der Immunstatus von Polytraumapatienten von anderen inflammatorischen Zuständen wie Sepsis und HLH?

5. Wie unterscheiden sich die Patienten mit OTS von ihrer gesunden Referenzgruppe, den Leistungssportlern?

# 2. Material und Methoden

## 2.1. Patientenkollektiv

Für diese Arbeit wurden Blutproben von 55 Patienten untersucht, die der Abteilung Experimentelle Anästhesie des Universitätsklinikums Ulm zwischen 2010 und 2011 von verschiedenen externen Kliniken zugesandt wurden bzw. im Falle der Sepsis- und Traumapatienten direkt in der Sektion Anästhesiologische Intensivmedizin abgenommen wurden. Als Kontrollgruppe dienten 15 gesunde Probanden.

### 2.1.1. HLH

In dieser Gruppe wurden 17 Patienten untersucht. Davon waren elf männlich, sechs weiblich. Die Diagnose wurde klinisch gestellt und anhand eines typischen Zytokin- und CD-Expressionsmusters verifiziert.

Tabelle 2: Patienten der Gruppe HLH. Pat#: Patientennummer, Probe#: Probennummer, G: Geschlecht, Diag.: Diagnose Th.: Therapie, CLL: Chronisch Lymphatische Leukämie, ALCL: Anaplastisches Großzelllymphom, SZT: Stammzelltransplantation, EBV: Epstein-Barr-Virus, Z.n.: Zustand nach

| Pat# | Probe# | G | Alter | Diag | Th | Nebendiagnosen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 12159 | m | 8 | HLH | ja | |
| 2 | 12162 | w | 49 | HLH | n.b. | CLL |
| 3 | 12337 | m | 1 | HLH | ja | Sepsis |
| 4 | 12359 | m | 1 | HLH | ja | |
| 5 | 12386 | w | 14 | HLH | nein | ALCL, Z.n. allogener SZT |
| 6 | 12392 | w | 6 | HLH | ja | |
| 7 | 12407 | m | 3 | HLH | n.b. | Griscelli Syndrom |
| 8 | 12466 | m | 72 | HLH | ja | |
| 9 | 12475 | m | 7 | HLH | ja | |
| 10 | 12485 | m | 3 | HLH | ja | |
| 11 | 12486 | m | 8 | HLH | ja | |
| 12 | 12487 | w | 1 | HLH | nein | |
| 13 | 12498 | m | 72 | HLH | ja | |
| 14 | 12526 | m | 15 | HLH | ja | Griscelli Syndrom nach SZT |
| 15 | 12539 | w | 3 | HLH | ja | |
| 16 | 12594 | m | 35 | HLH | nein | LCH |
| 17 | 12663 | w | 16 | HLH | nein | EBV |

### 2.1.2. LCH

Bis auf die Patienten 7 und 12 waren alle Patienten in der Klinik für Innere Medizin der Evangelischen Kliniken Gelsenkirchen in Behandlung. Von den 13 Patienten waren neun Frauen und vier Männer, sie befanden sich in unterschiedlichen Stadien der Krankheit und

waren zum Teil immunsuppressiv vorbehandelt. Drei Patienten standen zum Zeitpunkt der Probenentnahme unter immunsuppressiver Therapie.

Tabelle 3: Patienten der Gruppe LCH. Pat#: Patientennummer, Probe#: Probennummer, G: Geschlecht, Diag.: Diagnose, IS-Th: Immunsuppressive Therapie, PE: Probenentnahme, ZNS: Zentrales Nervensystem, n.b.: nicht bekannt

| Pat# | Probe# | G | Alter | betroffene Organsysteme | IS.Th. | bei |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 12164 | w | 46 | fokaler Knochenbefall | nein | nein |
| 2 | 12446 | m | 31 | Skelett, ZNS | ja | ja |
| 3 | 12453 | w | 18 | Skelett | ja | ja |
| 4 | 12484 | w | 31 | Skelett, ZNS | ja | nein |
| 5 | 12490 | w | 43 | Skelett, Lunge | ja | nein |
| 6 | 12496 | w | 22 | Skelett, ZNS, Lunge | ja | nein |
| 7 | 12529 | m | 36 | n.b. | n.b. | |
| 8 | 12536 | w | 43 | Lunge | ja | ja |
| 9 | 12549 | w | 56 | Skelett, ZNS, Lunge, Haut | ja | nein |
| 10 | 12586 | w | 56 | Skelett multifokal, Colon | nein | nein |
| 11 | 12599 | m | 50 | Skelett multifokal, Lunge | nein | nein |
| 12 | 12661 | w | 41 | n.b. | n.b. | |
| 13 | 12662 | m | 22 | Skelett multifokal, ZNS, Lunge, Haut | ja | nein |

### 2.1.3. OTS

Bei den neun Patienten mit OTS handelte es sich um acht Männer und eine Frau. Die Blutproben wurden von der Abteilung Sportmedizin des Universitätsklinikums Ulm eingesandt. Alle Patienten betrieben bis zum Auftreten des OTS eine Form von Ausdauersport.

Tabelle 4: Patienten der Gruppe OTS. Pat#: Patientennummer, Probe#: Probennummer, G: Geschlecht, Diag.: Diagnose, AH: Arterielle Hypertonie, DM: Diabetes mellitus, EBV:Epstein-Barr-Virus, Z.n.:Zustand nach, n.b.: nicht bekannt

| Pat# | Probe# | G | Alter | Diag. | Nebendiagnosen |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 12160 | m | 15 | OTS | Pollinosis |
| 2 | 12241 | m | 44 | OTS | Pollinosis, Hypercholesterinämie |
| 3 | 12285 | m | 22 | OTS | Morbus Scheuermann |
| 4 | 12286 | m | 32 | OTS | n.b. |
| 5 | 12308 | m | 62 | OTS | DM Typ 1, Asthma bronchiale, AH, Hypercholesterinämie, Hypothyreose, Testosteronmangel |
| 6 | 12334 | m | 15 | OTS | EBV-Reaktivierung |
| 7 | 12532 | m | 22 | V.a. OTS | exercise-induced-asthma, Z.n. Tonsillektomie |
| 8 | 12534 | w | 24 | OTS | mikrozytäre Anämie |
| 9 | 12659 | m | 28 | OTS | Familiäre Erythrozytose |

### 2.1.4. Sepsis

Die acht Patienten (m=3, w=5) dieser Gruppe befanden sich mit der Diagnose Sepsis auf der Anästhesiologischen Intensivstation des Universitätsklinikums Ulm.

Tabelle 5: Patienten der Gruppe Sepsis. Pat#: Patientennummer, Probe#: Probennummer, G: Geschlecht, Diag: Diagnose

| Pat# | Probe# | G | Alter | Diag. |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 10990 | m | 68 | Septischer Schock |
| 2 | 11553 | w | 73 | Septischer Schock |
| 3 | 12326 | w | 63 | Septischer Schock |
| 4 | 12357 | m | 44 | Schwere Sepsis |
| 5 | 12360 | w | 30 | Septischer Schock |
| 6 | 12493 | w | 45 | Septischer Schock |
| 7 | 12471 | w | 50 | Septischer Schock |
| 8 | 11555 | m | 47 | Septischer Schock |

### 2.1.5. Polytrauma

Alle acht Patienten dieser Gruppe befanden sich auf der Anästhesiologischen Intensivstation des Universitätsklinikums Ulm. Zu sieben Zeitpunkten wurden Blutproben entnommen und zur Weiterverarbeitung an die Abteilung Experimentelle Anästhesie übergeben. Der erste Abnahmezeitpunkt war bei Einlieferung („null Stunden“), danach wurde zu den Zeitpunkten vier, zwölf, 24, 48, 120 und 240 Stunden nach Trauma untersucht. Die Unfallart war bei vier Patienten ein Sturz (Pat. 3,4,6,7), bei zwei Patienten ein Verkehrsunfall als Fußgänger (Pat. 5,8), bei einem Patienten ein Verkehrsunfall als Motorradfahrer (Pat. 2), ein Patient (Pat. 1) wurde von einem Bullen an eine Wand gedrückt. Alle Patienten wurden unmittelbar nach der Einlieferung und/oder im weiteren Verlauf operiert. Ein Patient (Pat. 7) verstarb an Tag zehn nach Trauma.

Tabelle 6: Patienten der Gruppe Polytrauma. Pat#: Patientennummer, G: Geschlecht, BWS: Brustwirbelsäule, HWS: Halswirbelsäule, LWS: Lendenwirbelsäule, SHT: Schädel-Hirn-Trauma, SAB: Subarachnoidalblutung

| Pat# | G | Alter | Verletzungsmuster |
|---|---|---|---|
| 1 | m | 25 | Thoraxtrauma, Abdominaltrauma mit Milz-,Leber-, Magenruptur |
| 2 | m | 34 | HWS-und BWS-Fraktur mit Querschnittsymptomatik, Beckenfraktur, Scapulafraktur |
| 3 | m | 45 | SHT mit Kalottenfraktur und SAB, Fraktur BWS/LWS,Claviculafraktur,Scapulafraktur |
| 4 | m | 70 | SHT mit SAB, Thoraxtrauma mit Rippenserienfraktur |
| 5 | w | 73 | SHT mit SAB, Thoraxtrauma mit Rippenserienfraktur, mehrfache Röhrenknochenfrakturen |

*Fortsetzung auf der nächsten Seite*

| | | | |
|---|---|---|---|
| 6 | m | 48 | SHT, Thoraxtrauma mit Lungenkontusion, Beckenringfraktur, LWK5 Fraktur |
| 7 | m | 81 | SHT mit cerebraler Kontusionsblutung, Kalottenfraktur, Thoraxtrauma mit Rippenserienfraktur und Hämatothorax |
| 8 | m | 76 | Beckenringfraktur, mehrfache Röhrenknochenfrakturen |

Um die Patienten vorab nach den Aspekten Schweregrad des Traumas, Organfunktion und Infektion zu sortieren wurden klinische Scoring-Systeme angewandt:

Der Injury Severity Score (ISS) beschreibt das Ausmaß eines Polytraumas. Der Berechnung liegt die anatomische Einteilung von Verletzung nach der AIS (Abbreviated Injury Scale) zugrunde. Es erfolgt eine Einteilung in sechs Körperregionen, wobei jeder Einzelverletzung ein Schweregrad zwischen eins und sechs zugeteilt wird [75]. Der ISS ergibt sich aus der Summe der Quadrate der höchsten AIS-Werte der drei am schwersten verletzten Körperregionen [17, 40]. Der Simplified Acute Physiology Score (SAPS) 3 ist ein intensivmedizinischer Score zur Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung bei Aufnahme und zur Prognoseabschätzung [144]. In die Voraussage fließen Parameter wie Vorerkrankungen, bereits bestehende Infektionen oder Art und Umfang der Operation mit ein. Der SAPS 3 Score ist eigentlich nicht als Verlaufsscore validiert, in diesem Fall wurden die Werte jedoch als Ergänzung zum SOFA (Sequential Organ Failure Assessment)- Score betrachtet, um einen Eindruck vom klinischen Zustand des Patienten zu erhalten. Der SOFA-Score beschreibt das Ausmaß der Beeinträchtigung einzelner Organsysteme (Atmung, Gerinnung, Leberfunktion, Kardiovaskuläres System, Nierenfunktion, ZNS) bzw. die Organfunktion im Allgemeinen und eignet sich zur Erfassung klinischer Veränderungen bei intensivpflichtigen Patienten [12, 210]. Neben dem Ausmaß der Organdysfunktion wird der Verlauf durch das Vorhandensein von Infektionen beeinflusst. Die Einteilung der Traumapatienten in Sepsis- bzw. SIRS- Stadien erfolgte entsprechend der SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS Sepsisdefinition von 2001 [119], die neben den Kriterien von 1992 [26] weitere physiologische Variablen wie die Dysfunktion einzelner Organsysteme, hämodynamische Parameter und Gewebeoxygenierung berücksichtigt.

### 2.1.6. Kontrollgruppen

Es wurden zwei Kontrollgruppen gebildet. Zum einen wurde Blut von sieben Normalspendern untersucht, zum anderen acht Leistungssportler, die als adäquate Kontrollgruppe für die OTS-Patienten dienen sollten. Die Leistungssportler waren

Mitglieder einer professionellen Rudermannschaft und wurden nach Besuch eines Trainingslagers untersucht.

Tabelle 7: Gesunde Probanden. Probe#: Probennummer

| Probe# | G | Alter | Gruppe |
|---|---|---|---|
| 12332 | w | 24 | gesund |
| 12342 | m | 25 | gesund |
| 12347 | w | 22 | gesund |
| 12376 | w | 55 | gesund |
| 12414 | w | 22 | gesund |
| 12415 | w | 22 | gesund |
| 12470 | m | 21 | gesund |
| 12540 | m | 16 | Leistungssport |
| 12541 | w | 18 | Leistungssport |
| 12542 | w | 19 | Leistungssport |
| 12543 | m | 16 | Leistungssport |
| 12544 | w | 18 | Leistungssport |
| 12545 | m | 16 | Leistungssport |
| 12546 | m | 19 | Leistungssport |
| 12547 | m | 19 | Leistungssport |

## 2.2. Materialien

Folgende Materialien und Geräte wurden für die Verarbeitung und Untersuchung des Probenmaterials verwendet:

- EDTA-Monovetten (66x11mm; 2,7ml; 1,6mg EDTA/ml Blut; Sarstedt/Nümbrecht)
- Reagenzglas polystyrene round bottom tube (12x75mm, BD Biosciences/Heidelberg)
- fetales Kälberserum
- monoklonale Antikörper:

Tabelle 8: Verwendete Antikörper. Ig: Immunglobulin, PE: Phycoerythrin, FITC:Fluoreszein-Isothiocyanat

| Antikörper | Konjugiertes Fluoreszenzmolekül | Isotyp | Klon | Hersteller |
|---|---|---|---|---|
| CD4 | FITC | IgG1 | RPA-T4 | BD Bioscience/Heidelberg |
| CD11b | PE | IgG1 | M1/70 | eBioscience/Frankfurt |
| CD14 | PE | IgG2a | MϕP9 | BD Bioscience/Heidelberg |
| CD16 | FITC | IgG2a | B-E16 | BD Bioscience/Heidelberg |
| CD45 | FITC | IgG1 | 2D1 | BD Bioscience/Heidelberg |
| CD64 | FITC | IgG1 | 22 | BeckmanCoulter/Krefeld |
| CD95 | PE | IgG1 | DX2 | BD Bioscience/Heidelberg |

*Fortsetzung auf der nächsten Seite*

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| CD163 | FITC | IgG1 | 5C6-FAT | Acris GmbH/Herford |
| Anti-HLA-DR | FITC | IgG2a | L243 | BD Bioscience/Heidelberg |
| Isotyp | FITC | Mouse IgG1 | X40 | BD Bioscience/Heidelberg |
| Isotyp | PE | Mouse IgG2a | X39 | BD Bioscience/Heidelberg |

- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries/New York, USA)
- GS-6R-Zentrifuge (Beckman Coulter/Krefeld)
- FACS Lysing Solution (Konzentration 1:10; BD Biosciences/Heidelberg)
- Isotonische, Phosphat-gepufferte Salzlösung: GIBCO DPBS (Life Technologies/ Darmstadt)
- CellFIX (Konzentration 1:10 mit dest. H2O; BD Biosciences/Heidelberg)
- Durchflusszytometer FACS-Calibur (BD Biosciences/Heidelberg)

## 2.3. Probenaufbereitung

Die Blutproben wurden bis zur Weiterverarbeitung in EDTA-Röhrchen bei Kühlschranktemperaturen gelagert. Das Plasma wurde entfernt und durch Kälberserum ersetzt. Dann wurden je 70µl Blut in beschriftete, auf Eis gestellte Reagenzgläser pipettiert und mit je 30µl eines mit FITC (Fluoreszein-Isothiocyanat) bzw. PE (Phycoerythrin) markierten, monoklonalen Antikörpers versetzt und die Probenansätze durchmischt. Nach 25-minütiger Inkubationszeit auf Eis und unter Lichtausschluss wurde die lysing solution hinzugegeben um Erythrozyten zu depletieren. Nach zehn Minuten wurden die Proben fünf Minuten bei 980 rpm (rounds per minute) zentrifugiert, der Überstand abgegossen und DPBS-Waschlösung hinzugegeben. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt und der Probenansatz zum Schluss durch Zugabe von 50µl CellFIX pro Röhrchen fixiert.

## 2.4. Durchflusszytometrie

### 2.4.1. Theoretische Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Typisierung von Zellen anhand ihrer Größe, intrazellulären Struktur und der Bindung farbstoffmarkierter Antikörper, das auf der Emission von optischen Signalen nach Auftreffen eines Laserstrahls auf die Zelle basiert. Die in Suspension vorliegenden Zellen werden über eine Kapillare einem kontinuierlichen Strom von Trägerflüssigkeit zugeführt. In diesem Strom passieren die Zellen im Anschluss einzeln den Laserstrahl. Anhand der Ablenkung des Laserstrahls durch die Morphologie der Zelle kann zwischen unterschiedlichen Zelltypen differenziert werden. Ein Detektor (s. Abb. 1) misst das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC), das ein Maß für die Beugung

des Lichts im flachen Winkel ist und mit der Zellgröße korreliert, und das Seitwärtsstreulicht (sideward scatter, SSC), das der Brechung des Lichts im rechten Winkel entspricht und von der Granularität der Zelle abhängt. Dementsprechend befinden sich in der graphischen Darstellung große, granulierte Zellen im rechten oberen Quadranten, kleine Zellen mit homogener Struktur im linken unteren (s. Abb. 2a). Detaillierte Untersuchungen der Zelleigenschaften sind durch die Verwendung fluoreszierender, antikörpergekoppelter Farbstoffe möglich. Der Laser regt die Elektronen der Fluoreszenzmoleküle an, wodurch sie auf ein höheres Energieniveau gehoben werden und bei Rückfall auf das alte Niveau Photonen emittieren (Fluoreszenz). Das Signal des Fluoreszenzlichts wird von Photomultipliern detektiert, verstärkt und schließlich als elektrische Information weitergegeben [96, 171].

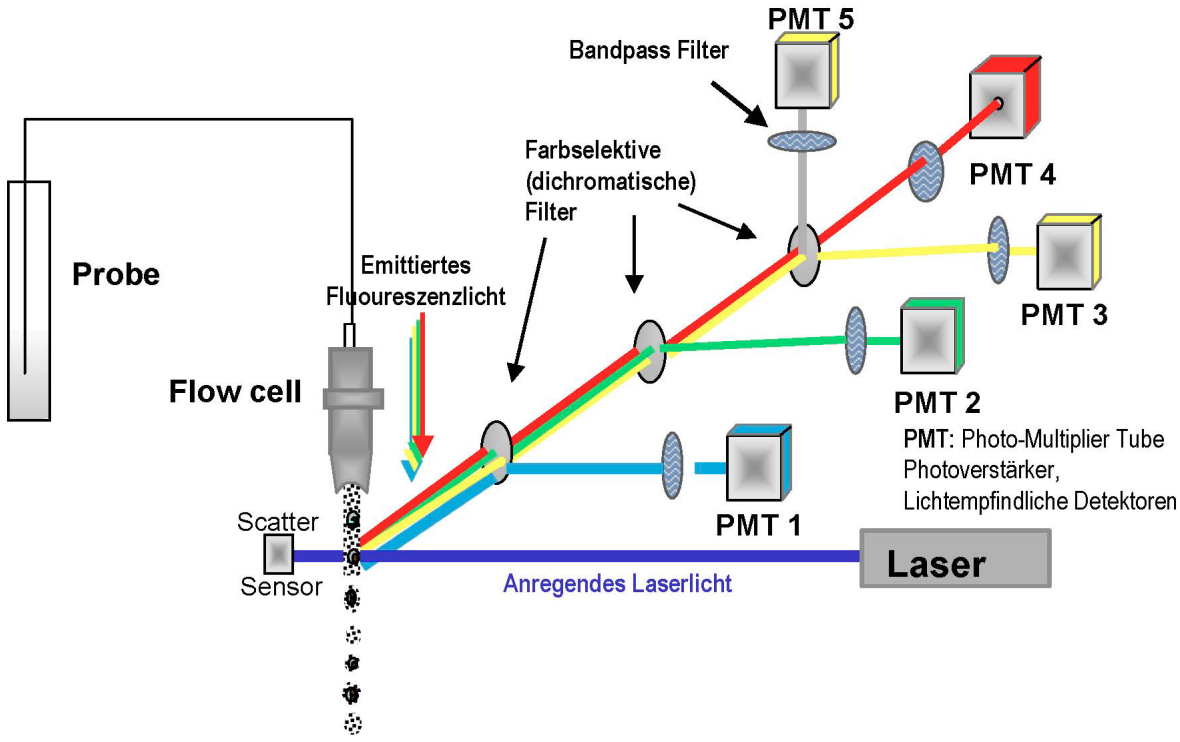


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers. Aus: Durchflusszytometrie Grundlagen, Institut für Medizinische Immunologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 2010 [96]

### 2.4.2. Prinzip der Datenauswertung

Zur Datenerhebung und -auswertung wurde die Software CellQuest Pro® verwendet. Die einzelnen Zellen werden als Punkt im Punktwolkendiagramm (dotplot) entsprechend der FSC-(x-Achse) und SSC-(y-Achse) Signalintensität dargestellt. Durch Einzeichnen einer Region im Dotplot-Diagramm (gating) werden die verschiedenen Zellpopulationen anhand typischer Lichtstreuungseigenschaften definiert (Abb. 2a). Die einer Region zugehörigen

Zellen, z.B. Monozyten, werden in gesonderten Dotplots mit Auftragung der Fluoreszenzen dargestellt (Abb. 2b), um so Informationen über die Antikörperbindung der Zellen zu erhalten. Nach Messen des Isotyp-Ansatzes als Negativkontrolle wurden im sogenannten Leukogate die CD45-positiven Zellen dargestellt und eine Akquisitions-Schwelle gesetzt, um CD45-negative Thrombozyten oder tote Zellen auszuschließen; die Monozyten wurden auf Grundlage ihrer CD14-Expression definiert. Die Auswertung erfolgte unter zwei Gesichtspunkten: Zum einen wurde der prozentualen Anteil der für einen bestimmten CD-Marker positiven Zellen von allen Monozyten errechnet, zum anderen die Expressionsdichte der Oberflächenmoleküle. Diese wird als mean fluorescent intensity (MFI) gemessen und bezeichnet die Differenz der Fluoreszenzintensität von spezifischem Antikörper und Isotyp.

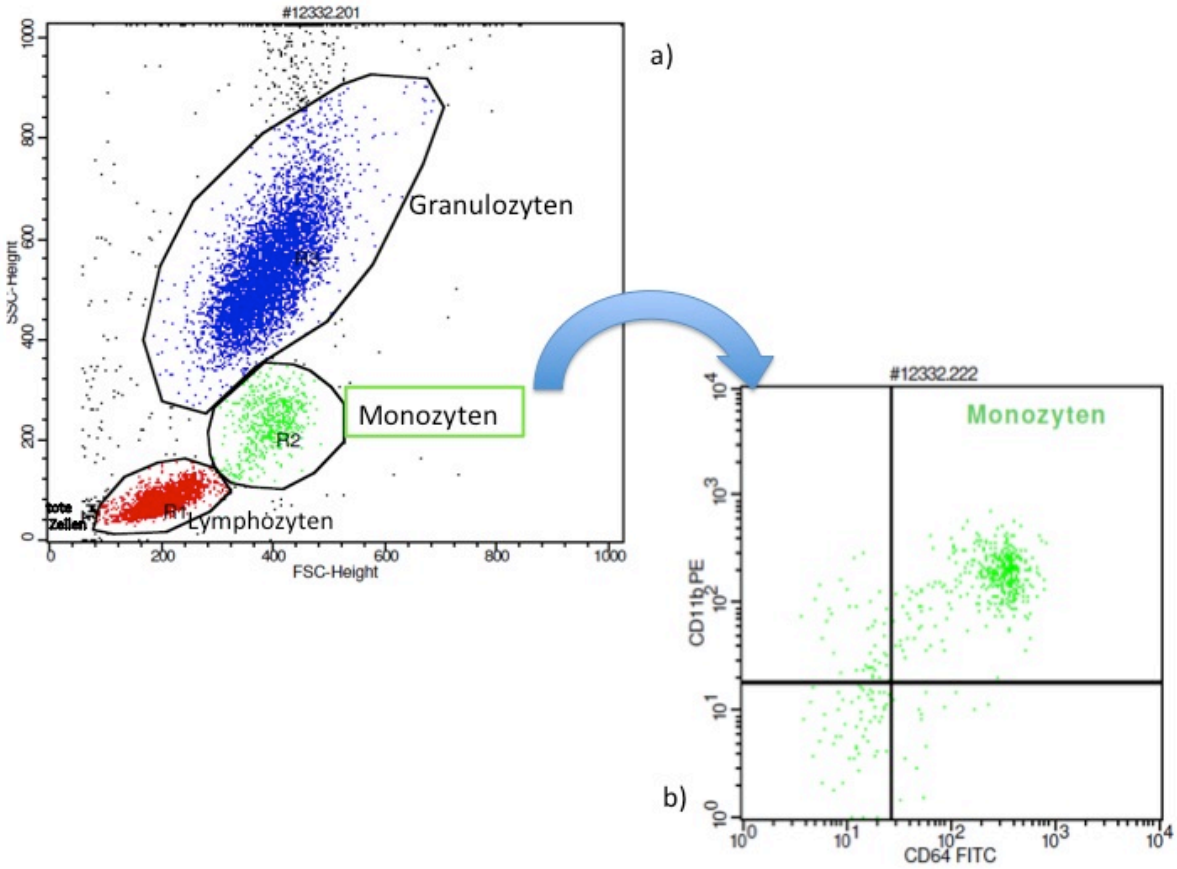


Abbildung 2: a) Beispiel eines scatter dotplot mit „gated regions of interest“. b) Nach Auswahl einer Zellpopulation (hier Region 2, Monozyten) können die einzelnen Zellen in einem zweiten dotplot anhand des Antikörper-Fluoreszenz-Signals weiter charakterisiert werden. SSC: Seitwärtsstreulicht, FSC: Vorwärtsstreulicht, R: Region, PE: Phycoerythrin, FITC:Fluoreszein-Isothiocyanat

## 2.5. Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden nach dem Prinzip der explorativen Datenanalyse untersucht. Zur Beschreibung qualitativer Daten wurden absolute und relative Häufigkeiten verwendet, quantitative Daten wurden durch Mittelwert und Standardabweichung sowie durch Median und Interquartilsabstand zusammengefasst. Die statistischen Tests haben in dieser Arbeit ausschließlich hypothesengenerierenden Charakter; eine Adjustierung von p-Werten für multiples Testen erfolgte nicht. Ein Test mit einem p-wert $p< 0,05$ wird als signifikant bezeichnet. Um die Robustheit der Resultate gegenüber Ausreißern abzuschätzen, wurden die meisten Tests nach Elimination von extremen Werten ein zweites Mal durchgeführt. Ein Ausreißer wurde dabei folgendermaßen definiert: Wert > q75 + 1,5*iqr bzw. Wert < q25-1,5*iqr (q25 bzw q75: erstes und drittes Quartil, iqr: Interquartilsabstand). Waren Vergleiche nur mit Ausreißern signifikant, wurden sie nicht zur Hypothesengenerierung herangezogen. Es wurden die folgenden Testverfahren benutzt:

### 2.5.1.Wilcoxon-Tests

Der Wilcoxon-Rangsummentest dient zur Überprüfung unabhängiger Stichproben und wurde für die Vergleiche der Patientengruppen untereinander und mit den Kontrollgruppen verwendet. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Polytrauma-Abnahmezeitpunkten wurden mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben berechnet. Bei beiden Testverfahren wurde, wenn möglich, mit der exakten Testverteilung gerechnet, um die Gültigkeit der Resultate auch für kleine Stichproben sicherzustellen.

### 2.5.2. Logistische Regression

Die ebenfalls auf der exakten Testverteilung basierende logistische Regressionsanalyse wurde bei allen Vergleichen, in denen der Stichprobenumfang in jeder Vergleichsgruppe mindestens = 8 war, zusätzlich angewendet. Das logistische Vorhersagemodell enthielt als abhängige Variable die Gruppenzugehörigkeit und als unabhängige Variable zusätzlich zum Messwert das Alter und das Geschlecht des Patienten, um zu kontrollieren, ob bei der starken Inhomogenität der Patienten eventuelle Gruppenunterschiede in der Oberflächenmarkerexpression womöglich auf Alter oder Geschlecht zurückzuführen seien. P-Werte aus der logistischen Regressionsanalyse werden nur dann erwähnt, wenn sie stark von denen des Wilcoxon-Tests abweichen, wobei die Werte aus der logistischen Regressionsanalyse im Ergebnisteil kursiv gedruckt sind.

Zur Berechnung der p-Werte wurde das Programm SAS 9.3 verwendet, zur graphischen Darstellung der Daten GraphPad Prism 5.

# 3. Ergebnisse

Die folgenden Tabellen 10 und 11 geben einen Überblick über die durchgeführten Vergleiche und deren Ergebnisse.

Tabelle 10: Übersicht über die durchgeführten Vergleiche und Ergebnisse der statistischen Tests für Prozent positive Zellen; ↓: Wert niedriger ↑: Wert höher, *p<0,05 **p<0,01***p<0,001, rot: Ergebnis der logistischen Regressionsanalyse, leere Felder bzw. ns: Unterschied nicht signifikant, HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma, LS: Leistungssportler

| **% gated** | CD4 | CD11b | CD16 | CD95 | HLA-DR | bezogen auf |
|---|---|---|---|---|---|---|
| HLH | ↓*** ** | | | | ↓* | Kontrolle |
| LCH | | | | ↓* ns | | Kontrolle |
| Sepsis | ↓*** | | | ↓** | ↓*** | Kontrolle |
| OTS | | | ↓* | | | Kontrolle |
| LS | | | | ↓** | | Kontrolle |
| PT0h | ↓* | | | | | Kontrolle |
| PT4h | ↓** | ↑** | | ↑* | | Kontrolle |
| PT12h | ↓*** | | | | | Kontrolle |
| PT24h | ↓*** | | | | ↓* | Kontrolle |
| PT48h | ↓** | | | | | Kontrolle |
| PT120h | ↓** | | | | | Kontrolle |
| PT240h | ↓** | | | | ↓* | Kontrolle |
| OTS | | | | ↑** | | LS |
| PT0h | | | | | | HLH |
| PT4h | | ↑*** | | | | HLH |
| PT12h | | ↑** | | | | HLH |
| PT24h | | ↑*** * | | | | HLH |
| PT48h | | ↑** | | | | HLH |
| PT120h | | ↑* | | | | HLH |
| PT240h | | | | | | HLH |
| PT0h | ↑*** | ↑* | | | ↑** | Sepsis |
| PT4h | ↑* | ↑** | | ↑** | | Sepsis |
| PT12h | | ↑** | | | ↑** | Sepsis |
| PT24h | | ↑** ns | | | ↑** | Sepsis |
| PT48h | | ↑* | | | ↑** | Sepsis |
| PT120h | | | | ↑* | | Sepsis |
| PT240h | | | | | | Sepsis |

Tabelle 11: Übersicht über die durchgeführten Vergleiche und Ergebnisse der statistischen Tests für die Expressionsdichte; Wert niedriger ↑: Wert höher, *p<0,05 **p<0,01***p<0,001, rot: Ergebnis der logistischen Regressionsanalyse, leere Felder bzw. ns: Unterschied nicht signifikant, HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma, LS: Leistungssportler, MFI: mean fluorescent intensity

| **MFI** | CD4 | CD11b | CD14 | CD16 | CD45 | CD64 | CD95 | CD163 | HLA-DR | bezogen auf |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HLH | | | ↓* | ↑*** | | ↑* ns | | | | Kontrolle |
| LCH | | | | | | | | | | Kontrolle |
| Sepsis | ↓** | | ↓* | | ↓* | ↓* | | | ↓*** | Kontrolle |
| OTS | | | | | | ↑*** | | | | Kontrolle |
| LS | | ↑*** | | | ↑** | ↑** | ↓* | | | Kontrolle |
| PT0h | | ↑* | | ↑* | | ↑* | | | | Kontrolle |
| PT4h | ↓** | ↑** | | ↑** | | ↑* | | | | Kontrolle |
| PT12h | ↓** | ↑** | | ↑** | | ↑* | | | | Kontrolle |
| PT24h | ↓** | ↑** | | ↑** | | ↑** | | | ↓* | Kontrolle |
| PT48h | ↓* | | | ↑*** | | ↑** | | | ↓* | Kontrolle |
| PT120h | ↓** | ↑** | | ↑** | | ↑** | | | ↓* | Kontrolle |
| PT240h | ↓** | | | ↑** | ↓* | ↑** | | | | Kontrolle |
| OTS | | ↓*** | | | | ↑*** | | | | LS |
| PT0h | | | ↑* | | | | | | | HLH |
| PT4h | | ↑*** | | | | | | | | HLH |
| PT12h | | ↑* ns | ↑* | | | | | | | HLH |
| PT24h | | ↑* ns | ↑* | | | | | | | HLH |
| PT48h | | | | | | | | | | HLH |
| PT120h | | | | | | | | | | HLH |
| PT240h | | | | | ↓** | | | | | HLH |
| PT0h | ↑* | | | | | ↑** | ↓* | | | Sepsis |
| PT4h | | ↑* | | ↑* | | ↑** | | ↓* | ↑** | Sepsis |
| PT12h | | ↑* ns | | | ↑* ns | ↑*** | | | ↑** | Sepsis |
| PT24h | | ↑* | | | ↑** ns | ↑*** | | | | Sepsis |
| PT48h | | | | ↑* | | ↑** | | ↓* | | Sepsis |
| PT120h | | | | | | ↑*** | | | | Sepsis |
| PT240h | | | | | | | | | | Sepsis |

## 3.1. Vergleich der Patientengruppen mit den gesunden Probanden

### 3.1.1.HLH vs. Kontrolle

#### 3.1.1.1. CD4 % gated

Der Median der CD4-Werte ist bei den HLH-Patienten mit 48% zwar deutlich geringer (p=0,00027 bzw. *p=0,0032*[1]) als in der Gruppe der Normalspender (Median= 87), es liegt jedoch einer breiten Streuung der Werte mit einem Minimum von 5% und einem Maximum von 85% vor. Einige Patienten liegen im Bereich der Normalspender, andere ähneln den Sepsis- und Polytraumapatienten (Abb. 3).

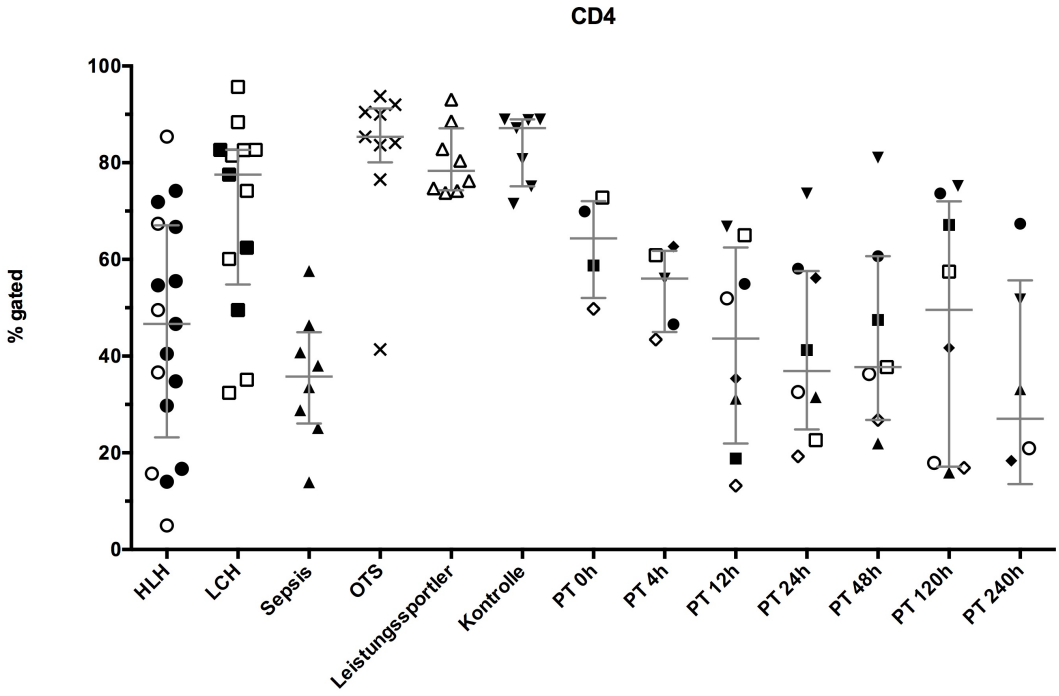


Abbildung 3 : CD4-Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: Prozentwert der CD4-exprimierenden Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

[1]kursiv: Ergebnis der logistischen Regressionsanalyse

### 3.1.1.2. CD14 MFI

Bei einer ungleichmäßigen Werteverteilungen zeigen die HLH-Patienten einen niedrigeren Median (29053 vs. 46349) (p=0,023) und eine Akkumulation im unteren Bereich (Abb. 4).

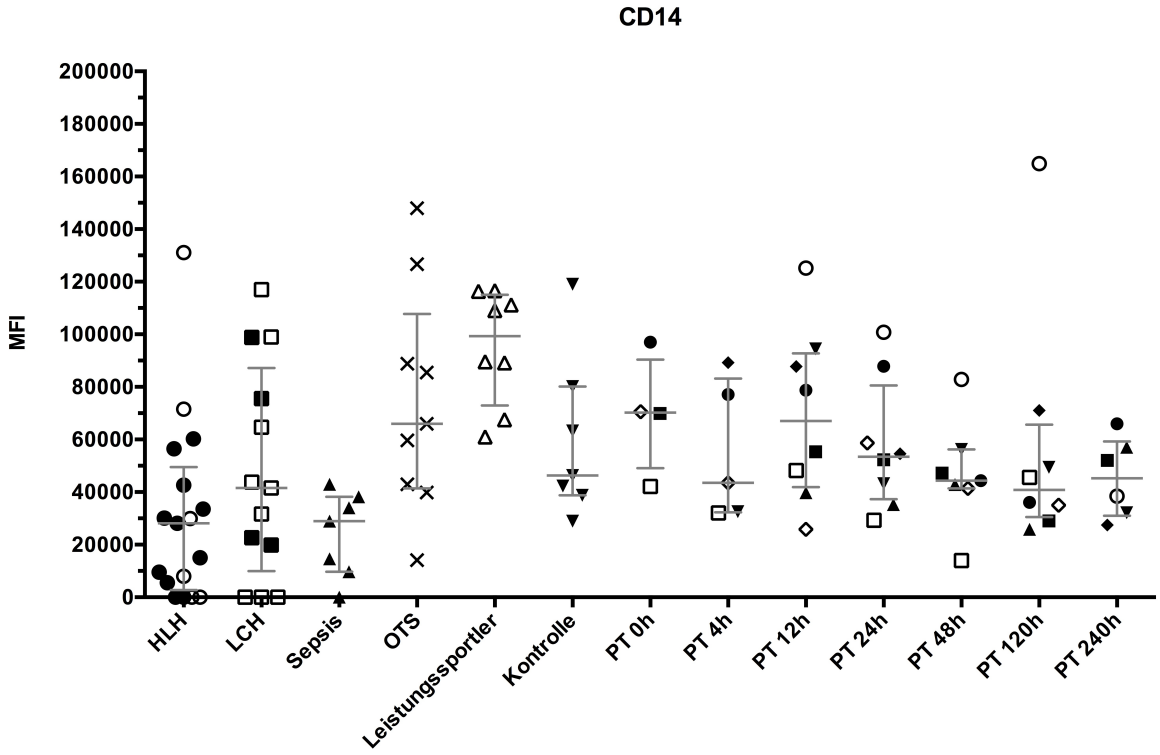


Abbildung 4 : CD14-Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: MFI: mean fluorescent intensity bzw. CD14-Expressionsdichte auf Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

### 3.1.1.3. CD16 MFI

Die Expressionsdichte von CD16 ist auf den Monozyten der HLH-Gruppe mit einem Median von 16437 um ein Vielfaches höher als in der Kontrollgruppe mit 1790. (p=0,00011 bzw. *0,0038* (Abb. 5)). Acht HLH-Patienten zeigen erhöhte Werte, die den Werten einer Population von LCH-Patienten ähneln (HLH-Patienten 1, 6, 3, 4, 12, 14, 16, 17).

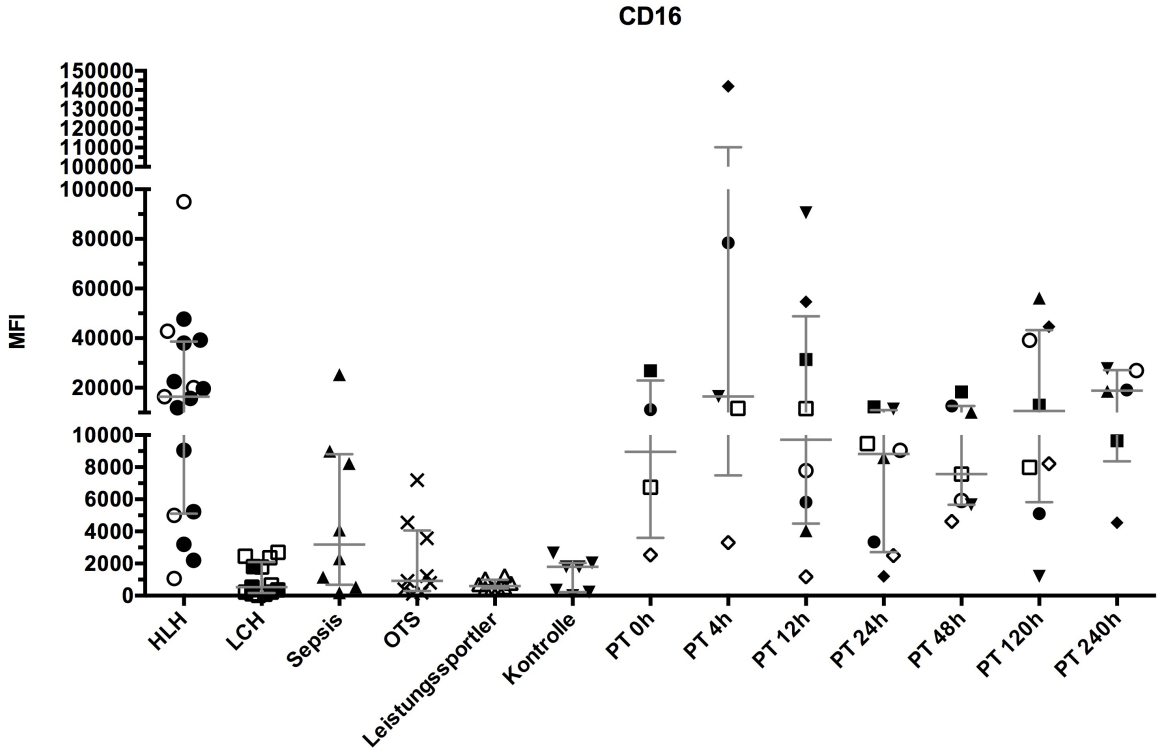


Abbildung 5 : CD16-Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: MFI: mean fluorescent intensity bzw. CD16-Expressionsdichte auf Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

### 3.1.1.4. CD64 MFI

Auch bei CD64 lässt sich ein höherer MFI-Wert bei den Patienten feststellen, in der logistischen Regressionsanalyse ist der Unterschied jedoch nicht signifikant. Es fallen vier Patienten auf, deren Werte deutlich über denen der restlichen Patienten liegen, bei zwei Patienten sind die Werte auffallend hoch (Abb. 6).

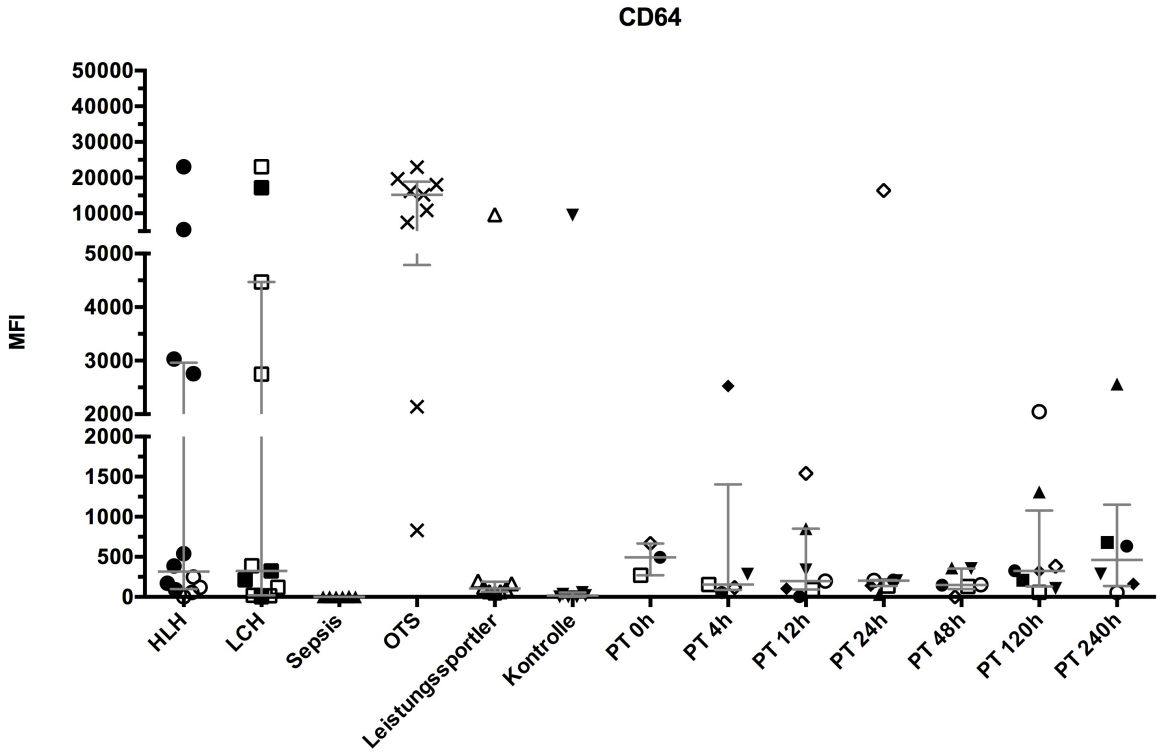


Abbildung 6: CD64-Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: MFI: mean fluorescent intensity bzw. CD64-Expressionsdichte auf Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

### 3.1.1.4. HLA-DR %

Die Werte der HLH-Patienten unterliegen einer breiten Streuung von 4 bis 95 Prozent, innerhalb der Werteverteilung lässt sich eine Akkumulation erkennen, die im Bereich derer der Normalspender liegt (Patienten 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12) und eine weitere bei niedrigeren Werten, die ähnlich den Sepsispatienten und einer Population von LCH-Patienten sind (Patienten 1, 2, 4, 6, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18 s. 1.1.2.) (Abb. 7).

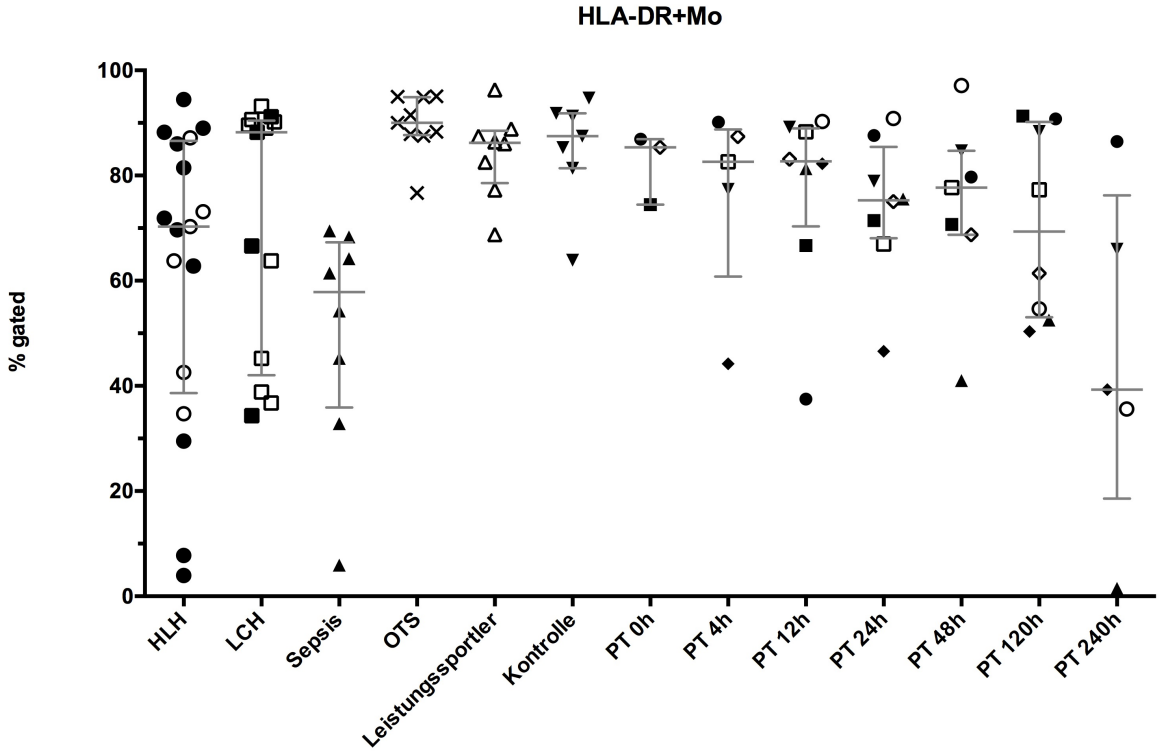


Abbildung 7: HLA-DR-Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: Prozentwert der HLA-DR-exprimierenden Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

### 3.1.2. LCH vs. Kontrolle

Im Vergleich der Gruppe LCH mit den Normalspendern fallen lediglich bei zwei Oberflächenmarkern in der Einheit %-gated signifikante Unterschiede auf. Diese sind jedoch in der logistischen Regressionsanalyse nicht signifikant. Der Anteil CD95-positiver Zellen ist bei den LCH-Patienten niedriger als in der Kontrollgruppe (Median 88 vs. 96, p=0,036) (Abb. 14). Abgesehen davon fällt bei mehreren Oberflächenmarkern eine Aufteilung in zwei Populationen auf, die sich jedoch bei keiner Beobachtung mit der Unterscheidung therapiert/nicht therapiert decken:

#### 3.1.2.1. CD4

Bei CD4 gibt es bei %-gated eine gesonderte Population von fünf Patienten, die in ihrem Expressionsmuster den Sepsispatienten gleichen. Dieselben Patienten finden sich auch bei Betrachtung der MFI in der niedrigen, den Sepsispatienten ähnlichen Population wieder (Abb. 3 und 8).

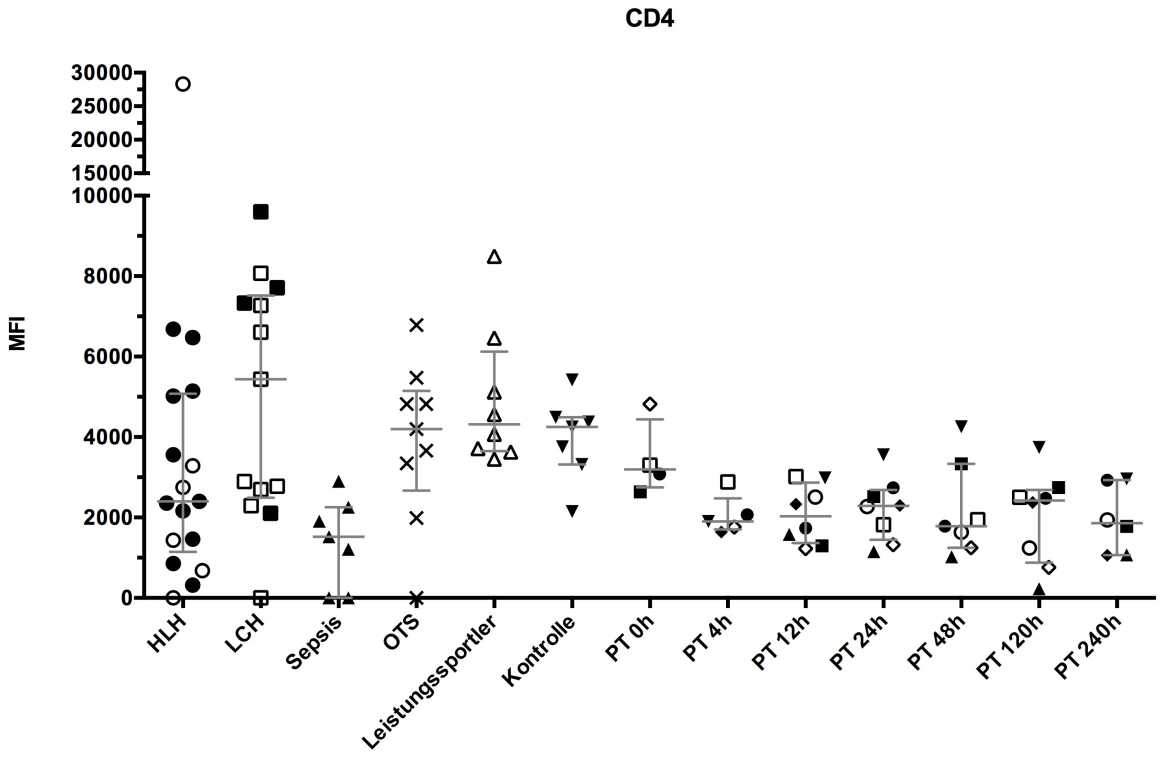


Abbildung 8: CD4-Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: MFI: mean fluorescent intensity bzw. CD4-Expressionsdichte auf Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

### 3.1.2.2. CD11b

Bei CD11b fällt in den %-gated-Werten auf, dass eine Hälfte der Patienten im Bereich der Normalspender liegt, die andere Hälfte weniger CD11b-positive Zellen aufweist und Werte ähnlich einer Population von HLH-Patienten zeigt (Abb. 9). Die Expressionsdichte von CD11b ist bei einer Hälfte der Patienten entsprechend derer der Normalspender, bei der anderen Hälfte liegt sie höher und im Bereich der Leistungssportler (Abb. 15). Nur zwei Patienten fallen bei beiden Betrachtungen auf (3, 8), ansonsten handelt es sich jeweils um andere Patienten.

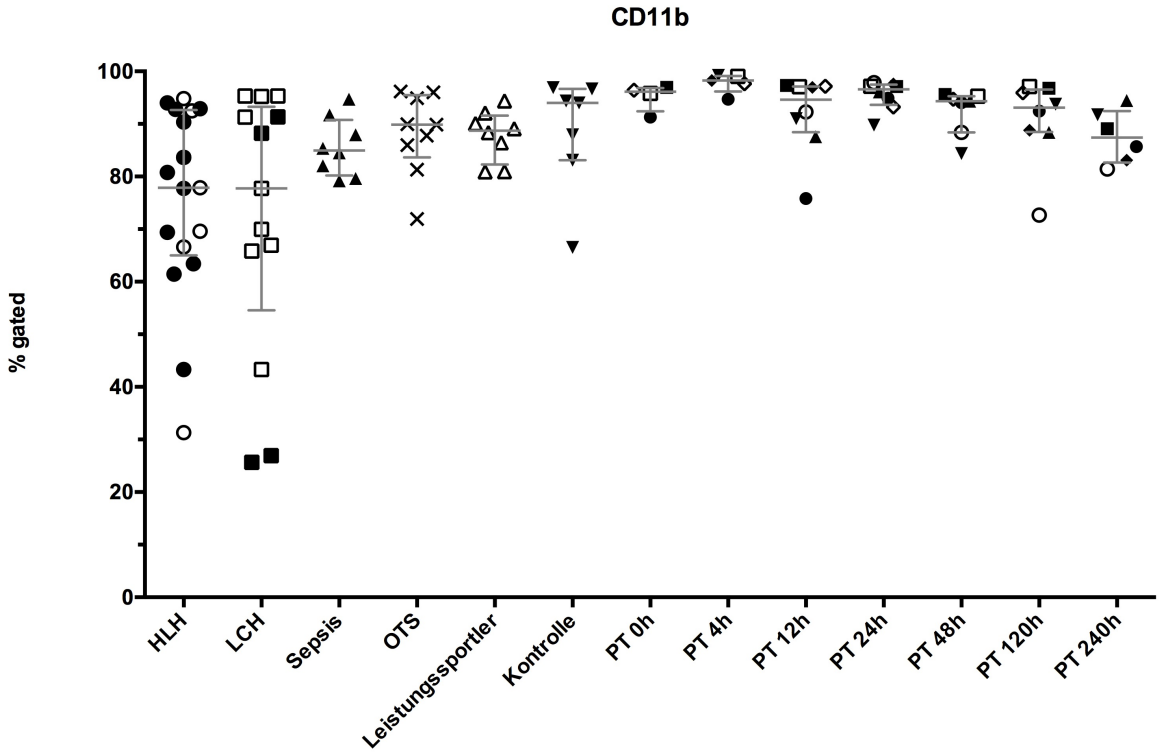


Abbildung 9: CD11b-Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: Prozentwert der CD11b-exprimierenden Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

### 3.1.2.3. CD45 MFI

Auch bei den CD45 MFI-Werten zeigt sich eine Aufteilung in zwei Populationen, von denen eine den Normalspendern ähnelt, die andere den Leistungssportlern (Abb. 10). Bis auf einen (8) handelt es sich jedoch auch hier nicht um die gleichen Patienten.

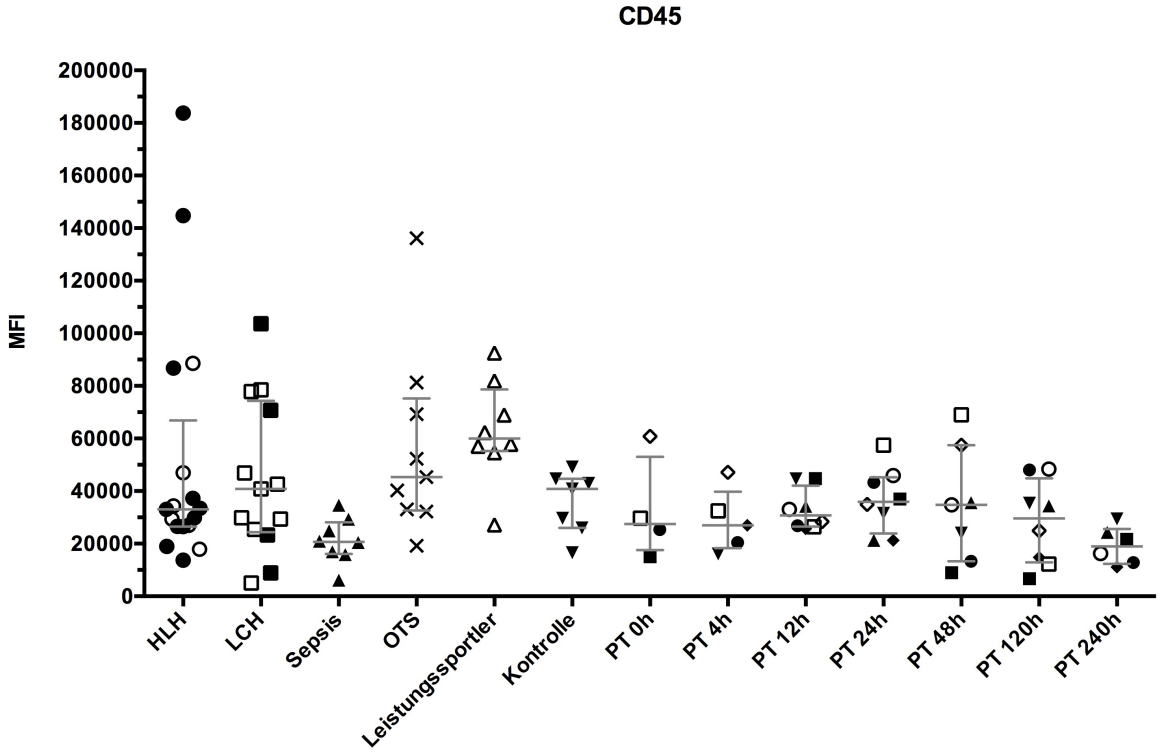


Abbildung 10: CD45-Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: MFI= mean fluorescent intensity bzw. CD45-Expressionsdichte auf Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

### 3.1.2.4. CD163

Bei CD163 fallen fünf Patienten (6, 4, 5, 8, 7) auf, die sowohl in den gated-Werten als auch in den MFI-Werten nach oben abweichen. Die Werte grenzen sich deutlich von der restlichen der LCH-Gruppe ab, liegen jedoch immer noch in vergleichbarem Rahmen zu den Normalspendern (Abb. 11 und 12).

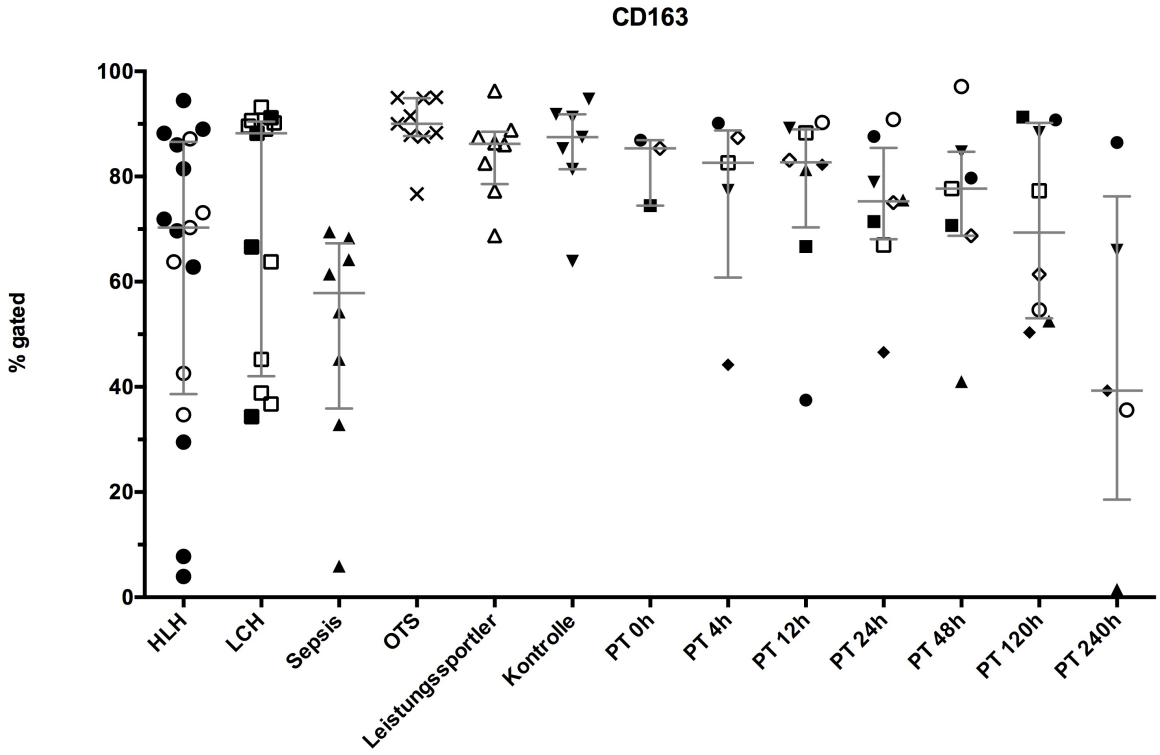


Abbildung 11: CD163-Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: Prozentwert der CD163-exprimierenden Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

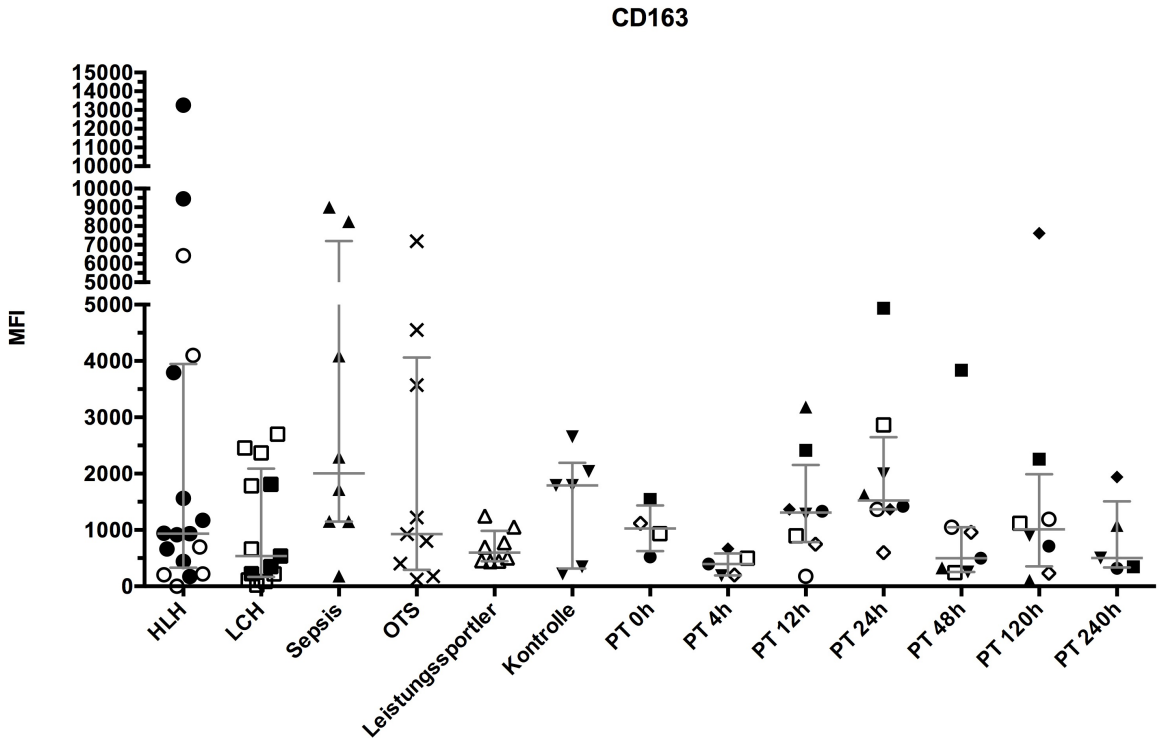


Abbildung 12: CD163- Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: MFI: mean fluorescent intensity bzw. CD163-Expressionsdichte auf Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

### 3.1.2.5. HLA-DR

Bei HLA-DR lässt sich insbesondere in den %-gated eine Population ausmachen, die niedrigere Werte als die den Normalspendern ähnelnde restliche Population aufweist. Diese sechs Patienten (1, 3, 6, 11, 12, 13) zeigen einen ähnlich niedrigen Anteil HLA-DR positiver Zellen wie die Sepsispatienten (Abb. 7). Auch in der Darstellung der MFI fallen vier dieser Patienten (1, 6, 12, 13) durch niedrige, den Sepsis- und Polytrauma-Patienten ähnliche Werte auf (Abb. 13).

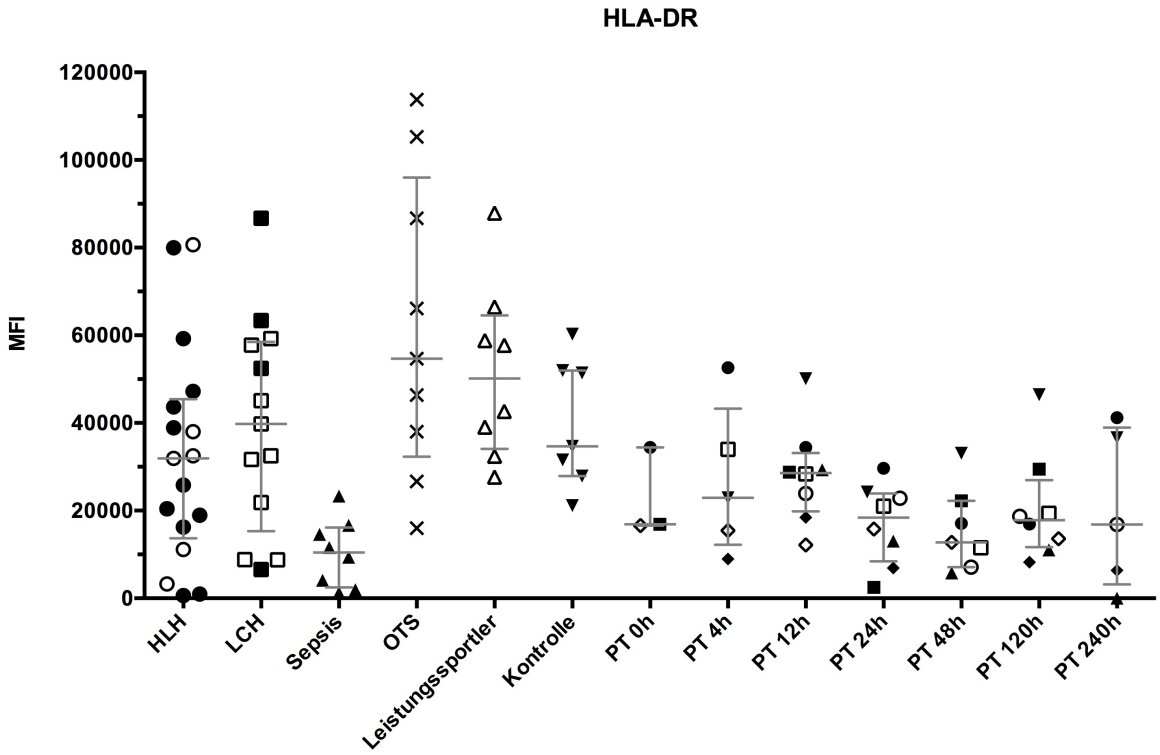


Abbildung 13: HLA-DR-Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: MFI: mean fluorescent intensity bzw. HLA-DR-Expressionsdichte auf Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

### 3.1.3. Sepsis vs. Kontrolle

#### 3.1.3.1. CD4

Mit 36 im Median fanden sich bei den Sepsispatienten deutlich weniger CD4-positive Zellen als bei den Normalspendern (Median=87, p=0,00031) (Abb. 3). Auch die Expressionsdichte von CD4 ist mit 1522 signifikant niedriger in der Sepsisgruppe (p=0,0023) (Abb. 8).

#### 3.1.3.2. CD14

In der Sepsisgruppe findet sich eine niedrigere Expressionsdichte (28943) als in der Kontrollgruppe (p=0,017) (Abb. 4).

#### 3.1.3.3. CD45 MFI

Die Expression von CD45 ist in der Gruppe Sepsis mit einem Median von 20693 niedriger als in der Kontrollgruppe (Median= 40790, p=0,029) (Abb. 10).

### 3.1.3.4. CD95%

Die Prozentzahl der CD95-positiven Zellen ist mit einem Median von 91 niedriger als in der Kontrollgruppe (96). Ein Patient weicht in der Sepsis-Gruppe mit einem Wert von 56 nach unten ab. Mit diesem Patienten ergibt sich ein p-Wert von p=0,021, ohne ist p=0,00816 (Abb. 14).

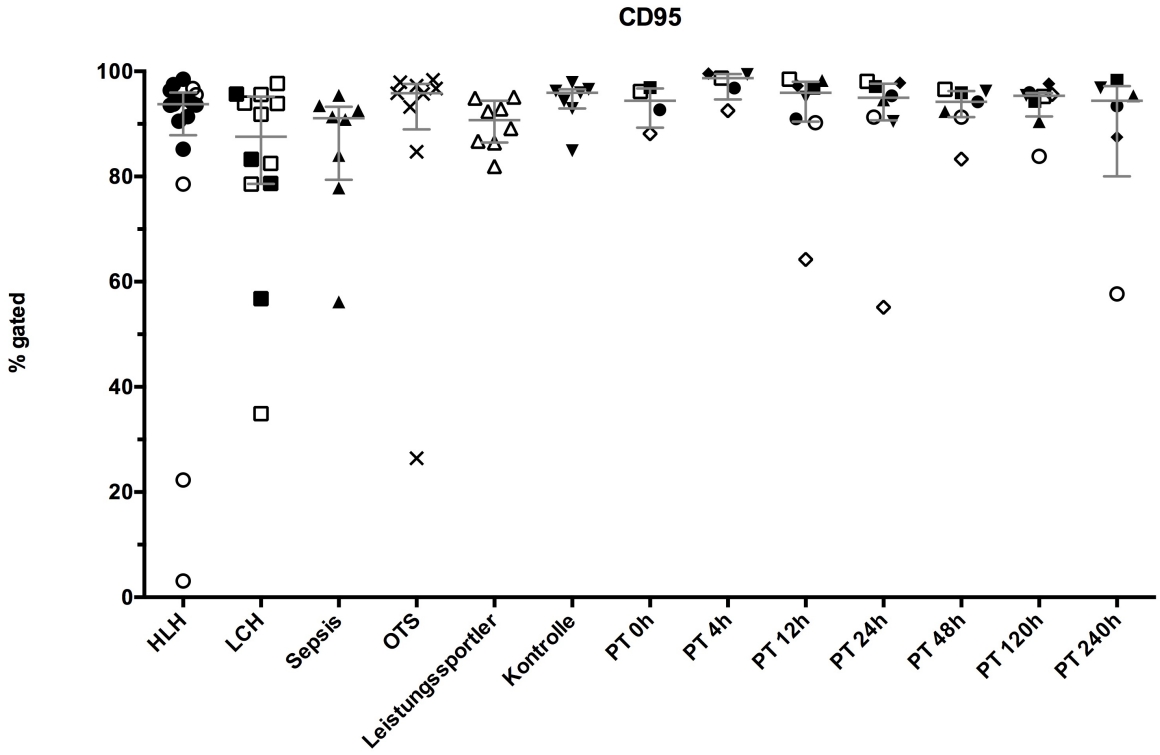


Abbildung 14: CD95-Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: Prozentwert der CD95-exprimierenden Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

### 3.1.3.5. HLA-DR

Sowohl bei den %-gated- als auch bei den MFI-Werten zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen gesunden Probanden und Sepsispatienten (Abb. 7 und 13). Im Median sind bei ersteren 88% der Zellen positiv gegated worden, bei letzteren nur 58% (p=0,0022) wobei ein Patient durch einen extrem niedrigen Wert von 6% auffällt. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Messung der Expressionsdichte: Sie ist mit einem Median von 10463 bei den Patienten niedriger als bei den gesunden Probanden mit 34677 (p=0,00062).

## 3.1.4. Polytrauma vs. Kontrolle

Zu allen Zeitpunkten ist bei den Polytrauma-Patienten der Anteil CD4-positiver Zellen signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe, die MFI-Werte von CD16 und CD64 sind

zu allen Zeitpunkten signifikant höher, die Werte von CD4 MFI zu sechs von sieben Zeitpunkten niedriger als in der Kontrollgruppe. Tabelle 12 gibt einen Überblick über diese vier auffälligsten Oberflächenmarker in der Polytrauma-Gruppe. Zum Zeitpunkt 0h fällt außerdem eine erhöhte Expression von CD11b mit einem Median von 72513 im Vergleich zu 11170 bei den Normalspendern auf (p=0,024) (Abb. 9). Vier Stunden nach dem Polytrauma-Ereignis zeigen sich, außer den bereits genannten, erhöhte Werte bei CD11b, und zwar sowohl bei den %-positiven Zellen (99, p=0,00606) als auch der MFI (37604, p=0,0051) (Abb. 9 und 15 ). Außerdem ist der Anteil CD95-(99 versus 96) positiver Zellen höher als in der gesunden Vergleichsgruppe (p=0,019). Zum Zeitpunkt 12h sind die MFI-Werte von CD11b mit 55591 weiterhin höher als bei den Normalspendern (p=0,0012). Der Unterschied in der CD11b-Expression ist auch nach 24 Stunden noch festzustellen (Median=50868, p=0,00124). Nun finden sich allerdings erniedrigte Werte bei HLA-DR (Abb. 7 und 13). Sowohl die Prozentzahl (76 versus 89) als auch die MFI (18413 versus 34677) sind signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (p=0,035 bzw. p=0,0037).

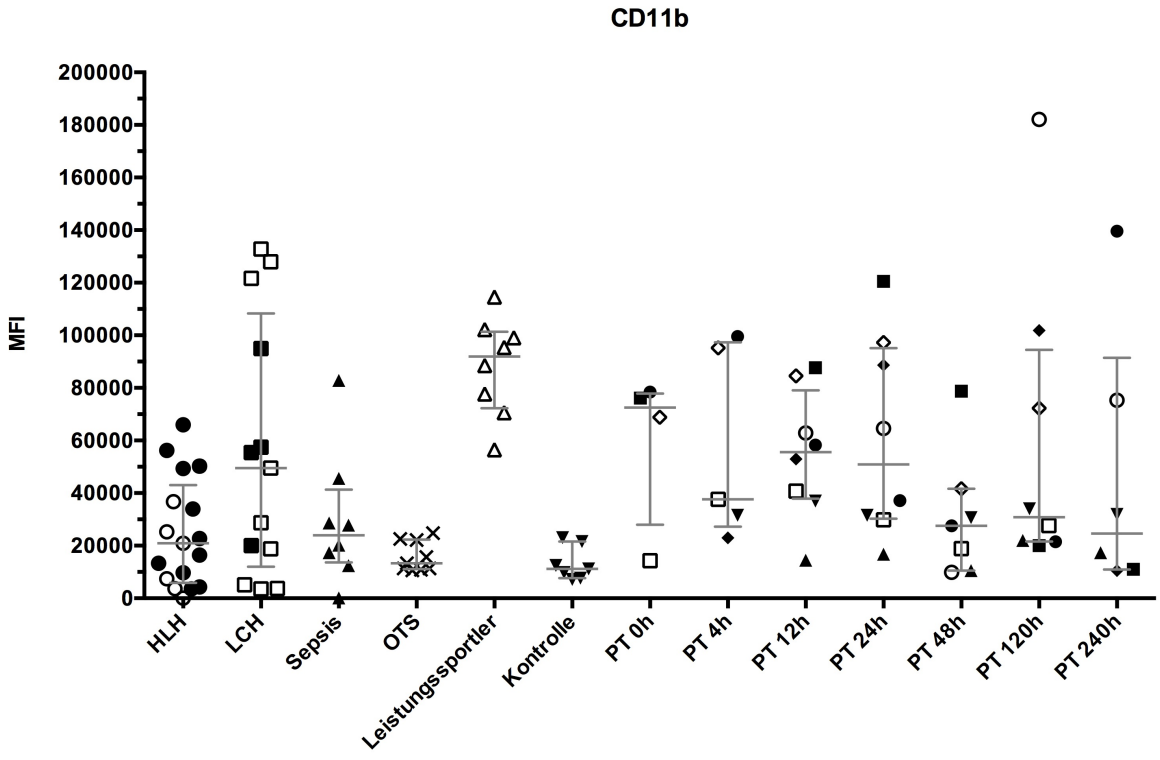


Abbildung 15: CD11b- Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: MFI: mean fluorescent intensity bzw. CD11b-Expressionsdichte auf Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

Die HLA-DR-Expressionsdichte ist mit einem Median von 12774 auch bei 48h deutlich erniedrigt (p=0,007), ansonsten finden sich zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Unterschiede. 120 Stunden nach Polytrauma lässt sich noch immer eine verringerte HLA-DR-Expression (17800, p=0,0093) feststellen, zudem ist die Expression von CD11b vergleichsweise wieder erhöht (30856, p=0,0059). Zum letzten gemessenen Zeitpunkt 240h findet man wieder eine vergleichsweise niedrige Prozentzahl HLA-DR-positiver Zellen (39, p=0,03). Des Weiteren fällt eine im Vergleich zur Kontrolle niedrigere Expression von CD45 auf den Monozyten auf (18938 vs. 407901, p=0,014) (Abb. 10). Zum Vergleich der Polytrauma-Gruppen untereinander s. 3.2. und Abb. 16.

Tabelle 12: Mediane und p-Werte im Vergleich Normalspender vs. Polytrauma für die drei auffälligsten Oberflächenmarker. %gated: Anteil positiver Zellen MFI: mean fluorescent intensity

| | Median Kontrollgruppe | | PT Zeitpunkt | Median PT | p = |
|---|---|---|---|---|---|
| CD4%gated | 87 | > | PT0h | 64 | 0,012 |
| | | > | PT4h | 56 | 0,0025 |
| | | > | PT12h | 43 | 0,00031 |
| | | > | PT24h | 37 | 0,00062 |
| | | > | PT48h | 38 | 0,0041 |
| | | > | PT120h | 49 | 0,0022 |
| | | > | PT240h | 33 | 0,0025 |
| CD4 MFI | 4249 | > | PT4h | 1903 | 0,005 |
| | | > | PT12h | 2033 | 0,0037 |
| | | > | PT24h | 2286 | 0,0093 |
| | | > | PT48h | 1783 | 0,017 |
| | | > | PT120h | 2424 | 0,0093 |
| | | > | PT240h | 2925 | 0,0046 |
| CD16 MFI | 1790 | < | PT0h | 8955 | 0,012 |
| | | < | PT4h | 16466 | 0,0025 |
| | | < | PT12h | 9706 | 0,0037 |
| | | < | PT24h | 88245 | 0,0059 |
| | | < | PT48h | 7573 | 0,00058 |
| | | < | PT120h | 10628 | 0,0037 |
| | | < | PT240h | 88170 | 0,0012 |
| CD64 MFI | 9 | < | PT0h | 495 | 0,0238 |
| | | < | PT4h | 219 | 0,019 |
| | | < | PT12h | 150 | 0,015 |
| | | < | PT24h | 172 | 0,0087 |
| | | < | PT48h | 151 | 0,0043 |
| | | < | PT120h | 322 | 0,0012 |
| | | < | PT240h | 286 | 0,0087 |

## 3.2. Ergebnisse der Polytraumagruppe

### 3.2.1. Vergleich der Abnahmezeitpunkte innerhalb der Polytrauma-Gruppe

Aufgrund der geringen Probenanzahl können für die Zeitpunkte 0h und 4h keine statistisch verwertbaren Aussagen getroffen werden. Beim Vergleich der anderen Zeitpunkte fallen im Verlauf zwischen ausgewählten Zeitpunkten besonders ein Abfall von HLA-DR% und MFI auf, zudem ein Abfall von CD11b% und MFI sowie CD163-MFI. Ein Anstieg der Werte ist bei CD16 MFI und CD45-MFI im Vergleich 24h versus 240h festzustellen (Abb. 16 und Tab. 13).

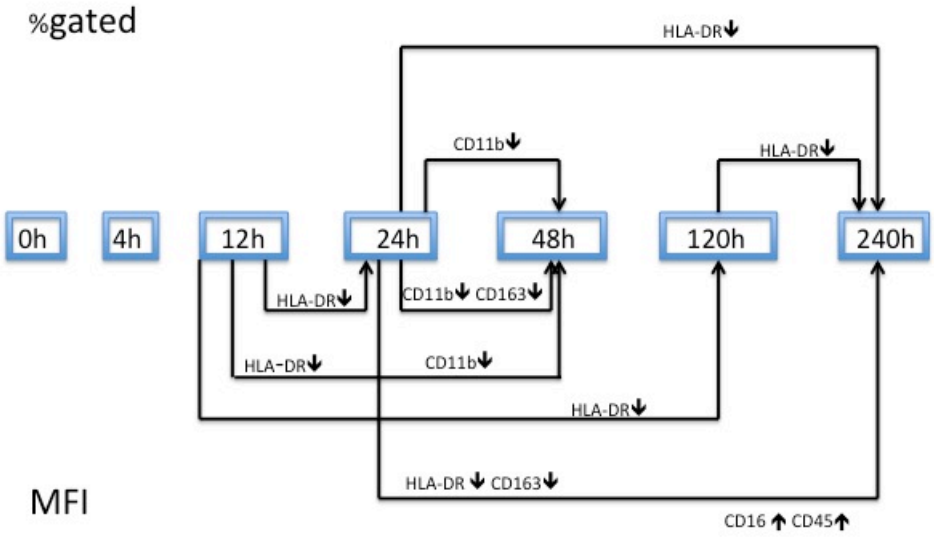


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Veränderung von Oberflächenantigenen in der Polytrauma-Gruppe zu den sieben gemessenen Zeitpunkten., CD: cluster of differentiaton, %gated: Anteil positiver Zellen, MFI: mean fluorescent intensity, ↑: Wert steigt im Verlauf an, ↓: Wert fällt im Verlauf ab

Tabelle 13: Zusammenstellung von Medianen und p-Werten des Vergleichs der Polytrauma-Zeitpunkte untereinander. t1=früherer Zeitpunkt, t2= späterer Zeitpunkt, %gated: Anteil positiver Zellen, MFI: mean fluorescent intensity

| Oberflächenantigen (Einheit) | t1 | Median | | t2 | Median | p= |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CD11b(%gated) | PT24h | 97 | > | PT48h | 94 | 0,031 |
| CD11b(MFI) | PT12h | 55591 | > | PT48h | 27577 | 0,031 |
| | PT24h | 50868 | > | PT48h | 27577 | 0,031 |
| CD16(MFI) | PT24h | 8825 | < | PT240h | 18871 | 0,031 |
| CD45(MFI) | PT24h | 35940 | < | PT240h | 18938 | 0,047 |
| CD163(MFI) | PT24h | 1421 | > | PT48h | 500 | 0,031 |
| | PT24h | 1421 | > | PT240h | 504 | 0,031 |
| HLA-DR (%gated) | PT24h | 76 | > | PT240h | 39 | 0,031 |
| | PT120 | 69 | > | PT240h | 39 | 0,031 |
| HLA-DR (MFI) | PT12h | 28570 | > | PT24h | 18413 | 0,023 |
| | PT12h | 28570 | > | PT48h | 12774 | 0,031 |
| | PT12h | 28570 | > | PT120h | 16918 | 0,039 |

### 3.2.2. Auffälligkeiten im posttraumatischen Verlauf

#### 3.2.2.1. Scores

##### 3.2.2.1.1. ISS

Insgesamt zeigten die Patienten mit einem mittleren ISS von 39 eine hohe Verletzungsschwere. Das schwerste Verletzungsmuster lag bei Patient 7 mit 51 Punkten vor, im Vergleich am geringsten waren die Verletzungen von Patient 6 , die im Score einen Wert von immerhin 27 ergaben (Abb.17).

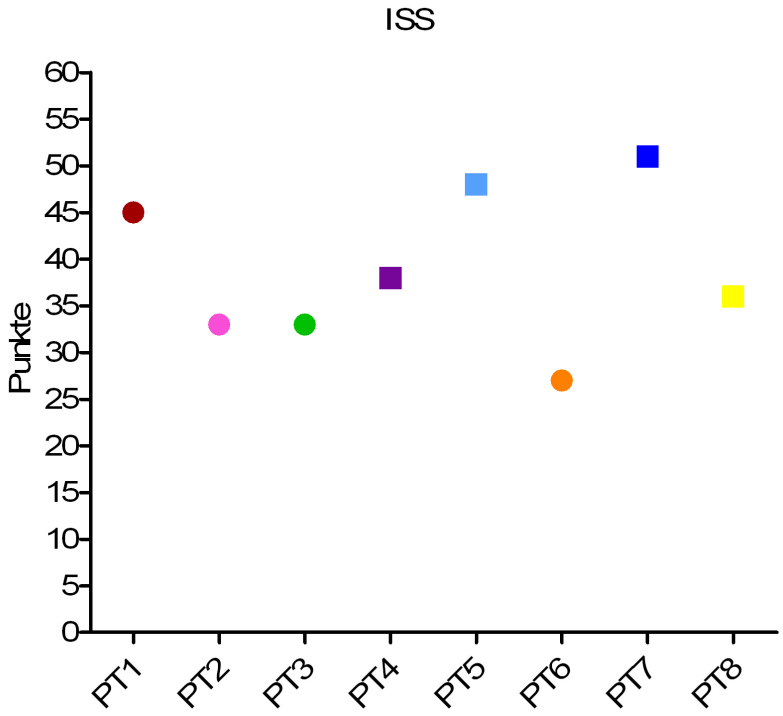


Abbildung 17: Punktwerte der Polytraumapatienten (PT 1-8) im Injury Severity Score (ISS). Quadrate stellen die Patienten dar, die im Verlauf eine Sepsis entwickelten.

##### 3.2.2.1.2. SAPS 3

Die Patienten 1,2,3 und 6 zeigten bei Aufnahme niedrige Werte zwischen 41 und 55. Die restlichen vier Patienten lagen mit 65 bis 77 Punkten (Patient 7) deutlich darüber. Besonders hohe Werte (77-95) finden sich bei Patient 7 (Abb. 18).

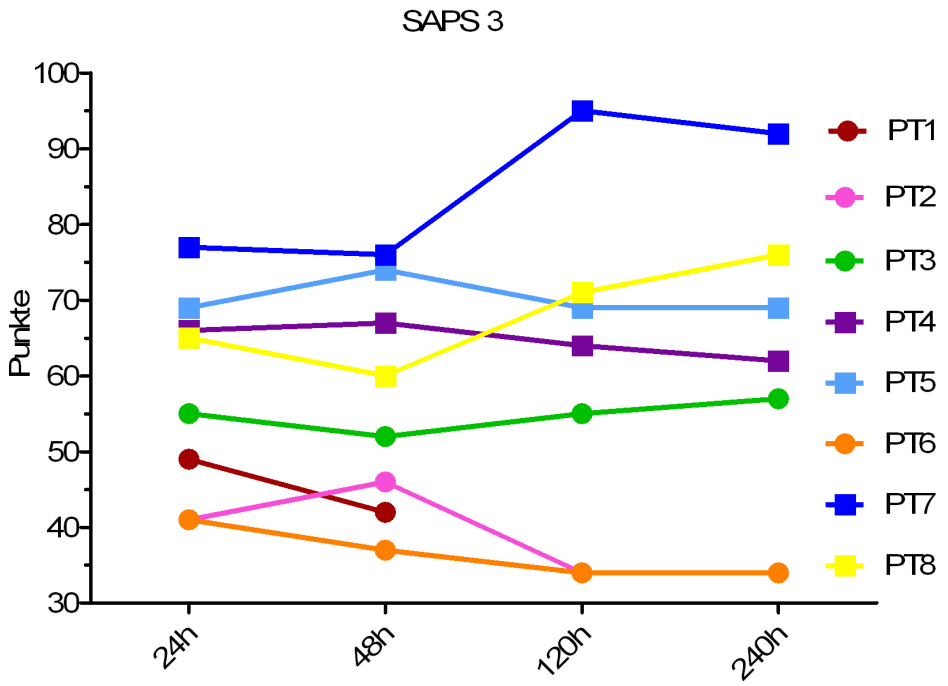


Abbildung 18: Punktwerte der Polytraumapatienten (PT 1-8) im SAPS 3-Score von Tag eins der Aufnahme bis Tag zehn. SAPS : Symplified Acute Physiology Score. Quadrate stellen die Patienten dar, die im Verlauf eine Sepsis entwickelten.

3.2.2.1.3. Sepsis

Patient 1 erfüllt zum Zeitpunkt 24h die Kriterien eines SIRS-Schock, 24 Stunden später nur noch die eines schweren SIRS. Zu den späteren Zeitpunkten wurden die Scores nicht mehr erfasst, da der Patient nicht mehr auf der Intensivstation lag. Patient 2 befand sich über den gesamten Untersuchungszeitraum im SIRS. Die Score-Punkte des Patienten 3 entsprechen bei 24h einem SIRS, ab 48h einem schweren SIRS. Patient 4 hatte zum Zeitpunkt 24h ein SIRS, zwischen 48h und 120h eine Sepsis , die sich bis 240h zu einer schweren Sepsis entwickelte. Patient 5 war von 24h-120h im SIRS-Schock, zum Zeitpunkt 240h im septischen Schock. Bei Patient 6 fallen die Score-Punkte vom schweren SIRS (24h) über SIRS (48h) bis auf 0 (= gesund, 120h, 240h) ab. Patient 7 befand sich zu den Zeitpunkten 24h und 48h im schweren SIRS, bei 120h im SIRS-Schock und bei 240h im septischen Schock. Bei Patient 8 fielen die Werte zunächst vom SIRS-Schock (24h) auf schweres SIRS (48h) und steigen dann wieder entsprechend eines septischen Schocks (120h und 240h) (Abb. 19).

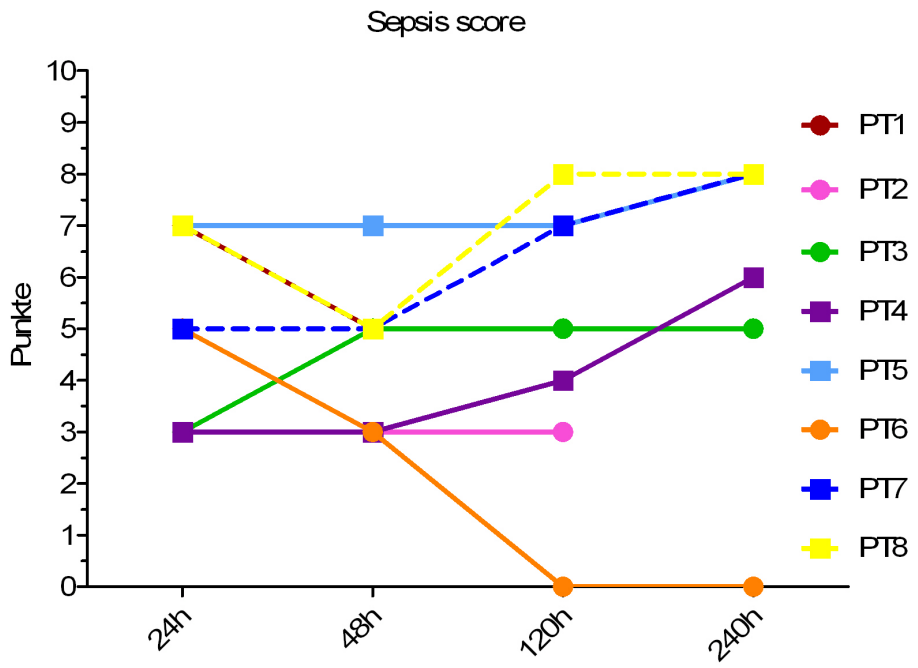


Abbildung 19: Punktwerte der Polytraumapatienten (PT 1-8) im Sepsis-Score von Tag eins der Aufnahme bis Tag zehn. Quadrate stellen die Patienten dar, die im Verlauf eine Sepsis entwickelten.

### 3.2.2.1.4. SOFA

Die Patienten 1, 2, 3, 4 und 6 weisen niedrige Werte zwischen eins und sechs auf, die tendenziell abfallen. Die Patienten 5, 7 und 8 fallen im SOFA-Score erneut durch hohe Werte zwischen 8 und 9 auf, die bei den Patienten 7 und 8 bis zum letzten Messzeitpunkt weiter ansteigen. Besonders stark ist der Anstieg bei Patient 7, der zu den Zeitpunkten 120h und 240h 14 Punkte erreicht. Bei Patient 5 fällt der Score von 8 (24h-48h) auf 7 zum Zeitpunkt 240h (Abb. 20).

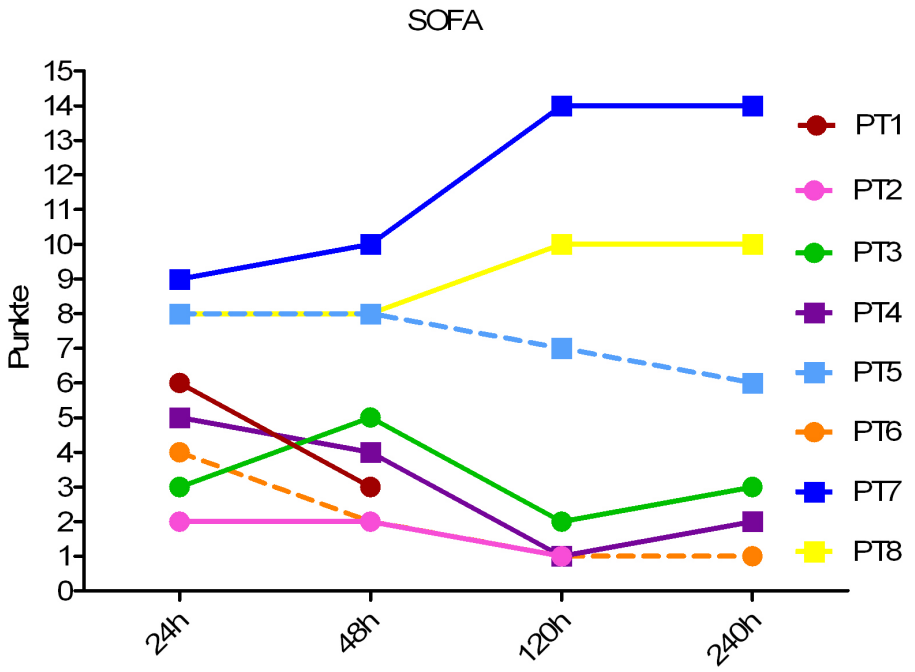


Abbildung 20: Punktwerte der Polytraumapatienten (PT 1-8) im SOFA-Score von Tag eins der Aufnahme bis Tag zehn. SOFA: sequential organ failure assesment. Quadrate stellen die Patienten dar, die im Verlauf eine Sepsis entwickelten.

### 3.2.2.2. Oberflächenmarker

Die Oberflächenexpression der verschiedenen Marker wurde zu den Zeitpunkten 0h, 4h, 12h, 24h, 48h 120h und 240h nach Trauma gemessen, leider liegen nicht bei allen Patienten für jeden Messzeitpunkt Werte vor. Die Veränderung der Oberflächenexpression zu den Zeitpunkten nach Trauma ist bei den Patienten für die meisten CD-Marker sehr heterogen. Besonderheiten lassen sich in erster Linie bei den Antigenen CD11b, CD14, CD64, CD163 und HLA-DR feststellen.

### 3.2.2.2.1. CD11b

Bei den Patienten 4, 5 und 6 zeigt sich im Verlauf nur eine geringe Variation in der CD11b-Expressionsdichte. Bei den Patienten 1, 2, 3 und 7 lässt sich, wenn auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten, ein Anstieg der Expressionsdichte feststellen, der im weiteren Verlauf bei den Patienten 2, 3 und 7 von einem Abfall gefolgt wird. Bei Patient 8 fällt die Expression tendenziell ab (Abb. 21).

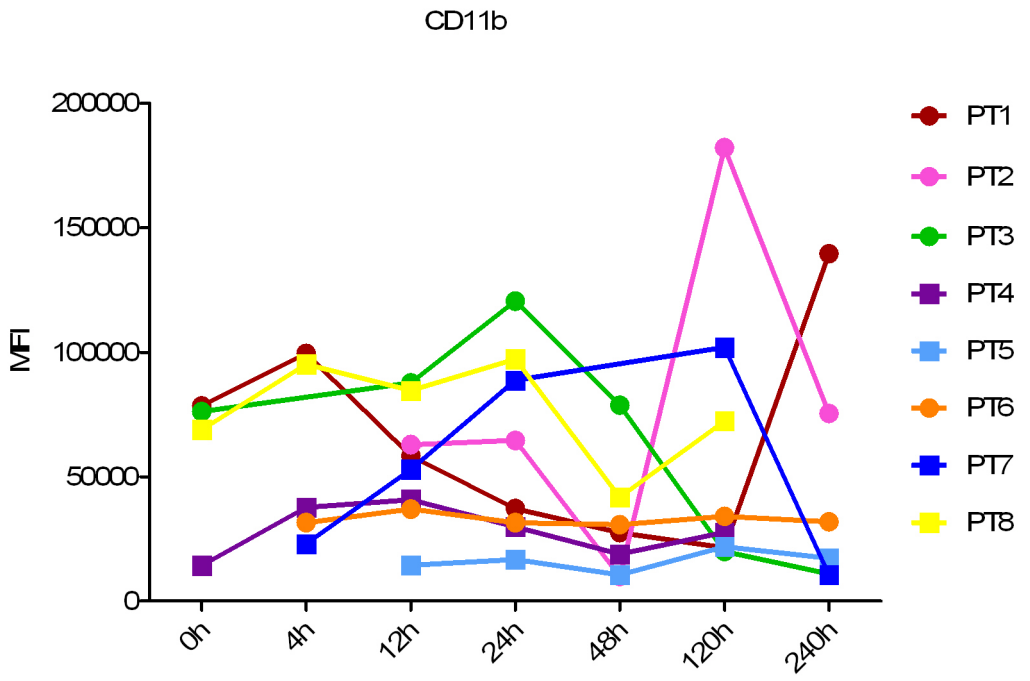


Abbildung 21: Expressionsdichte (MFI, mean fluorescence intensity) von CD11b bei Polytraumapatienten (PT1-8) von Tag eins der Aufnahme bis Tag 10. Quadrate stellen die Patienten dar, die im Verlauf eine Sepsis entwickelten.

### 3.2.2.2.2. CD14

Die Prozentzahl der CD14-positiven Zellen bewegt sich zu Beginn bei fast allen Patienten zwischen 78 und 95%. Die Patienten 1, 2 und 5 zeigen einen Abfall der CD14-positiven Zellen ab 120h, Patient 3 nach einem Minimum bei 24h einen Anstieg im weiteren Verlauf. Bei den übrigen Patienten blieb der Anteil CD14-positiver Zellen über den gesamten Messzeitraum weitestgehend konstant (Abb. 22).

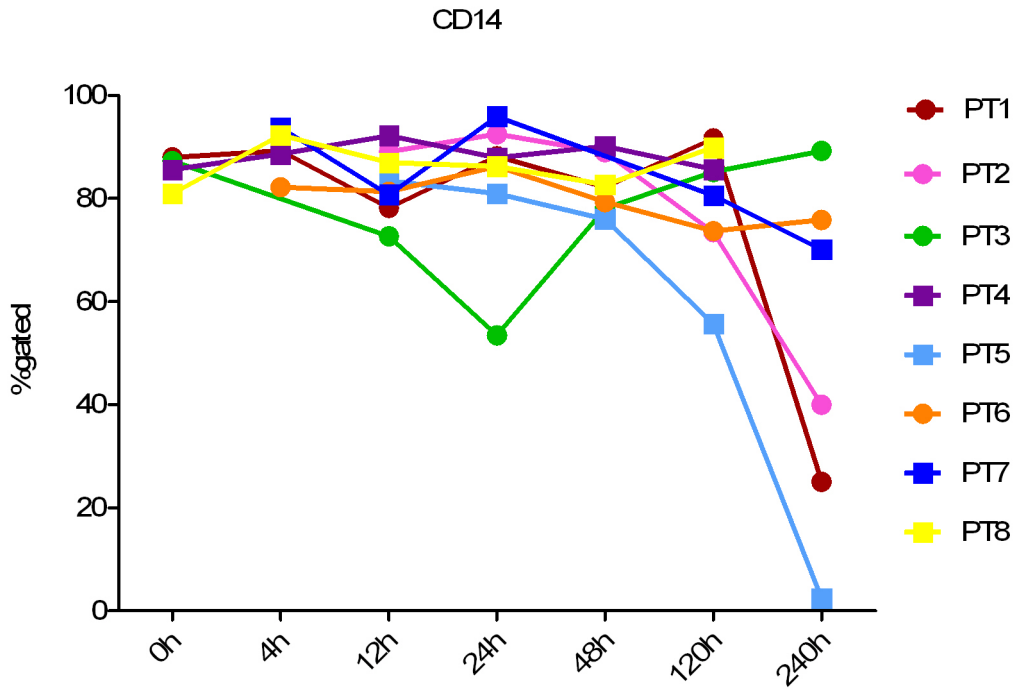


Abbildung 22: Anteil CD14-positiver Monozyten bei Polytraumapatienten (PT1-8) von Tag eins der Aufnahme bis Tag 10. Quadrate stellen die Patienten dar, die im Verlauf eine Sepsis entwickelten.

### 3.2.2.2.3. CD64

Die Patienten 1, 4 und 6 zeigen eine gleichbleibende Expression von CD64, die zwischen 55 und 634 rangiert. Bei den Patienten 2, 5, 7 und 8 finden sich zu verschiedenen Zeitpunkten einzelne Maxima zwischen 2000 und 3000, der mit Abstand höchste Wert von 16396 fällt bei Patient 8 zum Zeitpunkt 24h auf. Bei Patient 3 mussten einige Werte aufgrund von Messfehlern aus der Wertung genommen werden (Abb. 23).

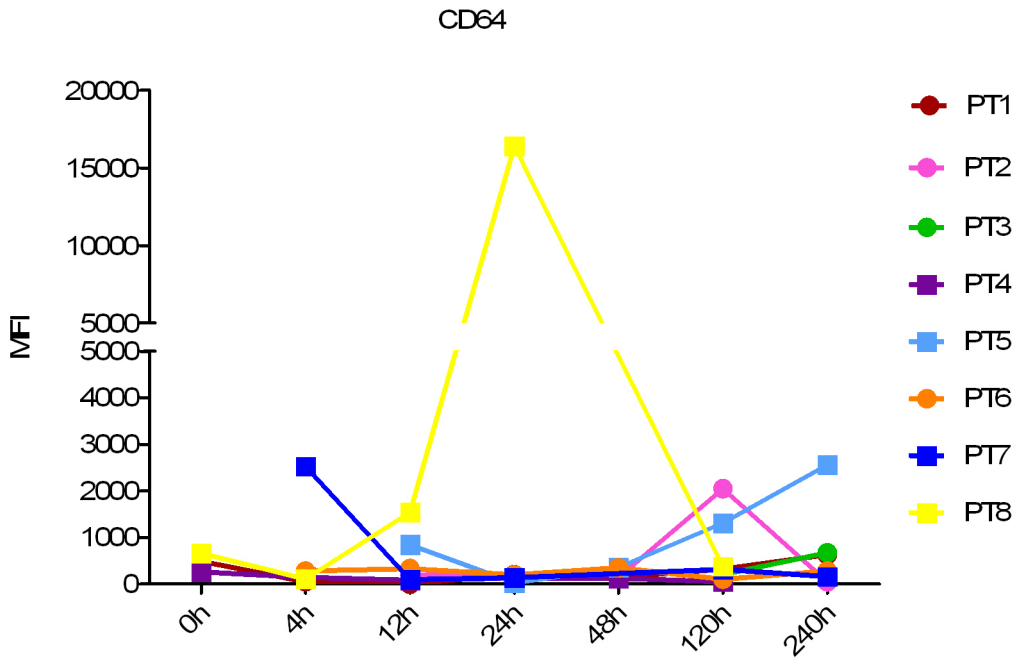


Abbildung 23: Expressionsdichte (MFI, mean fluorescence intensity) von CD64 bei Polytraumapatienten (PT1-8) von Tag eins der Aufnahme bis Tag 10. Quadrate stellen die Patienten dar, die im Verlauf eine Sepsis entwickelten.

### 3.2.2.2.4 CD163

Bei Betrachtung der CD163-Expressionsdichte fallen bei den Patienten 3, 4, 5 und besonders Patient 7 isolierte MFI-Maximalwerte bis 7614 (Patient 7) bzw. 4938 (Patient 3) auf, zu den anderen Zeitpunkten bewegen sich die Messwerte, wie die der Patienten 1, 2, 6 und 8, im Bereich unter 2000 (Abb. 24).

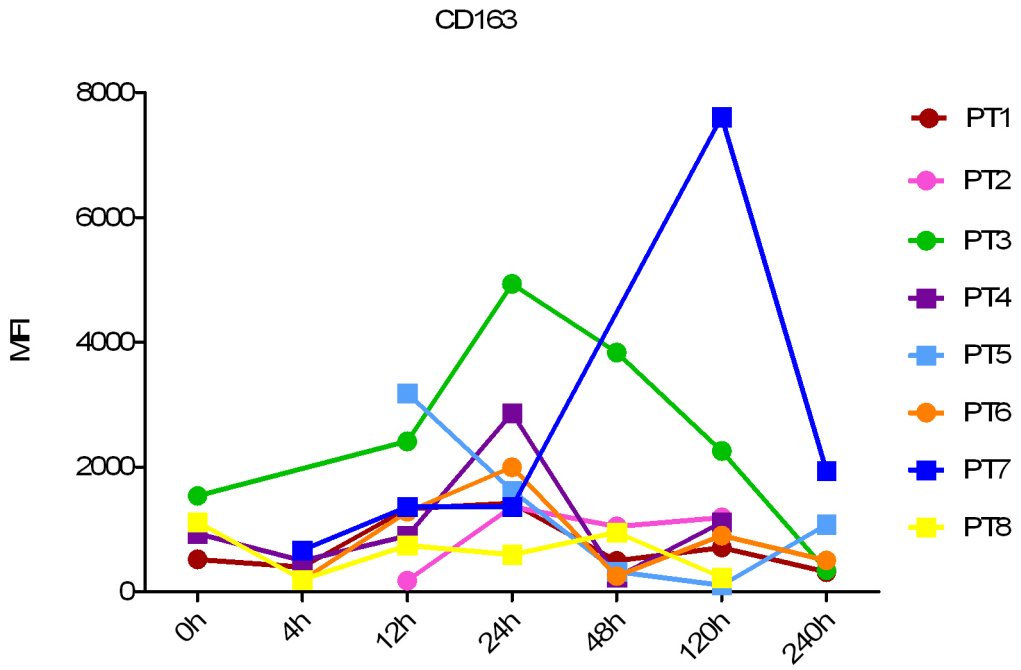


Abbildung 24: Expressionsdichte (MFI, mean fluorescence intensity) von CD163 bei Polytraumapatienten (PT1-8) von Tag eins der Aufnahme bis Tag 10. Quadrate stellen die Patienten dar, die im Verlauf eine Sepsis entwickelten.

### 3.2.2.2.5 HLA-DR

Bei allen Patienten, außer Patient 8, der eine gleichbleibend niedrige HLA-DR-Expression aufweist, kann ein Abfall der Werte zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen vier und 120 Stunden festgestellt werden. Bei den Patienten 1, 2, 3, 4 und 6 kann im weiteren Verlauf eine steigende Tendenz in der HLA-DR-Expression erkannt werden, wobei der Anstieg bei den Patienten 1, 3 und 6 besonders steil ist und bei den Patienten 2 und 4 nur schwach ausfällt. Diese Patienten erreichen zu den späteren Zeitpunkten nur vergleichsweise niedrige Expressionswerte. Bei Patient 7 bleibt die Expression nach einem Abfall zwischen zwölf und 24 Stunden ähnlich Patient 8 auf einem niedrigen Niveau unter 20.000, bei Patient 5 fällt sie sogar noch weiter ab (Abb. 25).

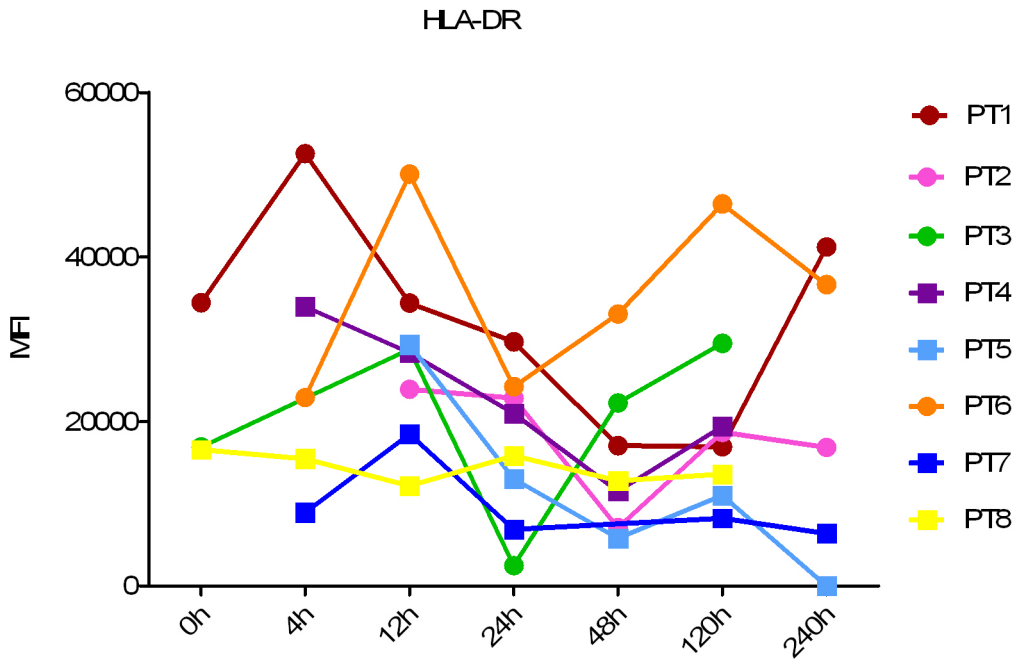


Abbildung 25: Expressionsdichte (MFI, mean fluorescence intensity) von HLA-DR bei Polytraumapatienten (PT1-8) von Tag eins der Aufnahme bis Tag 10. Quadrate stellen die Patienten dar, die im Verlauf eine Sepsis entwickelten.

### 3.2.2.3. Polytrauma vs. HLH

Im Vergleich dieser Gruppen fallen vor allem höhere Prozentwerte von CD11b seitens der Traumapatienten auf. Die MFI von CD14 ist zu drei Zeitpunkten höher als in der HLH-Gruppe.

Tabelle 14: Zusammenstellung von Medianen und p-Werten des Vergleichs Polytrauma (PT) versus HLH. %gated: Anteil positiver Zellen, MFI: mean fluorescent intensity, kursiv: Ergebnis der logistischen Regressionsanalyse

| | Median HLH | | PT Zeitpunkt | Median PT | p = |
|---|---|---|---|---|---|
| CD11b%gated | 79 | < | PT4h | 98 | 0,00012 |
| | | < | PT12h | 97 | 0,0061 |
| | | < | PT24h | 97 | 0,00017 |
| | | < | PT48h | 94 | 0,0039 |
| | | < | PT120h | 93 | 0,014 |
| | | > | PT12h | 2033 | 0,0037 |
| | | > | PT24h | 2286 | 0,0093 |
| CD14 MFI | 29054 | > | PT12h | 67025 | 0,021 |
| | | > | PT24h | 53470 | 0,045 |
| | | > | PT120h | 40840 | *0,045* |
| CD45 MFI | 33218 | > | PT240 | 18937 | 0,01 |

### 3.2.2.4. Polytrauma vs. Sepsis

Die Traumapatienten scheinen sich insgesamt in der Expression von Oberflächenantigenen von den Sepsispatienten zu unterscheiden. Signifikante Unterschiede gibt es, zu verschiedenen Zeitpunkten, bei fast allen untersuchten Oberflächenmarkern: CD4 %gated (Abb. 3), CD11b (Abb. 9 und 15), CD16-MFI (Abb. 5), CD45 (Abb. 10), CD95-MFI (Abb. 27), CD163-MFI (Abb. 12) und HLA-DR (Abb. 7 und 13). Eine Übersicht über die einzelnen Unterschiede mit Median und p-Werten geben die folgenden Tabellen 15-21:

Tabelle 15: Übersicht über die Mediane und p-Werte im Vergleich Polytrauma vs. Sepsis zum Zeitpunkt 0h

| Oberflächenmarker | PT-Gruppe Median | | Sepsis-Gruppe Median | p= |
|---|---|---|---|---|
| CD4% | 64 | > | 36 | 0,00081 |
| CD11b% | 96 | > | 85 | 0,016 |
| CD64 MFI | 495 | > | 0 | 0,0061 |
| CD95 MFI | 6927 | < | 19278 | 0,048 |
| HLA-DR% | 85 | > | 58 | 0,012 |

Tabelle 16: Übersicht über die Mediane und p-Werte im Vergleich Polytrauma vs. Sepsis. zum Zeitpunkt 4h

| Oberflächenmarker | PT–Gruppe Median | | Sepsis-Gruppe Median | p= |
|---|---|---|---|---|
| CD4% | 56 | > | 36 | 0,019 |
| CD11b% | 99 | > | 85 | 0,004 |
| CD11b MFI | 37604 | < | 20167 | 0,048 |
| CD16 MFI | 16466 | > | 2290 | 0,018 |
| CD45% | 98 | > | 93 | 0,018 |
| CD64 MFI | 219 | > | 0 | 0,0031 |
| CD95% | 99 | > | 91 | 0,0061 |
| HLA-DR% | 85 | > | 58 | 0,0041 |

Tabelle 17: Übersicht über die Mediane und p-Werte im Vergleich Polytrauma vs. Sepsis zum Zeitpunkt 12h. kursiv: Ergebnis der logistischen Regressionsanalyse, ns: Unterschied nicht signifikant

| Oberflächenmarker | PT-Gruppe Median | | Sepsis-Gruppe Median | p= |
|---|---|---|---|---|
| CD11b% | 97 | > | 85 | 0,0093 |
| CD11b MFI | 55591 | > | 20167 | 0,014 |
| CD45 MFI | 30742 | > | 20693 | 0,021 *(ns)* |
| CD64 MFI | 150 | > | 0 | 0,00058 |
| HLA-DR% | 83 | > | 58 | 0,0012 |
| HLA-DR MFI | 28371 | > | 10463 | 0,0037 |

Tabelle 18: Übersicht über die Mediane und p-Werte im Vergleich Polytrauma vs. Sepsis zum Zeitpunkt 24h. kursiv: Ergebnis der logistischen Regressionsanalyse, ns: Unterschied nicht signifikant

| Oberflächenmarker | PT-Gruppe Median | | Sepsis-Gruppe Median | p= |
|---|---|---|---|---|
| CD11b% | 96 | > | 85 | 0,0012*(ns)* |
| CD11b MFI | 50867 | > | 20167 | 0,021 |
| CD45 MFI | 35940 | > | 20693 | 0,007 *(ns)* |
| CD64 MFI | 172 | > | 0 | 0,00058 |
| HLA-DR% | 76 | > | 58 | 0,0012 |

Tabelle 19: Übersicht über die Mediane und p-Werte im Vergleich Polytrauma vs. Sepsis zum Zeitpunkt 48h.

| Oberflächenmarker | PT-Gruppe Median | | Sepsis-Gruppe Median | p= |
|---|---|---|---|---|
| CD11b% | 94 | > | 85 | 0,040 |
| CD16 MFI | 7573 | > | 2290 | 0,038 |
| CD64 MFI | 152 | > | 0 | 0,0013 |
| CD163 MFI | 414 | < | 2004 | 0,020 |
| HLA-DR% | 79 | > | 58 | 0,0013 |

Tabelle 20: Übersicht über die Mediane und p-Werte im Vergleich Polytrauma vs. Sepsis zum Zeitpunkt 120h

| Oberflächenmarker | PT-Gruppe Median | | Sepsis-Gruppe Median | p= |
|---|---|---|---|---|
| CD64 MFI | 322 | > | 0 | 0,00058 |
| CD95% | 95 | > | 91 | 0,026 |

Tabelle 21: Übersicht über die Mediane und p-Werte im Vergleich Polytrauma vs. Sepsis zum Zeitpunkt 240h

| Oberflächenmarker | PT-Gruppe Median | | Sepsis-Gruppe Median | p= |
|---|---|---|---|---|
| CD16 MFI | 18870 | > | 2290 | 0,0047 |
| CD64 MFI | 287 | > | 0 | 0,0013 |

## 3.3. OTS vs. Kontrolle

Die Patienten mit Overtrainingsyndrom zeigen im Vergleich zu den Normalspendern einen erniedrigten Anteil CD16-positiver Monozyten (19 versus 27, p=0,029) (Abb. 26).

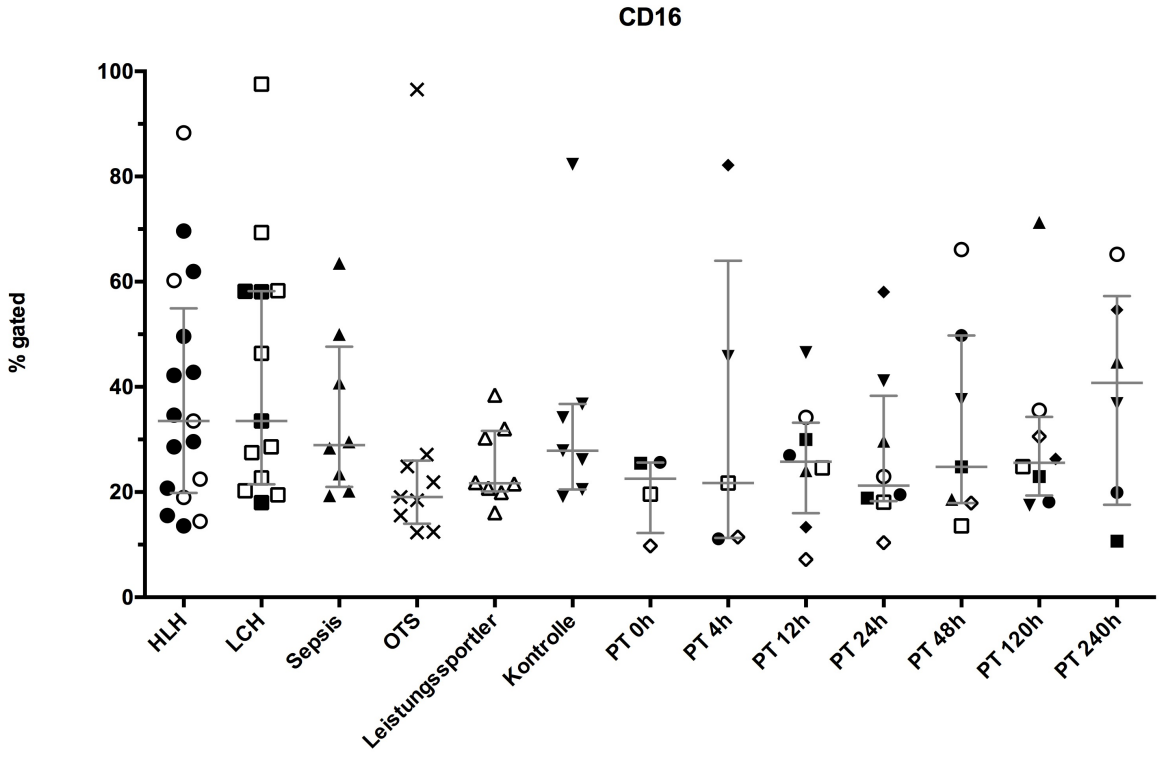


Abbildung 26: CD16-Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: Prozentwert der CD16- exprimierenden Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

Bei der CD45-MFI fällt auf, dass ein Teil der Patienten Werte entsprechend den Normalspendern aufweist, ein anderer im Bereich der Leistungssportler liegt (2, 5, 6, 7) (Abb. 10). Die Patienten mit OTS weisen als Gruppe bis auf zwei Werte die mit Abstand höchste Expression von CD64 auf (Median=15174, p=0,0004 im Vergleich zu den Normalspendern). In den anderen Gruppen sieht man derartig hohe Werte nur bei einzelnen Ausreißern (Abb. 6). Außerdem fällt auf, dass die OTS–Patienten das gleiche CD11b-Expressionsmuster wie die Normalspender aufweisen, wohingegen die Leistungssportler eine deutlich höhere Expression zeigen (s. 4.1). Bei der HLA-DR-MFI fallen die OTS-Patienten mit Werten zwischen 15984 und 113780 durch eine starke Streuung auf (Abb. 13), ebenso bei der CD14-MFI, die zwischen 14103 und 147983 variieren (Abb. 4). Auch die Prozentwerte von CD163 liegen stark gestreut zwischen 3 und 95 (Abb. 11). Bei Betrachtung des CD4%-Diagramms (Abb. 3) fällt ein OTS-Patient (2)

durch einen niedrigen Wert wie man ihn sonst nur bei den Gruppen HLH, Sepsis und Polytrauma findet, auf.

## 3.4. Leistungssportler vs. Kontrolle

### 3.4.1. CD11b MFI

Die Expressionsdichte von CD11b (Median=91896) ist verglichen mit der Gruppe der Normalspender (Median=11170) deutlich erhöht (p=0,00031) und zeigt ähnliche Werte wie einige der Polytrauma-, HLH- und LCH-Patienten (Abb. 15).

### 3.4.2. CD45

Die Expressionsdichte (Median=60023) sind bei den Leistungssportlern höher als in der normalen Kontrollgruppe (p=0,00058 bzw. p=0,0059). Bei Betrachtung der MFI fällt ein Sportler (5) auf, dessen Wert nach unten abweicht und somit der Verteilung bei den Normalspendern bzw. den Sepsispatienten ähnelt (Abb. 10).

### 3.4.3. CD64

Die MFI-Werte der Leistungssportler sind mit einem Median von 94 signifikant höher als die der Normalspender (p=0,0023), allerdings nicht so hoch wie die Werte der OTS-Patienten. Jedoch fällt ein Sportler (6) durch einen sehr hohen Wert von 9629 auf und ist damit eventuell der Gruppe OTS zuzuordnen (Abb. 6).

### 3.4.4. CD95

Bei den Leistungssportlern lassen sich vergleichsweise niedrigere Werte bei den %-positiven Zellen feststellen (Median=91, p=0,008), auch die Expressionsdichte von CD95 ist niedriger (Median=6708) als bei den Normalspendern (Median=14003, p=0,021) (Abb. 14 und 27).

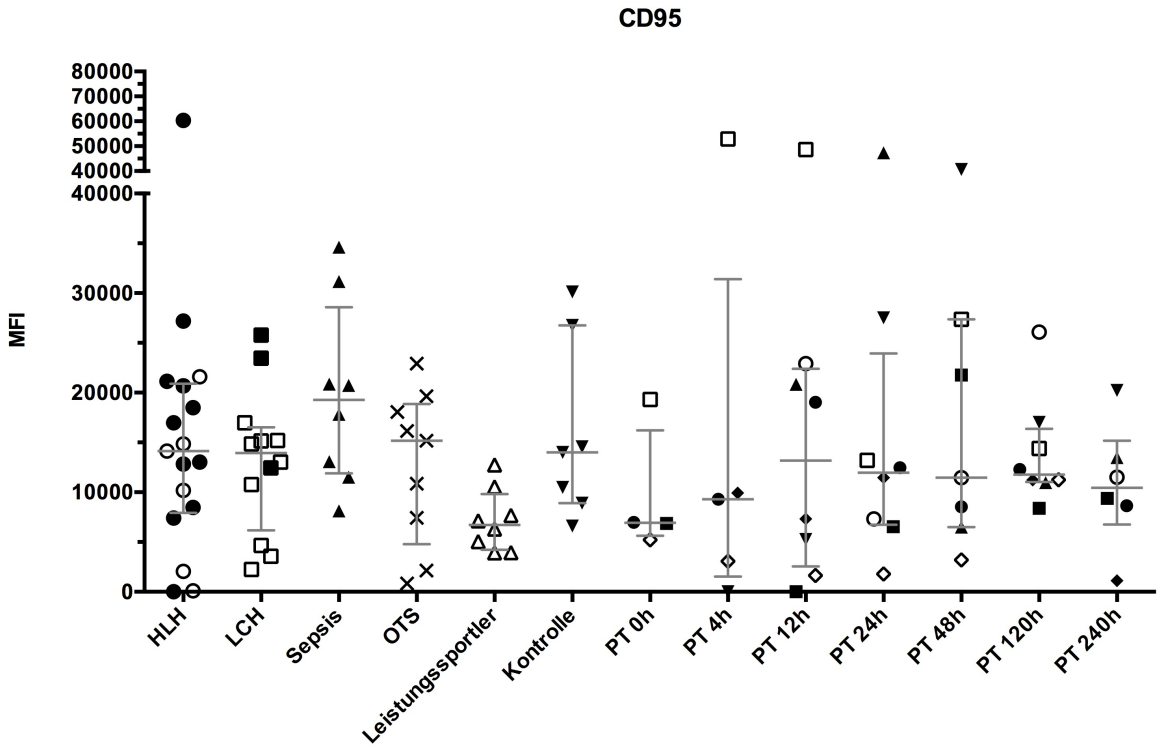


Abbildung 27: CD95-Messwerte der Blutanalyse. x-Achse: Gruppeneinteilung (HLH: Hämophagozytische Lymphohistiozytose, LCH: Langerhanszellhistiozytose, OTS: Overtrainingsyndrom, PT: Polytrauma zu sieben Messzeitpunkten nach Traumaereignis.) Y-Achse: MFI: mean fluorescent intensity bzw. CD95-Expressionsdichte auf Monozyten. Dargestellt sind Mediane und Interquartilsabstand. In den Gruppen HLH und LCH entsprechen die ausgefüllten Symbole den Patienten unter Therapie. In den Polytraumagruppen entspricht ein Symbol einem Patienten.

## 3.5. OTS vs. Leistungssportler

Beim Vergleich der kranken mit den gesunden Leistungssportlern fallen bei folgenden Oberflächenantigenen Unterschiede auf:

### 3.5.1. CD95%

Der Anteil CD95-positiver Zellen ist bei den Overtrainingsyndrompatienten mit einem Median von 97 signifikant höher als bei der entsprechenden Kontrollgruppe (Median= 91) (p=0,0012) (Abb. 14).

### 3.5.2. CD11b MFI

Mit Werten von 13275 vs. 91896 ist die Expression von CD11b bei den OTS-Patienten deutlich geringer (p=0,00008) als bei den Leistungssportlern und entspricht der Werteverteilung in der Gruppe der Normalspender. Die Leistungssportler ähneln mit ihren hohen Expressionswerten einer Population der LCH-Gruppe und einigen Polytraumapatienten (Abb. 15).

### 3.5.3. CD64 MFI

Alle Patienten weisen eine erhöhte Expression von CD64 auf (p=0,00058), sieben der neun Patienten zeigen als Gruppe die höchste Expression aller untersuchten Proben. In der Leistungssportlergruppe, die mit einem Median von 106 deutlich unter der OTS-Gruppe (15174) liegt, hebt sich ein Patient (6) deutlich ab und zeigt Expressionswerte wie die OTS-Gruppe (Abb. 6).

## 3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

### 3.6.1. Vergleich der Patientengruppen mit der gesunden Kontrolle

Die HLH-Patienten unterscheiden sich von der Kontrollgruppe vor allem durch eine deutlich erhöhte Expressionsdichte von CD16. Die breite Streuung der Werte schränkt die Aussagekraft der Ergebnisse für CD4, HLA-DR und CD14 ein. Im Vergleich der LCH-Patienten mit der Kontrollgruppe ergeben sich keine signifikanten Unterschiede, jedoch lassen sich bei einigen Oberflächenantigenen Subpopulationen herausarbeiten, die im Expressionsmuster den anderen Krankheitsbildern ähneln. Die Sepsispatienten fallen durch stark erniedrigte Werte von CD4, sowohl %gated als auch MFI, auf. Auch die Prozentwerte von HLA-DR und CD95 sind erniedrigt, sowie die Expressionsdichte von CD14, CD45 und CD64.

### 3.6.2. Ergebnisse der Polytrauma-Gruppe

Im monozytären Oberflächenexpressionsmuster zeichnen sich auch die Patienten nach Polytrauma durch niedrige %- und MFI-Werte von CD4 aus. Die Expressionsdichte von CD16 und CD64 ist zu allen gemessenen Zeitpunkten höher als in der Kontrolle. Außerdem fallen erhöhte Werte bei CD11b-MFI auf. Im Vergleich zur Sepsisgruppe ist die Expressionsdichte von CD11b, CD16, CD45, CD64 und HLA-DR höher. Zu vereinzelten Zeitpunkten im posttraumatischen Verlauf lässt sich in der Traumagruppe ein Abfall von HLA-DR% und MFI erkennen, zudem ein Abfall von CD11b% und MFI sowie CD163-MFI. Ein Anstieg der Werte ist bei CD16-MFI und CD45-MFI im Vergleich 24h versus 240h festzustellen. Gemäß dem SAPS 3 Score sind die Polytrauma-Patienten 4, 5, 7 und 8 am schwersten erkrankt und haben entsprechend dem SOFA-Score das höchste Ausmaß an Organdysfunktion. Im Verlauf entwickelten diese Patienten eine schwere Sepsis bzw. einen septischen Schock.

### 3.6.3. Vergleich der OTS-Patienten mit den Leistungssportlern

Die Patienten mit OTS unterscheiden sich von der Gruppe der Normalspender durch eine erhöhte Expressionsdichte von CD64 und niedrigere Prozentwerte von CD16. Bei den Leistungssportlern waren die Prozentwerte und MFI von CD95 niedriger, die Expressionsdichte von CD11b, CD45 und CD64 höher als bei den Normalspendern. Beim Vergleich Leistungssportler vs. OTS zeigten die Patienten höhere Werte bei CD95-%-gated und CD64-MFI, niedrigere Werte bei CD11b-MFI.

# 4. Diskussion

## 4.1. Oberflächenmarkerexpression der Patientengruppen im Vergleich zur Kontrolle

### 4.1.1. CD4

Bei den Gruppen HLH, Sepsis und Polytrauma konnte ein im Vergleich zur Kontrolle verringerter Anteil CD4-positiver Zellen festgestellt werden, bei Letzteren beiden auch eine verringerte Expressionsdichte. Über die Bedeutung von CD4 auf Monozyten ist bisher nur wenig bekannt, es gibt jedoch einige Hinweise, dass Funktionen von Monozyten und Makrophagen wie die Bindung von Immunglobulinen und Antigen-Antikörperkomplexen unter anderem über ihre CD4 Rezeptoren vermittelt werden [93, 136]. CD4 auf Antigenpräsentierenden Zellen interagiert mit HLA-DR auf T-Zellen und führt zu einer erhöhten Aktivität dieser Zellen und dadurch zu einer Stimulierung des adaptiven Immunsystems. Bei CD4-negativen Monozyten ist die Fähigkeit zur Antigenpräsentation verringert [194]. Ein Ligand von CD4 ist das proinflammatorische Zytokin IL-16, dessen chemoattraktive Funktion von der CD4-Expression auf der Zielzelle abhängt [42]. Neben der Rekrutierung an Entzündungsorte induziert IL-16-Bindung bei Monozyten außerdem die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1β, TNF-α und IL-6 [133]. Bei kultivierten Makrophagen führte eine Stimulation mit IL-1β, TNF-α und IFN-γ zu einer down-regulation von CD4 [88, 170]. Auch LPS führte zu einer Verringerung der CD4-Expression, die aus der endogenen, LPS-induzierten Produktion von TNF-α und IL1-β resultierte und mit einer Induktion von Aktivitätssignalen einherging. Antiinflammatorische Mediatoren wie IL-10 hatten keinen Einfluss auf die CD4-Expression [88]. Die verminderte Anzahl CD4-positiver Zellen bei HLH-Patienten könnte auf die Hyperzytokinämie und Freisetzung von TNF-α, IL-1β und besonders IFN-γ aus aktivierten Monozyten selbst zurückzuführen sein. Auch bei Sepsis und Trauma kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung dieser Zytokine, außerdem könnte besonders in der Sepsisgruppe LPS an der Herunterregulierung von CD4 beteiligt gewesen sein. Besonders auffällig war die deutlich geringere Expression von CD4 in der Traumagruppe zu allen gemessenen Zeitpunkten. Die Expression von CD4 auf Monozyten von Polytraumapatienten wurde zum jetzigen Zeitpunkt nur in einer Studie untersucht [99]. Kampalath et al. fanden neben einer verringerten HLA-DR-Expression ebenfalls eine signifikante Reduktion der Anzahl CD4-positiver Monozyten sowie der Expressionsdichte (MFI) bei Polytraumapatienten. Die Autoren hatten in einer anderen Studie eine erniedrigte monozytäre Expression von CD4 im Nabelschnurblut festgestellt und das

Ergebnis mit der reduzierten Immunfunktion bei Neugeborenen in Verbindung gebracht [100]. Aus ihren Ergebnissen schlossen sie, dass CD4, ähnlich wie HLA-DR, bei verringerter Expression zu erhöhter Infektanfälligkeit beitragen könnte. Die Modulation der CD4-Expression durch LPS und proinflammatorische Zytokine weist auf eine Rolle des Moleküls in inflammatorischen und infektiösen Prozessen hin. Durch die Beteiligung von CD4 in Antigenbindung, Chemotaxis und T-Zellaktivierung könnte eine erniedrigte Expression zu einer verminderten und ungenügenden Immunantwort mit der Gefahr von Infektionen infolge von Trauma oder systemischer Inflammation im weiteren Sinne beitragen.

### 4.1.2. CD11b

Neben den erniedrigten CD4-Werten war die erhöhte Expressionsdichte von CD11b eines der auffälligsten Ergebnisse in der Polytraumagruppe. Die CD11b-MFI war zwischen null und 24 Stunden und zum Zeitpunkt 120 Stunden deutlich höher als in der Kontrollgruppe, verglichen mit früheren Messzeitpunkten (zwölf und 24 Stunden) waren die Werte im weiteren Verlauf (48 Stunden) jedoch niedriger (cf. 4.3.2). Verschiedene Faktoren tragen nach einem Trauma zu einer Leukozytenaktivierung bei. Durch Ischämie kommt es zu einer vermehrten Aggregation und Aktivierung von Leukozyten in den betroffenen Arealen [183]. Die Endotheladhäsion und Vernetzung der Zellen untereinander ist abhängig von Zelladhäsionsrezeptoren, insbesondere Integrinen wie CD11b/CD18. Durch Bindung an Adhäsionsmoleküle befähigen sie die Monozyten zur transendothelialen Migration, die ein entscheidender Schritt in der Rekrutierung zirkulierender Zellen an Entzündungsorte und Initiierung der Immunantwort auf Gewebeschaden und Inflammation ist. Proinflammatorische Mediatoren, die bei einem Trauma massiv freigesetzt werden, begünstigen durch eine Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen die Leukozyten-Endothel-Interaktion: CD11b wird durch die Wirkung von TNF-α, IL-8 und Chemokinen wie MCP (macrophage chemoattractant protein) vermehrt auf Monozyten exprimiert. Der Kontakt an Endothel führt, vermutlich über CD11b, wiederum zur Chemokinfreisetzung aus Monozyten. Dadurch werden auch andere Leukozyten wie beispielsweise aktivierte T-Zellen angelockt, die in vitro über Bindung an CD11b eine erhöhte Transkription von IL-1β induzieren konnten [167]. Auch inflammatorische Mediatoren, die direkt im hypoxischen Gewebe freigesetzt werden, können zu einer Aktivierung von Monozyten führen, die sich in der Hochregulation von CD11b widerspiegelt [163]. Scannell et al. untersuchten Adhäsionsmoleküle auf Leukozyten bei Traumapatienten und die Wirkung von in vitro induzierter Hypoxie auf deren Expression [14]. Dabei fanden sie, wider

Erwarten, nach Trauma eine erniedrigte Expression von CD11b auf Monozyten, die sich dadurch erklären ließe, dass sich die aktivierten Monozyten im Kapillarbett ansammelten und somit im peripheren Blut nicht mehr nachweisbar waren. In vitro Hypoxie führte hingegen zu einer vermehrten Expression von CD11b auf Monozyten. Andere Studien wiesen eine erhöhte Expression auf Monozyten nach Ischämie-Reperfusion im Rahmen abdomineller Aortenchirurgie oder Koronarangioplastie nach [151, 163].

CD11b ist nicht nur für die transendotheliale Migration bedeutend. Es fungiert zudem als Signaltransduktionsmolekül für Chemotaxis und Phagozytose und kann mit anderen Rezeptoren wie z.B. Fc-Rezeptoren, TLR oder CD14 (cf. 4.1.3.) assoziieren. Der Komplex aus CD11b und CD14 konnte in vitro den respiratory burst von Monozyten vermitteln und bindet LPS [71, 156]. In diesem Zusammenhang wurde eine vermehrte CD11b-Expression auf Monozyten von Patienten mit Sepsis bzw. septischem Schock im Vergleich zu Gesunden beschrieben [30, 146]. Eine Sepsis in unterschiedlichen Ausprägungsformen wurde auch bei manchen Patienten der Gruppe Polytrauma diagnostiziert. In der Sepsisgruppe fanden wir überraschenderweise keine erhöhte Expression von CD11b. Es könnte jedoch auch hier sein, dass die CD11b-positiven Zellen bereits ins Gewebe transmigriert waren und darum im peripheren Blut nicht mehr detektiert werden konnten oder die Patienten im Stadium der Immunparalyse unter einer Leukopenie litten. In diesem Fall würde man auch erniedrigte Werte bei dem „Monozytenmarker“ CD14 erwarten.

### 4.1.3. CD14

Bei den Sepsispatienten konnte eine im Vergleich zur Kontrolle erniedrigte Expression von CD14 nachgewiesen werden, ebenso bei den HLH-Patienten. CD14 spielt als pattern recognition receptor eine Rolle in der Erkennung und Neutralisierung von LPS und anderen Bakterienbestandteilen. Die Bindung des Komplexes aus LPS und LPS-bindendem Protein (LBP) führt zur Aktivierung der Monozyten und Freisetzung von TNF-α und Interleukinen, wobei TNF-α selbst wiederum die Expression von CD14 verstärkt [222]. Glucocorticoide, Katecholamine und Zytokine wie IFN-γ, TGF-β, IL-4 und IL-13 können zu Herunterregulierung von CD14 führen [113, 222]. Nach LPS-Stimulation kommt es zunächst zu einer Hochregulierung der CD14-Oberflächenexpression [131]. Sind die Zellen längere Zeit einem inflammatorischen Stimulus wie LPS ausgesetzt, entsteht eine „Endotoxin-Toleranz“ und die Zellen reagieren auf einen zweiten inflammatorischen Reiz mit verringerter Zytokinproduktion. Diese Beobachtung ist bei Patienten mit Sepsis der Fall und korreliert mit dem Schweregrad der Sepsis und dem

klinischen Verlauf [14]. Eine verringerte membranöse (m)CD14 Expression kann dabei einer der Gründe für LPS-Hyporesponsivität sein [103]. LPS kann direkt über Inhibition der mRNA-Transkription zu einer verringerten CD14-Expression führen [11]. Der Verlust des Rezeptors kann z.B. durch Ablösung (shedding) von der Membran mit Freisetzung der löslichen Form sCD14 bedingt sein [11], des Weiteren kann es durch Internalisation nach Ligandenbindung zu einem Verschwinden von der Zelloberfläche kommen [108]. Die Ursache des Rezeptorverlustes in unseren Patientengruppen kann nicht bestimmt werden, da die lösliche Rezeptorform nicht gemessen wurde. Es könnte auch sein, dass die verringerten MFI-Werte durch eine Konformationsänderung des Rezeptors nach LPS/LBP-Bindung und somit verringerter Bindung des farbstoffgekoppelten Antikörpers zustande kamen. Unabhängig vom zugrundeliegenden Mechanismus stimmen unsere Ergebnisse einer verringerten CD14-Expressionsdichte bei Sepsispatienten mit zahlreichen Studien überein [19, 30, 61, 178]. Bei Sepsipatienten ist sCD14 erhöht und dient ebenfalls dem Abfangen von LPS [29]. Durch diesen Komplex können auch CD14-negative Zellen wie Endothelzellen LPS-abhängig aktiviert werden [4]. Verringerte monozytäre CD14 Expression tritt nicht nur im Rahmen einer Sepsis auf, sondern wurde auch unter anderen immunsuppressiven Bedingungen beschrieben, z.B. nach Operationen oder Trauma [85, 103]. Dies konnten wir in unserem Polytrauma-Kollektiv jedoch nicht feststellen und auch andere Autoren fanden trotz Verringerung der LPS-Reaktivität und proinflammatorischen Zytokinproduktion durch Monozyten keine Erniedrigung der CD14-MFI bei Traumapatienten [107]. Scherberich et al. beschrieben eine verringerte mCD14-Expression bei Dialysepatienten und außerdem eine Zunahme von sCD14 bei Patienten mit chronischen inflammatorischen Erkrankungen wie systemischem Lupus erythematodes (SLE) oder systemischer Vaskulitis [178]. Dementsprechend könnte auch die systemische Entzündungsreaktion bei HLH zu einem Anstieg des löslichen CD14 führen, der wiederum den Abfall der membranösen Expression erklären würde. Leider wurde sCD14 in unseren Patienten nicht bestimmt, sodass sich nur Vermutungen über die Ursache der verringerten Expression anstellen lassen.

### 4.1.4. CD16

Wir fanden bei den HLH-Patienten und bei den Polytraumapatienten zu allen gemessenen Zeitpunkten eine deutlich erhöhte Expressionsdichte von CD16. CD16 gehört zu den Fcγ-Rezeptoren und spielt eine wichtige Rolle in der ADCC, indem es IgG-opsonierte Partikel phagozytiert und die Endozytose von Immunkomplexen initiiert, die dann über HLA-DR an T-Zellen präsentiert werden [76]. Monozyten werden anhand ihrer Expression von

CD14 und CD16 in drei verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften unterteilt. CD16-positive Monozyten produzieren infolge von TLR-Ligandenbindung mehr TNF-α und IL-1β und weniger IL-10 als CD16-negative Monozyten [21, 217] und werden darum auch als „proinflammatorische“ Monozyten bezeichnet. Außerdem weisen CD16-positive Monozyten durch zusätzliche Expression von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen eine erhöhte Endothelaffinität auf [9, 191]. Im Mausmodell konnte mittels Intravitalmikroskopie und Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass Monozyten, die dem CD16-positiven Monozytensubset im Menschen entsprechen (Gr1-), am Gefäßendothel entlang-“krabbeln“, vermutlich um Inflammationszeichen oder Endothelschäden zu entdecken und dann in das geschädigte Gewebe zu migrieren [15]. Cros et. al beschrieben, dass humane CD16+ Monozyten genetisch diesem Monozytensubset in Mäusen ähneln und nach Transfektion in Mäuse ebenfalls das Endothel von Blutgefäßen „patrouillierten“. Die These des patrouillierenden Verhaltens CD16-positiver Monozyten wird auch durch in vitro Experimente unterstützt, die zeigten, dass sie beweglicher sind als CD16-negative [164, 218]. Somit scheinen vor allem CD16-positive Monozyten an der Transmigration zu Entzündungsorten beteiligt zu sein. Auch beim Menschen wurden endothelständige CD16+ Monozyten gefunden, die vermutlich durch Katecholamine aus dem Marginalpool mobilisiert werden können: Es gibt Hinweise, dass Katecholamine die Expression von Adhäsionsmolekülen verringern, wodurch sich die Zellen vom Endothel lösen und vermehrt der Zirkulation zugeführt werden [69]. Bei Ausdauersportlern wurde unmittelbar nach dem Training eine Expansion von CD16+ Monozyten festgestellt und auf den erhöhten Katecholaminspiegel bei sportlicher Betätigung zurückgeführt. Durch β-Blocker konnte die Mobilisierung gehemmt werden und es kam zu einer Abnahme der CD16-positiven Population im peripheren Blut [191]. Dementsprechend könnte auch bei den Polytraumapatienten der erhöhte Katecholaminspiegel ein Grund für die erhöhten CD16-Werte sein. Allerdings fanden wir eine Erhöhung nicht im Anteil der positiven Zellen sondern in der Expressionsdichte. Da CD16 und CD14 nicht gleichzeitig in einem Ansatz gemessen wurden kann nur indirekt auf die Veränderung der Monozytensubpopulationen geschlossen werden und man kann nur vermuten, dass die stark CD16-positiven Zellen eine Expansion des CD16++-Subsets widerspiegeln; die scheinbar nicht erhöhte Anzahl der positiven Zellen im peripheren Blut könnte auf das besondere Migrations- und Adhäsionsverhalten der CD16-positiven Monozyten und somit ihre Extravasation zurückzuführen sein. Auch Operationen stellen ein Trauma dar. Bei Patienten nach kardiochirurgischen Eingriffen mit extrakorporaler

Zirkulation wurde ein Abfall der CD16-Expressionsdichte zu den Zeitpunkten zwei und vier Stunden nach Anschluss der extrakorporalen Zirkulation, gefolgt von einem Anstieg an den Tagen eins bis drei nach der Operation, festgestellt. Nach sechs Tagen entsprachen die Werte wieder den präoperativ gemessenen. Eine ähnliche Tendenz wurde auch bei Patienten nach Lungenteilresektion beobachtet [188], somit scheint die Immunantwort auf Trauma und Stress eine erhöhte CD16-Expression zu bewirken. Dies ließe sich, neben oben genannten Mechanismen, auf die Wirkung von Zytokinen zurückführen. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass durch Gewebeschaden aktivierte Thrombozyten TGF-β freisetzen und dies wiederum die Expression von CD16 auf Monozyten induziert [160]. Zahlreiche Studien beschreiben zudem eine Expansion von CD16-positiven Monozyten bei Patienten mit Infektionen und inflammatorischen Erkrankungen, z.B. Rheumatoider Arthritis, Patienten mit fremdkörperassoziierten Infektionen oder Patienten mit Sepsis [61, 102, 178]. Letztere Beobachtung konnten wir in unserem Kollektiv nicht finden. Auch bei HLH wurde eine hohe CD16-Expression auf Monozyten beschrieben [55, 195]. Die CD16-exprimierenden Zellen produzieren vermehrt inflammatorische Zytokine wie IL-1β, IL-6 oder TNF-α [21, 41], was eine Beteiligung bei der Entstehung der für die HLH typischen Hyperinflammation nahelegt. Da jedoch die Expression von CD16 selbst zytokinabhängig ist [62], wäre es auch möglich, dass die Hyperzytokinämie vor der Expansion proinflammatorischer Monozyten steht und diese erst induziert. Nicht nur aufgrund ihrer Zytokinproduktion sondern auch durch ihre vermehrte Phagozytoseaktivität [178] könnten CD16-exprimierende Monozyten eine Rolle in der Pathogenese der HLH spielen. In jedem Fall könnte die CD16-Expression bei HLH als zellulärer Indikator für die Krankheitsaktivität dienen und als Verlaufsparameter während immunsuppressiver Therapie verwendet werden [195].

### 4.1.5. CD45

Wir haben bei den Sepsispatienten eine verringerte Expression von CD45 festgestellt. CD45 spielt eine Rolle in der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung und ist auf allen Leukozyten zu finden. Bei Monozyten induziert CD45 zudem die Produktion von TNF-α und IL-1 [84, 215]. CD45 kann durch Dephosphorylierung auch nachfolgende Signalkaskaden aktivieren und zu einer generellen Erhöhung von Tyrosin-Phosphorylierungssignalen in einer Zelle führen [16]. Die Vernetzung von CD45-Molekülen führt außerdem zu verstärktem respiratory burst von Monozyten infolge GM-CSF-, TNF-α- und LPS-Bindung an Zytokinrezeptoren [123]. CD45 kann also als Aktivierungsmarker angesehen werden. Eine erhöhte Expression von CD45 bei Patienten

mit Koronarektasie lässt auf eine Rolle in Endothelaktivierung und Inflammation schließen [221], dementsprechend würde man auch bei Sepsis mit erhöhten Werten rechnen. Die Expression von CD45 ist am höchsten auf reifen Zellen. Die niedrigen MFI-Werte bei unseren Sepsispatienten könnten darauf zurückzuführen sein, dass die reifen, aktivierten Monozyten aufgrund chemotaktischer Reize in entzündetes Gewebe eingewandert sind und im peripheren Blut nur wenige oder noch unreife Monozyten zirkulierten. Dafür sprechen auch ein geringer Anteil CD14-positiver Zellen (nicht abgebildet) und die Ergebnisse der CD64-MFI-Auswertung.

### 4.1.6. CD64

Bei den Patienten der Polytraumagruppe war die CD64-Expression im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht, bei den Sepsispatienten hingegen deutlich niedriger. CD64 wird auf Monozyten konstitutiv exprimiert und vermittelt als Rezeptor für Immunglobulin G die Phagozytose von IgG-opsonierten Antigenen und Immunkomplexen. Bei Krankheiten, bei denen Immunkomplexablagerungen eine Rolle spielen, wie zum Beispiel SLE, dient CD64 als Surrogatmarker für Monozytenaktivierung und Krankheitsaktivität [121]. Die Ligandenbindung führt zu einer weiteren Aktivierung von Phagozytose bzw. ADDC. CD64 zählt zu den aktivierenden Fcγ-Rezeptoren, d.h. durch eine vermehrte Expression wird die Aktivierungsschwelle von Monozyten herabgesetzt. Nach Bindung von IgG kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF-α. Diese führen zu einer Stimulation und Persistenz der Immunantwort [165]. CD64 spielt als Aktivierungsmarker also eine wichtige Rolle für eine ausreichende Immunabwehr. Studien haben gezeigt, dass es bei Infektionen und Sepsis zu einer erhöhten Expressionsdichte von CD64 kommt [18, 44, 146, 150] die positiv mit einem günstigen Verlauf und Überleben korreliert [44]. Eine zu niedrige Expression könnte zu einer ungenügenden Pathogenabwehr führen und das Risiko für Komplikationen erhöhen [48]. Die auffallend niedrigen Werte in unserer Sepsisgruppe könnten auch auf eine fehlerhafte Bindung des fluoreszenzmarkierten Antikörpers zurückzuführen sein oder darauf, dass die aktivierten, CD64-exprimierenden Monozyten in entzündetes Gewebe eingewandert sind und deswegen im peripheren Blut nicht mehr nachweisbar waren. Bis auf zwei Patienten fiel die Sepsisgruppe durch einen niedrigen Anteil CD14-positiver Zellen auf, was auf eine Monozytopenie hinweist. Eine Studie mit 56 intensivpflichtigen Kindern untersuchte CD64 als Marker zur Unterscheidung von SIRS mit oder ohne Infektion. Man fand bei Kindern mit Sepsis eine höhere monozytäre Expressionsdichte als bei Kindern mit nichtinfektiösem SIRS [79]. Dieser Unterschied konnte bei unseren Polytraumapatienten

nicht festgestellt werden (cf. 4.3.3). Ähnlich wie bei einer Sepsis könnte auch bei Polytraumapatienten ohne Sepsis eine hohe CD64-Expression wichtig für eine ausreichende Immunantwort und Überwindung der systemischen Inflammation sein. Li et al. zeigten bei Patienten mit SLE, dass eine erhöhte CD64-Expression auf Monozyten mit einem verstärkten Migrationsverhalten nach LPS- bzw. CRP-Stimulation einherging [121]. CD64 könnte somit dazu beitragen, aktivierte Monozyten zu Orten der Gewebeschädigung zu dirigieren. Dies ist einerseits wichtig für die Pathogenabwehr und Resolution von Entzündungen, andererseits kann eine übermäßige Entzündungsantwort das Gewebe sogar noch mehr schädigen. Es kommt somit auf das Gleichgewicht von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren im Rahmen der Immunreaktion auf Trauma an. Die Wirkung der beteiligten Zytokine ist pleiotrop und beeinflusst auch Funktion und Phänotyp von Immunzellen. Die Expression von CD64 wird z.B. durch IL-10, IFN-γ und GM-CSF hochreguliert [59, 152, 198], IL-4 und IL-13 verringern hingegen die Rezeptordichte [198]. Die Immunveränderungen bei CARS sind teilweise IL-10-vermittelt. IL-10 kann bereits wenige Stunden nach Trauma im Blut nachgewiesen werden [148]. Es hemmt die Antigenpräsentation über Monozyten durch Unterdrückung der HLA-DR-Expression (cf. 4.1.8) und fördert die Phagozytoseaktivität u.a. über Induktion von CD64 [198]. Um den hier zugrundeliegenden Mechanismus der erhöhten Expression von CD64 in der Traumagruppe zu erklären, hätten zusätzlich Zytokine bestimmt werden müssen.

### 4.1.7. CD95

Als Apoptoserezeptor induziert CD95 (Fas) nach Ligandenbildung (z.B. TNF-α, CD95L) eine Signalkaskade, die im programmierten Zelltod mündet. Apoptose ist ein Mechanismus, der zur kontrollierten Beendigung einer Immunantwort führt. Die Bindung von PAMPs (z.B. LPS) führte im Mausmodell zu einer Hochregulation CD95 auf Makrophagen und erhöhte deren Empfindlichkeit für Fas-Liganden und konsekutive Apoptose [66]. Mittlerweile gibt es zahlreiche Hinweise, dass CD95 auch Zellaktivierungssignale vermitteln kann [154]. Fas-Bindung an Monozyten in vitro führt zu einer Zytokinausschüttung (u.a. TNF-α, IL-8, IL-1β), die eine akute Entzündungsreaktion und Gewebeschaden herbeiführen kann. Diese proinflammatorische Zytokinantwort ist unabhängig von der Funktion als Apoptoserezeptor und bedingt durch den Reifegrad der Zelle. Durch Aktivierung von Makrophagen über diesen Signalweg kann es zu Initiierung und Unterhaltung von Entzündungen kommen und CD95 eventuell zur Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen beitragen [153]. Durch die Untersuchung von CD95 erhofften wir uns Rückschlüsse auf den Beitrag von Monozyten zur Inflammation durch

CD95-vermittelten Zytokinproduktion und auf die Regulation von Monozyten unter inflammatorischen Bedingungen, da ein Verlust von Monozyten (und anderen Leukozyten) durch Apoptose zur Immunsuppression beitragen könnte. Wir konnten jedoch in keiner Patientengruppe einen Unterschied zur gesunden Kontrolle feststellen, lediglich zum Zeitpunkt vier Stunden wiesen die Polytraumapatienten eine erhöhte Expression auf. Andere Studien zeigten eine erhöhte Serum-Konzentrationen von CD95 bei Patienten mit schwerer Sepsis im Vergleich zu anderen Sepsispatienten, jedoch nicht im Vergleich zu Gesunden. Der sCD95-Spiegel korrelierte mit der Höhe des SOFA-Scores und war bei den Patienten, die überlebten niedriger, wobei im Verlauf der Rekonstitution ein Abfall beobachtet werden konnte [47].

### 4.1.8. CD163

CD163 ist ein Scavenger-Rezeptor, der Hämoglobin im Komplex mit Haptoglobin bindet und internalisiert, wodurch antiinflammatorische Zytokine freigesetzt werden [111, 175]. Die Bindung von Bakterien führt hingegen zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [57]. Die Expression von CD163 wird durch IL-6, IL-10 und Glucocorticoide verstärkt [206, 214], proinflammatorische Mediatoren wie IFN-γ, LPS oder TNF-α führen dagegen zu einer Unterdrückung der CD163-Expression [31]. Fcγ-Rezeptor-Vernetzung, LPS-Bindung an TLR oder oxidativer Stress können zu einer Ablösung der membrangebundenen Form mCD163 führen [139]. Dem folgt ein Anstieg der Serumkonzentration des löslichen Rezeptors [46], wie sie z.B. bei inflammatorischen Erkrankungen wie reaktivem Hämophagozytischem Syndrom [177], schwerer Sepsis [72] oder Bakteriämie beobachtet werden konnte. Bei letzterer korrelierte die sCD163-Konzentration mit einem ungünstigen klinischen Verlauf [73, 140]. Die lösliche Rezeptorform, die als Marker alternativ-aktivierter, antiinflammatorischer Makrophagen gilt [138], wurde von uns leider nicht untersucht, aber man hätte bei verringerter mCD163-Expression eventuell auf Rezeptorverlust infolge inflammatorischer Stimuli schließen können. Durch die Funktion als Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor würde man hingegen eine erhöhte Expression nach Bluttransfusionen erwarten. Einige der Polytrauma-Patienten hatten nach Einlieferung Blutprodukte erhalten und auch HLH-Patienten erhalten durch HLH-induzierte Anämien häufig Erythrozytenkonzentrate. Es zeigten sich jedoch im Vergleich zur Kontrolle wider Erwarten bei keiner Patientengruppe signifikante Unterschiede.

### 4.1.9. HLA-DR

In der Sepsisgruppe waren sowohl die Prozentwerte der HLA-DR-positiven Zellen als auch die Expressionsdichte niedriger als in der Kontrollgruppe, ebenso bei den Polytraumapatienten zu zwei bzw. drei Zeitpunkten. Bei den HLH-Patienten war nur der Anteil HLA-DR positiver Zellen erniedrigt. HLA-DR ist ein MHC-Klasse-II-Molekül, das auf 90% der Monozyten exprimiert wird und eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation an Lymphozyten spielt. Durch eine verringerte Expression kommt es somit zu unzureichender Aktivierung des spezifischen Immunsystems. Bei geringer HLA-DR-Expression ist auch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine auf Stimuli wie z.B. LPS hin reduziert [63, 161]. Die Produktion von HLA-DR wird auf Transkriptionsebene von MHC-class-II-transactivator (CIITA) kontrolliert. CIITA wiederum wird von Zytokinen wie IFN-γ, IL-1 und IL-4 sowie dem DAMP LPS induziert [200]. TGF-β, IL-10, NO und IGF-β hemmen die CIITA–Transkription, IL-10 und NO führen außerdem posttranskriptional zu Re-endozytose und zellulärer Sequestration des MHC-Klasse-II [67, 81]. Des Weiteren kann HLA-DR durch shedding von der Zelloberfläche verschwinden [50, 157]. Eine verringerte HLA-DR-Expression gilt als verlässlicher Marker für monozytäre Dysfunktion und Immunsuppression [51, 143, 220]. Die eingeschränkte Funktionsfähigkeit von Monozyten ist maßgeblich an der Pathogenese der Sepsis beteiligt [83, 146]. Zahlreiche Studien belegen einen Zusammenhang zwischen niedriger monozytärer HLA-DR Expression und ungünstigem klinischem Verlauf im Sinne einer Immundepression [50, 52, 126, 142, 158, 203]. Neben der systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) kann es im Rahmen einer Sepsis zu einer anti-inflammatorischen Gegenregulation (CARS) kommen. Niedriges HLA-DR ist mit der CARS-Phase assoziiert, die u.a. dadurch gekennzeichnet ist, dass Zellen gegenüber proinflammatorischen Stimuli refraktär sind. Ein Zytokin der CARS-Phase ist IL-10, das durch posttranslationale Veränderung des HLA-DR-Moleküls zu verminderter Expression führt [67]. Dies wird durch Ergebnisse von Perry et. al bestätigt, die bei Sepsispatienten mehr intrazelluläre als membrangebundene HLA-DR-Moleküle fanden [157]. Das klinische Korrelat für eine derartige Immunparalyse ist ein Versagen des Immunsystems in der Beseitigung einer bestehenden Infektion bzw. ein erhöhtes Risiko für sekundäre Infektionen. Dies zeigten auch Studien mit intensivpflichtigen Patienten nach Trauma [99, 118], größeren Operationen [36] und Verbrennungen [209]. Monozytendysfunktion ist einer der entscheidenden Faktoren für die Immunparalyse nach Trauma. Sie führt zum einen zu verringerter Phagozytose und, durch verminderte Antigenpräsentation, zu einer

ungenügenden Aktivierung des spezifischen Immunsystems. Außerdem werden auf die jeweiligen Stimuli hin weniger proinflammatorische Mediatoren freigesetzt. Antiinflammatorische Mediatoren wie beispielsweise IL-10 überwiegen und führen auf T-Zell-Ebene zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung antiinflammatorischer TH2-Antwort, die die proinflammatorische Monozytenfunktion weiter dämpft [105]. Auch Glucocorticoide, die nach einem Trauma freigesetzt werden, führen zu einer Herunterregulierung von HLA-DR [106, 182] sowie Adenosin, das durch Sympathikusaktivierung ausgeschüttet oder direkt von Immunzellen, die durch Hypoxie in ischämischen Organen metabolischem Stress ausgesetzt sind, freigesetzt werden kann [82, 213]. Eine niedrige HLA-DR-Expression stellt einen prädiktiven Faktor für die Entwicklung septischer Komplikationen nach Trauma dar [99, 203, 209]. Die Überwachung der Immunfunktion mittels HLA-DR-Messung könnte sinnvoll sein, um Patienten mit einem höheren Infektionsrisiko zu entdecken und den richtigen Zeitpunkt für den Einsatz immunmodulatorischer Therapie zu erkennen. Ein Problem in der routinierten klinischen Anwendung ist jedoch die interindividuelle Variation der Expression, die es schwierig macht, einen Schwellenwert festzulegen [201]. Außerdem sollte die Messung nach standardisierten Protokollen durchgeführt werden, wie sie z.B. von Döcke et al. [51] oder Monneret et al. [141] vorgeschlagen wurden.

In vitro kam es durch IFN-γ und GM-CSF zu einer Hochregulation von HLA-DR, gefolgt von einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine [35, 118, 149]. Erste erfolgreiche Anwendungen in der klinischen Praxis sind bereits beschrieben [125, 137, 205]. Die niedrigen Prozentwerte bzw. die unveränderte Expressionsdichte von HLA-DR bei den HLH-Patienten überrascht. Eigentlich würde man erhöhte HLA-DR-Werte erwarten, da IFN-γ einen Großteil zur Hyperzytokinämie beiträgt und dieses Zytokin wiederum die Expression von HLA-DR stimuliert.

### 4.2. Expressionsmuster innerhalb der Gruppen

Die Werteverteilung in den Gruppen gesunde Kontrolle, Leistungssport und Sepsis ist weitgehend homogen. Dies gilt, bis auf eine Streuung bei HLA-DR und CD14, auch für die Gruppe der OTS-Patienten. In der Polytraumagruppe imponierte bei CD16 und CD11b MFI eine große Variation der Werte und es gab einige Ausreißer, die in Kapitel 3 diskutiert werden. Besonders auffällig war die Verteilung bei HLH und LCH. Hier gibt es Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme in immunsuppressiver Therapie befanden. Überraschenderweise ließ sich diesbezüglich kein Unterschied in der Expression

der untersuchten Oberflächenmarker feststellen. Bei beiden Gruppen zeigte sich eine erhebliche Streuung der Werte, die auf unterschiedliche Krankheitsstadien oder Relevanz des untersuchten Markers bei dieser Krankheit zurückzuführen sein könnte. Außerdem ließ sich bei einigen Markern eine Aufteilung der Patienten in zwei Populationen erkennen. In der Gruppe der LCH-Patienten zeigte sich bei CD4, CD14 und HLA-DR eine Population, die sich von der Kontrollgruppe unterschied und der Sepsisgruppe bzw. einer Population von HLH-Patienten ähnelte.

Im Rahmen einer LCH kann es, vermutlich durch in den LCH-Läsionen vermehrt freigesetzte Zytokine, zum Auftreten einer sekundären HLH kommen [60]. Zwei der Patienten (6 und 13) stachen bei allen drei Oberflächenmarkern heraus. Diese Patienten litten beide unter einem schweren Multisystembefall, der in der Vergangenheit wiederholte Zyklen immunsuppressiver Therapie erfordert hatte. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme bestand jedoch keine Therapie und beide Patienten waren klinisch stabil. Die verringerte HLA-DR-Expression könnte durch einen bei diesen Patienten vorhandenen erhöhten IL-10-Spiegel erklärt werden. Außerdem fielen zwei weitere Patienten (1 und 12) sowohl in den HLA-DR-positiven Zellen als auch in der HLA-DR-Expressionsdichte durch niedrige, den Sepsispatienten ähnelnde Werte auf. Für Patient 12 liegen leider keine klinischen Daten vor, bei Patient 1 gab es nach operativer Sanierung eines isolierten Knochenbefalls keinen Anhalt für eine aktive Systemerkrankung. Bei den Patienten, die in der Expression des Monozytenfunktionsmarkers HLA-DR der Sepsisgruppe ähnelten, hätte man eine immunsuppressive Therapie erwartet, infolge derer eine Sepsis oder sekundäre HLH auftreten kann [2]. Bei CD4-MFI fiel auf, dass die Patienten mit Therapie sich nicht in der den Sepsispatienten ähnelnden Population befanden, sondern hohe Expressionswerte wie die Kontrollgruppe zeigten. Die Patienten waren unter immunsuppressiver Therapie klinisch stabil, eine normale CD4-Expression könnte somit auf einen Therapieerfolg hinweisen. In der Pathogenese von LCH-Läsionen spielt u.a. IL-1β eine Rolle [101]. Dieses proinflammatorische Zytokin führt wiederum zu einer CD4-Downregulation [88], wie wir sie auch bei Sepsis und Polytrauma beobachten konnten. Unter immunsuppressiver Medikation würde man außerdem eine verringerte CD14-Expression erwarten [178]. Dies konnten wir nur bei einem der Patienten unter Therapie feststellen (Patient 3). Bei den anderen Patienten mit niedriger CD14-Expression liegen offenbar andere Mechanismen zugrunde. Bei CD11b MFI-Werten hoben sich einige Patienten durch hohe Werte, ähnlich einigen Polytraumapatienten und Leistungssportlern, ab. Die klinische Präsentation war jedoch unterschiedlich: Bei Patient 1 bestand keine Krankheitsaktivität, Patient 2 war unter

immunsuppressiver Therapie, ein Patient litt an Multisystembefall (6) und ein Patient (10) unter progredientem Verlauf mit neu diagnostiziertem Colonbefall.

In der Gruppe der HLH-Patienten zeigte ein Großteil der Patienten ebenfalls ähnlich niedrige Werte von CD4%, HLA-DR%, CD14 MFI wie die Patienten der Gruppe Sepsis, doch auch hier entspricht die Aufteilung in Subpopulationen nicht dem Therapiestatus. Vier Patienten (3, 13, 15, 16) zeigten bei allen dieser Oberflächenmoleküle niedrige Werte. Zwei der Patienten befanden sich in Therapie, bei den anderen beiden war zusätzlich eine Sepsis bzw. LCH bekannt. Ansonsten ließen die uns vorliegenden klinischen Daten bei den einzelnen Patienten keinen Grund für die asymmetrische Datenverteilung erkennen. Da die Symptome der HLH nicht pathognomonisch sind, sondern allgemeine Zeichen für systemische Inflammation darstellen [7, 87, 98], kommt es im klinischen Erscheinungsbild zu einer Überlappung von HLH und Sepsis [33], die wir immunologisch auch bei den o.g. Markern feststellen konnten. Die niedrige CD14-Expression ist ein Zeichen für Immunsuppression und könnte im Fall der HLH-Patienten auch auf immunsuppressive Therapie [178] oder auch auf IFN-γ , ein Zytokin, das bei HLH vermehrt ausgeschüttet wird, zurückzuführen sein [222]. IFN-γ wirkt sich zudem negativ auf die CD4-Expression auf Antigenpräsentierenden Zellen aus [170] und könnte die niedrige Expressionsdichte von CD4 auf den Monozyten der meisten HLH-Patienten erklären.

Trotz unterschiedlicher Ätiologie gibt es Ähnlichkeiten in der klinischen Präsentation von Patienten mit HLH, LCH und Sepsis/SIRS [33, 60, 114]. Eine gestörte Immunregulation führt letztlich zu einem Zytokinsturm, der in einer gemeinsamen Endstrecke mit den typischen Zeichen systemischer Inflammation bis hin zur Organschädigung mündet. Die Parallelen im Expressionsmuster von CD14, CD4 und HLA-DR lassen vermuten, dass es neben den symptomatischen Überlappungen auch phänotypische Gemeinsamkeiten von Monozyten bei HLH-, LCH- und Sepsispatienten gibt.

### 4.3. Auffälligkeiten im posttraumatischen Verlauf

Durch „danger-signale“ (DAMPs) kommt es bei einem schweren Gewebetrauma zunächst zu einer Monozytenaktivierung und Sekretion proinflammatorischer Zytokine, die zum systemic inflammatory response syndrome (SIRS) führen. Dies wird begleitet von einer antiinflammatorischen Reaktion (CARS), die eigentlich das Überschießen der Immunantwort verhindern soll, aber auch zu einer Immunsuppression führen kann[3, 24, 94]. Überwiegt diese Komponente, kommt es zu einer Anergie der Monozyten, die durch verringerte Phagozytoseaktivität und Antigenpräsentation sowie verminderte Expression

proinflammatorischer Zytokine und Überwiegen antiinflammatorischer Mediatoren gekennzeichnet ist [58, 63]. Eine derartige Veränderung der Monozytenfunktion trägt entscheidend zur Immunparalyse nach Trauma bei und geht mit einem erhöhtem Risiko für nosokomiale Infektionen und andere Komplikationen einher [51, 208]. Entscheidend für den posttraumatischen Verlauf ist somit das Gleichgewicht von pro-und antiinflammatorischen Komponenten der Immunabwehr [24], die klinisch schwer zu erfassen sind, jedoch durch den Phänotyp von Immunzellen repräsentiert werden. Um den dynamischen Aspekt der Immunantwort auf Trauma und die Phasen der Monozytenaktivierung bzw. -suppression genauer zu beleuchten, wurden die Oberflächenmarker bei den Polytraumapatienten zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Bei einigen Parametern war das Verlaufsmuster sehr heterogen und ließ keinen Rückschluss auf ähnliche immunologische Abläufe zu. Bei anderen Markern ließen sich die Patienten zumindest in Gruppen einteilen, die scheinbar einem gemeinsamen Muster folgten. Um die Interpretation des Immunphänotyps zu erleichtert erfolgt zunächst die Beschreibung des Patientenkollektivs vor dem Hintergrund der klinischen Merkmale.

### 4.3.1. Score-Werte und klinische Besonderheiten

Die Patienten 1, 2 und 6 hatten einen komplikationslosen Verlauf und wurden bereits nach zwei bzw. drei Tagen von der Intensivstation verlegt. Die ISS-Werte waren bei den Patienten 2 und 6 mit 33 bzw. 27 Punkten vergleichsweise niedrig, bei Patient 1 lag mit 45 Punkten ein schweres Verletzungsmuster vor. Dieser Patient war mit 25 Jahren jedoch der Jüngste der gesamten Polytraumagruppe und lag, wie auch die Patienten 2 und 6, bei den physiologischen Scores SAPS 3, SOFA und Sepsis-Score im unteren Bereich. Patient 6 wurde am Tag zwei nach Trauma zur Versorgung einer Beckenringfraktur re-operiert. In den nachfolgenden Immunphänotypisierungen zeigten sich jedoch überraschenderweise keine Auffälligkeiten die mit einem Zweittrauma assoziiert werden könnten. Bei allen Scores ergaben sich besonders hohe Werte für die Patienten 5,7 und 8. Der Schweregrad des Traumas varriierte in dieser Gruppe zwischen 36 und 51 Punkten im ISS, was auf eine erhöhte Morbidität und Mortalität hinweist. Die Patienten hatten entsprechend dem SAPS-Score bei Aufnahme eine hohe Wahrscheinlichkeit zu versterben und zeigten im Verlauf hohe Werte im SOFA-Score für Organdysfunktion. Antonelli et al. beschrieben eine erhöhte Mortalität für Traumapatienten mit einem SOFA-Score von über fünf Punkten bei Aufnahme [12]. Zudem entwickelten diese Patienten im Verlauf einen septischen Schock. Patient 5 befand sich die ersten Tage im SIRS-Schock bzw. Septischen Schock und fiel durch ein Lungenversagen (acute respiratory distress syndrome, ARDS) ab Tag drei und

eine Wundheilungsstörung auf. Patient 7 hatte mit 51 Punkten den höchsten ISS-Wert. Es zeigte sich bei Zustand nach schwerem Thoraxtrauma ebenfalls eine pulmonale Dysfunktion, die sich ab Tag fünf massiv verschlechterte. Der Patient befand sich ab Tag drei im septischen Schock. Die Häufigkeit eines ARDS steigt mit zunehmendem Schweregrad des SIRS [56] und Atemwegsinfektionen stellen die häufigste Sepsisursache dar [6]. Patient 7 entwickelte an Tag fünf zudem ein akutes Nierenversagen und verstarb an Tag 10 nach Trauma. Patient 8 zeigte einen protrahierten Verlauf, der eine mehrwöchige intensivmedizinische Behandlung erforderlich machte. Die hämodynamische Instabilität des Patienten erforderte Katecholamingabe bis Tag 13, an Tag vier musste der Patient bei zweimaliger Asystolie reanimiert werden, an Tag 10 kam es zu einer Lungenarterienembolie. Die Patienten 3 und 4 lagen bezüglich der Score-Werte zwischen den bereits genannten Verteilungen. Bei beiden Patienten dominierte im Verletzungsmuster ein SHT, es ergab sich ein ISS von 33 (Patient 3) bzw. 38 (Patient 4). Patient 3 verschlechterte sich im Sepsis-Score von einem SIRS zum Zeitpunkt 24h zu einem schweren SIRS zu den folgenden Messzeitpunkten, der SOFA-Score fiel jedoch ab. An Tag 8 wurden die Wirbelkörperfrakturen des Patienten operativ versorgt. In der Immunphänotypisierung lassen sich für den betreffenden Zeitraum zwischen 120h und 240h jedoch keine Besonderheiten erkennen. Bei Patient 4 zeigt sich im Sepsis-Score eine Verschlechterung von einer Sepsis zum Zeitpunkt 120h zur schweren Sepsis bei 240h. Bei diesem Patienten konnte an Tag drei eine pulmonale Infektion als Ursache der Sepsis bestätigt werden. Bei Traumapatienten mit SHT kommt es häufig zu einer Pneumonie [28]. Im SOFA-Score fielen die Werte des Patienten im Verlauf ab, außer dem Nachweis der o.g. Infektion gab es klinisch keine weiteren Auffälligkeiten. Die Patienten zeigen zwar unterschiedliche Verletzungsmuster und Verläufe, lassen sich aber nach klinischen Gesichtspunkten in die beschriebenen drei Gruppen einteilen. Inwiefern sich diese Einteilung auch in der Expression der Oberflächenmarkern widerspiegelt und welche klinischen Erklärungen es für einzelne, auffällige Werte gibt, soll im Folgenden diskutiert werden.

### 4.3.2. CD11b/CD14

Durch proinflammatorische Mediatoren kommt es zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und einer vermehrten Leukozyten-Endothelinteraktion [39]. Das Integrin CD11b befähigt Zellen zur transendothelialen Migration [2], die essentiell für die Beseitigung der Inflammation und die Regeneration des Gewebes ist. Die Expressionsdichte war bei den Traumapatienten im Vergleich zur gesunden Kontrolle zu

fünf von sieben Messzeitpunkten erhöht. Innerhalb der Traumagruppe konnte ein Anstieg der Expression, der auf eine vermehrte Abwanderung der Zellen ins Gewebe hinweist, bei den Patienten 1, 2, 3 und 7 festgestellt werden. Einen Hinweis auf tatsächlich erfolgte Transmigration gibt die Betrachtung der Prozentzahl CD14-positiver Zellen, also der Anzahl von Monozyten im peripheren Blut. Ein Abfall der CD14-positiven Zellen nach dem Zeitpunkt der maximalen CD11b-Expressionsdichte fand sich bei den Patienten 2 und 7. Bei Patient 1 wurde zum Zeitpunkt 240h ein CD11b-Maximum gemessen, der Abfall CD14-positiver Zellen könnte eventuell im späteren Verlauf, für den keine Messwerte mehr vorliegen, folgen. Die Monozytenmigration in geschädigtes Gewebe mittels CD11b scheint also bei den Patienten 2 und 7 (eventuell auch 1) besonders effektiv gewesen zu sein. Bei den Patienten 1 und 2 kam es nach dem Trauma tatsächlich zu einer schnellen Rekonstitution (cf. 4.3.1), Patient 7 hingegen verstarb im Multiorganversagen. Aufgrund eines Nierenversagens erfolgte bei diesem Patienten eine Hämodialyse ab Tag fünf, der hohe CD11b-Wert könnte somit auch auf die Dialyse zurückzuführen sein. Durch Kontakt mit der Fremdoberfläche des Dialysesystems kommt es in der extrakorporalen Zirkulation zu einer Aktivierung der Zellen und nachfolgender Aktivierung des Komplementsystems und vermehrter Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen wie CD11b/CD18 [199]. Zum nächsten Messzeitpunkt fünf Tage später war die CD11b-Expression bei Patient 7 deutlich niedriger, jedoch auch die CD14-Prozentzahl, was wiederum auf eine periphere Monopenie hinweist. Im Fall dieses Patienten waren die Monozyten auch hinsichtlich anderer Funktionen beeinträchtigt (cf. 4.3.5). Bei Patient 8 fiel ein Abfall der CD11b-Expression zwischen 24 und 48 Stunden auf, der nächste gemessene Wert zum Zeitpunkt 120h war wieder höher. Dies ließe sich eventuell durch die Re-Operation zur Versorgung der Beckenringfraktur, also ein Zweittrauma, an Tag zwei erklären. Bei den anderen Patienten bleibt die CD11b-Expression im Verlauf unverändert. Patient 5 fällt durch besonders niedrige Werte auf. Klinische Hinweise auf eine ungenügende Migration von Immunzellen ins Gewebe könnte eine Wundheilungsstörung ab Tag sieben geben, im weiteren Verlauf entwickelte sich eine Fasziitis.

### 4.3.3. CD64

Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe war die CD64-Expressionsdichte bei den Polytraumapatienten zu allen Zeitpunkten erhöht. CD64 zählt ebenfalls zu den monozytären Aktivierungsmarkern und spielt durch Vermittlung von ADCC und Zytokinfreisetzung eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen [165, 174]. Bei Infektionen kommt es also zu einer erhöhten CD64-Expression [18, 44, 90, 146, 150].

Nicht bei allen Polytraumapatienten war zusätzlich eine Infektion vorhanden. Patient 4 erfüllte zu den Zeitpunkten 48h und 120h die Kriterien einer Sepsis, Patient 8 war ab 120h im septischen Schock und die Patienten 5 und 7 zum Zeitpunkt 240h, wobei die Infektion bei Patient 7 bereits ab Tag sieben vorlag. Bei allen Patienten handelte es sich ursprünglich um eine pulmonale Infektion. Danikas et. al untersuchten die CD64-Expression auf Monozyten von Patienten mit schwerer Sepsis einmal innerhalb der ersten 24h nach Diagnosestellung und nochmals zum Zeitpunkt der Entlassung. Die Überlebenden einer Sepsis wiesen eine erhöhte Expression von CD64 auf und, verglichen mit den Werten zum Entlassungszeitpunkt, eine signifikante Herunterregulierung [44]. Bei den Nicht-Überlebenden unterschied sich die Expressionsdichte nicht von der Kontrollgruppe, eine erhöhte Expression könnte also wichtig für eine adäquate Pathogenabwehr sein. In unserem Patientenkollektiv verstarb ein Patient (7) im Multiorganversagen nach septischem Schock, jedoch war die CD64-Expression anfangs eher hoch und fiel im Verlauf auf niedrige Werte ab und entspricht somit nicht den Beschreibungen in dieser Studie. Groselj et al. betrachteten die CD64-Expression unter dem Gesichtspunkt SIRS mit oder ohne Infektion und fanden bei intensivpflichtigen Kindern bei einer Sepsis im Vergleich zum SIRS eine höhere Expression von CD64 auf Monozyten. Diese Beobachtung können wir in unserem Patientenkollektiv ebenfalls nicht teilen. Vier unserer Patienten entwickelten im Verlauf eine Sepsis (cf. 4.3.1), drei der vier Patienten mit Sepsis zeigten tatsächlich zu vereinzelten Messzeitpunkten hohe Expressionswerte. Bei Patient 5 deckt sich der Anstieg der CD64-Expression ab 24h mit der späteren Entwicklung eines septischen Schocks. Patient 8 fällt durch einen hohen Wert zum Zeitpunkt 24h auf, im weiteren Verlauf sinkt die Expressionsdichte jedoch wieder. Bei diesem Patienten konnte ab Tag 5 eine pulmonale Infektion nachgewiesen werden (ARDS). Bei Patient 7 passt der CD64-Verlauf mit einem Abfall zwischen 4 und 12 h und anschließend konstant niedrigen Werte nicht zum Auftreten der Infektion an Tag 7 nach Trauma. Ein Patient mit (schwerer) Sepsis (4) zeigte überraschenderweise über den gesamten Zeitraum vergleichsweise niedrige CD64-Werte, ähnlich den Patienten mit unkompliziertem Verlauf ohne Infektion (1, 2, 6). Bei Patient 2, der ebenfalls keine Infektion hatte, fällt ein vereinzelter Maximalwert zum Zeitpunkt 120h auf. Dies könnte eine immunologische Reaktion auf eine sich klinisch nicht manifestierende Infektion sein, ein Messfehler oder es könnte durch fehlerhaftes „gaten“ mit einzelnen, CD64-positiven Granulozyten im Monozytengate ein falsch hoher Wert zustande gekommen sein.

Einen von Infektion unabhängigen Interpretationsansatz für erhöhte CD64-Expression liefert eine Studie mit kardiochirurgischen Patienten [109]. An Tag eins bis sieben nach OP konnte eine erhöhte CD64-Expression festgestellt werden, wobei die Expression am ersten postoperativen Tag am höchsten war. Scheinbar kommt es nach Kontakt zu DAMPS während dem Trauma der OP schnell zur Hochregulation von CD64, gegebenenfalls bedingt durch klinisch nicht nachweisbare Infektionen, wie eine bakterielle Translokalisation aus dem Darmlumen. Eine erhöhte Expression an Tag eins und drei nach kardiochirurgischen Eingriffen wurde zudem auch für CD163 festgestellt [109].

### 4.3.4. CD163

CD163 ist ein ausschließlich auf Monozyten exprimierter Scavenger-Rezeptor, der u.a. Bakterien bindet [57]. Durch Bindung von LPS an TLR kommt es zu einem Shedding des membranständigen Rezeptors [46] und Anstieg der löslichen Form, den man z.B. bei Bakteriämie beobachten kann [72, 73]. Darum hätte man bei verringerter Oberflächenexpression auf den Kontakt der Monozyten mit Bakterienbestandteilen schließen können. Bei den Polytraumapatienten war die mCD163-Expression jedoch nicht niedriger, sondern in vereinzelten Fällen höher als in der Kontrollgruppe und die Expressionsmaxima lassen sich nicht mit dem Beginn einer Infektion in Verbindung bringen. CD163 dient außerdem zur Beseitigung des potentiell toxischen, proinflammatorischen Hämoglobins. Somit könnte man bei erhöhtem Anfallen von Hämoglobin bei Hämolyse z.B. nach traumatischen Blutungen, Operationen bzw. Bluttransfusionen, oder Resorption von Hämatomen, eine vermehrte Expression erwarten. Alle Polytrauma-Patienten hatten nach Einlieferung Bluttransfusionen erhalten. Patient 1 erhielt innerhalb der ersten 24h eine Massentransfusion bei hämorrhagischem Schock, die CD163-Expressionswerte lagen jedoch, wie auch bei den Patienten 2,6 und 8 durchwegs im Bereich der Normalspender. Lediglich zu den Zeitpunkten 12h (Patient 5), 24 h und 48h (Patient 3) und 120h (Patient 8) fanden sich vereinzelt höhere Werte als in der Kontrollgruppe. Patient 8 hatte ebenfalls bei hämorrhagischem Schock nach Beckenfraktur innerhalb der ersten 24h eine Transfusion erhalten und später bei Anämie nochmals an den Tagen vier und fünf. Somit könnte sich der Anstieg der CD163-Expression mit einem Maximum an Tag fünf durch die Erythrozytentransfusion erklären lassen. Ähnliches gilt auch für Patient 5, der ebenfalls eine Beckenfraktur erlitten hatte und innerhalb der ersten 12h eine Transfusion von 16 Erythrozytenkonzentraten erhalten hatte. Bezüglich einer Hämolyse durch operatives Trauma konnte sich kein zeitlicher Zusammenhang zwischen CD163-Expressionsmaximum und Operation bzw. Re-Operation herstellen lassen. Die

Bindung von Hb:Hp-Komplexen führt zur Freisetzung von antiinflammatorischem IL-10 aus Monozyten, IL-10 führt wiederum zu einer verstärkten CD163-Expression. CD163-positive Makrophagen werden auch als antiinflammatorische Makrophagen beschrieben und spielen eine Rolle in der Wundheilung [138, 176]. Der antientzündliche Effekt von CD163 könnte einen Beitrag zur Dämpfung der systemischen Inflammation leisten. Bei kardiochirurgischen Patienten wurden postoperativ erhöhte Werte gefunden [109, 159] und mit der klinischen Erholung der Patienten in Verbindung gebracht. Betrachtet man den klinischen Verlauf unserer Patienten anhand der Score-Werte, wird dieser Zusammenhang bei zwei Patienten (3, 4) bestätigt. Hier zeigte sich nachfolgend auf das CD163-Maximum ein Abfall der Punkte im SOFA-Score. Bei den Patienten 5 und 7 fand jedoch nach dem CD163-Anstieg keine klinische Besserung statt. Bei den Patienten mit rascher Besserung waren keine Veränderungen in der CD163-Expression aufgefallen. Da viele unterschiedliche Faktoren auf die Expression des Moleküls einwirken und in unserem Kollektiv die lösliche Rezeptorform sCD163 nicht untersucht wurde, können unsere Daten für mCD163 nur eingeschränkt interpretiert werden.

### 4.3.5. HLA-DR

Durch die Präsentation von Antigenen an T-Zellen stellt monozytäres HLA-DR ein Bindeglied zwischen angeborenem und spezifischem Immunsystem dar. Die HLA-DR-Expression wird im Rahmen von Entzündungsreaktionen durch eine Vielzahl von Mediatoren wie IL-10, TNF-α, IFN-γ, Glucocorticoide und Katecholamine beeinflusst [67, 82, 106, 182]. Eine erniedrigte HLA-DR-Expression ist mit der CARS-Phase assoziiert, in der die Zellen refraktär gegenüber proinflammatorischen Stimuli sind [157], und somit einer der Hauptgründe für Immunsuppression nach Trauma [37, 51, 99, 209]. Eine niedrige HLA-DR-Expression nach Trauma ist mit einer schlechten Prognose und der Entwicklung infektiöser Komplikationen assoziiert [36, 50, 142, 203]. Dies zeigten auch Cheron et al. in einer Studie mit 105 Traumapatienten [37]. An den ersten beiden Tagen nach Trauma war die HLA-DR-Expression bei allen Patienten erniedrigt. Die Patienten mit komplikationslosem Verlauf zeigten innerhalb der ersten Woche eine Erholung der HLA-DR-Expression, wohingegen die Werte bei den Patienten, die zwischenzeitlich eine Infektion entwickelten, weiterhin niedrig waren oder sogar noch abfielen. Offensichtlich sind nicht in erster Linie die absoluten HLA-DR-Werte sondern vor allem die Kinetik der Expression und das Ausmaß des Wiederanstiegs für die Immunrekonstitution entscheidend [37, 77, 142]. Auch Lukaszewicz et. al zeigten in einer Studie mit 283 Intensivpatienten, dass eine langsame Erholung der HLA-DR-Expression mit einem höheren Risiko für

sekundäre Infektionen einhergeht [126]. Die Aussagekraft von HLA-DR als Surrogatparameter für die Normalisierung der Monozytenfunktion ist also an die kontinuierliche Messung gebunden. In unserer Patientengruppe konnten wir eine unterschiedliche Entwicklung der HLA-DR-Expression im Verlauf von zehn Tagen feststellen. Eine Erholung der Expression im Sinne einer Immunrekonstitution konnte innerhalb dieses Zeitraums bei der Hälfte der Patienten (1, 3, 4, 6) festgestellt werden. Bei den Patienten 1, 3 und 6 war der Wiederanstieg der Expression besonders deutlich. Diese Patienten zeichneten sich auch durch niedrige Werte im SAPS 3- und SOFA-Score aus und erfüllten die Kriterien eines SIRS ohne zusätzliche Infektion. Bei Patient 4, der ab Tag 3 eine Infektion entwickelt hatte, lässt sich tendenziell auch ein Anstieg der HLA-DR-Expression feststellen, der jedoch im Vergleich zu den anderen Patienten niedrige Werte erreicht. Somit könnte die HLA-DR-Expression trotz der positiven Tendenz noch immer zu niedrig für eine ausreichende Pathogenabwehr gewesen sein. Die anderen Patienten (2, 5, 7, 8) befanden sich, der HLA-DR-Expression nach zu urteilen, zum Zeitpunkt 240h offenbar noch in einem Zustand der Immunsuppression. Besonders Patient 8 fällt durch einen Abfall der HLA-DR-positiven Zellen und eine allgemein besonders niedrige Expressionsdichte auf. Bei diesem Patienten war ab Tag 5 ein ARDS diagnostiziert er befand sich im septischen Schock. Auch die anderen Patienten, die im Verlauf einen septischen Schock entwickelten (Patienten 5 und 7), zeigen eine niedrige bzw. abfallende Expressionsdichte von HLA-DR. Auffällig ist Patient 2, der einen komplikationslosen klinischen Verlauf (SIRS ohne Infektion), aber dennoch niedrige HLA-DR-Werte hatte. Als klinisches Korrelat könnte lediglich eine Operation am Scaphoid an Tag 3 dienen, wobei das Trauma durch diesen Eingriff für eine Auswirkung auf die HLA-DR-Expression zu gering erscheint.

Die Erholung einer anfänglich reduzierten HLA-DR Expression deutet auf eine Erholung von angeborener und indirekt auch zellvermittelter Immunität hin. Zudem kann die HLA-DR-Expression als Verlaufsparameter für immunstimulierende Therapien wie beispielsweise mit G-CSF oder IFN-γ dienen [125, 137, 205].

### 4.4. Ähnlichkeiten im Expressionsmuster von Polytrauma, Sepsis und HLH

Die initiale Phase der Immunantwort auf Trauma und Infektion ist durch Hyperimmunität (SIRS) gekennzeichnet. Bei intakter Funktion des Immunsystems und fehlenden Komplikationen kommt es anschließend idealerweise zu einer Dämpfung der Immunantwort (CARS), die jedoch begrenzt sein sollte, da sie das Risiko einer

längerdauernden Immunsuppression und somit erhöhten Anfälligkeit für Sekundärinfektionen birgt. Sepsis ist eine häufige Komplikation nach Trauma und kann im schlimmsten Fall zu einem Multiorganversagen führen. Die meisten Todesfälle bei Sepsis werden im Rahmen einer prolongierten Immunparalyse berichtet [26]. Hierbei spielt vor allem der Verlust von Lymphozyten durch Apoptose eine entscheidende Rolle [95]. Bezüglich der pathogenetischen Rolle der Monozyten ist eine verminderte Zytokinfreisetzung, Antigenpräsentation und Phagozytosefähigkeit von Bedeutung [216]. Hinweise auf das Ausmaß der Monozytenparalyse gibt u.a. das Expressionsmuster von Oberflächenantigenen.

Die Patienten mit Sepsis bzw. nach Trauma ähnelten sich bezüglich ihrer im Vergleich zur gesunden Kontrolle verringerten CD4- und HLA-DR-Expression (cf. 4.1.1 und 1.8). Die verminderte CD4-Expression könnte bei beiden Gruppen auf den Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie IL-1β und TNF-α sowie LPS zurückzuführen sein [88, 170]. Trotz Gemeinsamkeiten in der Pathophysiologie gibt es immunologische Unterschiede in der Immunantwort auf Trauma und Sepsis, die bei einigen der untersuchten Oberflächenmarker auffielen. Besonderheiten in der individuellen Immunreaktion auf Trauma können zudem zu einer erhöhten Anfälligkeit für septische Komplikationen führen (cf. 4.3.3 und 4.3.5). Betrachtet man die monozytäre HLA-DR Expression als Maß für Immunkompetenz, ließ sich eine unterschiedliche Kinetik in der Immunrekonstitution nach Trauma feststellen. Bei manchen Patienten war die Immunsuppression transient, andere befanden sich auch nach zehn Tagen noch in einem hypoimmunen Stadium, ähnlich den Sepsispatienten. Die Traumapatienten wiesen zwischen 0 und 48 Stunden jedoch höhere Prozentwerte von CD11b sowie zu allen Zeitpunkten eine höhere Expressionsdichte von CD64 zu auf. CD64 ist ein monozytärer Aktivierungsmarker, der bei Infektionen erhöht ist. Darum würde man bei den Sepsispatienten im Vergleich zur Polytraumagruppe, in der nicht alle Patienten zusätzlich unter einer Infektion litten, höhere Werte erwarten. Die Werte in der Sepsisgruppe waren an sich überraschend niedrig (cf. 4.1.6). Dies könnte durch einen Messfehler bedingt oder auf eine periphere Monopenie zurückzuführen sein (cf. 4.1.3). Die Monozyten der Polytraumapatienten scheinen sich in den ersten beiden Tagen nach Trauma durch eine höhere Migrationsfähigkeit und Endotheladhärenz (CD11b) sowie eine verstärkte Antigenpräsentation (HLA-DR) auszuzeichnen. Eine Verminderung dieser Aktivierungsmarker im Rahmen der Monozytenanergie bei Sepsis ist bereits bekannt [146]. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen könnten jedoch auch darauf

zurückzuführen sein, dass sich die Patienten in verschiedenen Stadien der Immunantwort, also dem hyperinflammatorischen SIRS oder der CARS-vermittelten Immunsuppression befanden. Die Sepsispatienten wurden nicht zu einheitlichen Zeitpunkten typisiert, wodurch ein direkter Vergleich mit dem Immunstatus der Polytraumapatienten bis maximal zehn Tage nach Traumageschehen erschwert wird.

Beim Krankheitsbild der HLH dominiert die Hyperinflammation. Es kommt zu einer pathologisch persistierenden Aktivierung u.a. von Antigenpräsentierenden Zellen und einem sogenannten Zytokinsturm. Proinflammatorische Zytokine führen zu einer verringerten CD4-Expression, die wir neben HLH auch bei Polytrauma und Sepsis feststellen konnten. Die HLH-Diagnosekriterien der International Histiocyte Society [87] konzentrieren sich auf klinische Parameter: Fieber, Zytopenie, Hypofibrinogenämie, Hyperferritinämie und verringerte NK-Zellfunktion etc. sind unspezifische Zeichen für systemische Inflammation und kommen auch bei Patienten mit SIRS/Sepsis vor. Auch Hämophagozytose konnte bei Patienten mit SIRS festgestellt werden [114]. Es wird darum diskutiert, ob die sekundäre HLH einen Phänotyp im Spektrum hyperinflammatorischer Immunantworten darstellt [33]. Diese Überlappung ist insofern klinisch relevant, als dass sich die Therapieansätze von HLH und Sepsis unterscheiden [32, 33]. Für die Differenzierung könnte neben der Analyse genetischer Polymorphismen die Bestimmung von Oberflächenmarkern hilfreich sein. Im Gegensatz zur Polytraumagruppe beobachteten wir in der HLH-Gruppe eine verringerte CD14–Expression, die auf IFN-γ, ein in der Pathogenese der HLH dominierendes Zytokin, zurückzuführen sein könnte [55]. Die Polytraumapatienten unterschieden sich von den HLH-Patienten zudem durch eine höhere Anzahl CD11b-positiver Zellen (4-120 Stunden). Zu den späteren Messzeitpunkten bestand kein Unterschied bezüglich dieses Parameters mehr und auch bezüglich der anderen Marker glichen sich die beiden Patientengruppen an. Die Patienten unserer HLH-Gruppe befanden sich in unterschiedlichen Krankheitsstadien, die eventuell auch eine Veränderung des Monozytenphänotyps zur Folge haben. Dies sollte bei zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Verglichen mit den inflammatorischen Zuständen Sepsis und HLH fällt bei Polytrauma eine erhöhte Expression von CD11b auf. Offensichtlich spielen bei der systemischen Reaktion auf Trauma und Gewebeschaden die Endotheladhäsion und Migration von aktivierten Monozyten eine besondere Rolle (cf. 4.1.2 und 4.3.3).

## 4.5. Expressionsmuster bei OTS im Vergleich zu Leistungssportlern

Physische Anstrengung wirkt sich auf die Zellen des (angeborenen) Immunsystems aus und führt zu einer Veränderung von Rezeptorexpression, Zellumsatz und Effektorfunktionen [211]. Unmittelbar nach einer Trainingseinheit kommt es zur Monozytose und Verschiebung des dominierenden Monozytenphänotyps in Richtung proinflammatorischer Monozyten (CD14+CD16++) [92]. Auf Dauer wird regelmäßigem Sport jedoch eine antiinflammatorische Wirkung nachgesagt, deren Mechanismus bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte [211]. Eventuell sind antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 beteiligt, deren Serumspiegel bei Ausdauersportlern erhöht sind [193]. Auch ein verändertes Migrationsverhalten von Immunzellen könnte eine Rolle spielen. Wir fanden bei den Leistungssportlern, wie auch bei den Traumapatienten, eine vermehrte Expression des Leukozytenadhäsionsrezeptors CD11b. Die Expressionssteigerung könnte in beiden Gruppen auf die Wirkung von Katecholaminen zurückzuführen sein [181]. Auch bei Trainings-induziertem Stress kommt es scheinbar zu vermehrter transendothelialer Migration von Monozyten, die dazu dienen könnte, die bei physischer Anstrengung entstehenden, geringfügigen Gewebeschäden zu reparieren. Dies liefert einen Hinweis für den Mechanismus der antiinflammtorischen Wirkung von Sport. Bis auf drei Patienten (5, 8, 9) mussten alle OTS-Patienten ihr Training aufgrund ihrer Beschwerden pausieren. Somit fehlten die durch körperliche Belastung vermittelten hämodynamischen und humoralen Veränderungen, dementsprechend war die CD11b-Expression bei ihnen im Vergleich zu den Leistungssportlern erniedrigt und entsprach der Expression auf Monozyten der normalen Kontrollgruppe. Die Patienten, die trotz der bemerkten Leistungsminderung und Symptomatik ihr Training fortgesetzt hatten, zeigten ebenfalls eine verringerte CD11b-Expression. Während sich moderates Training positiv auf die Immunfunktion auswirkt, kommt es bei zu intensiver Belastung zu einer Immunsuppression [120, 145] die z.B. durch erhöhte Anfälligkeit für Infektionen, v.a. der oberen Atemwege oder eine Virusreaktivierung, gekennzeichnet ist [166, 211]. Wenn exzessives, übersteigertes Training, ungenügende Erholung und andere Stressoren zusammentreffen, kann es dann zu einer chronischen Leistungsminderung kommen. Wir fanden bei den OTS-Patienten einen erhöhten Anteil CD95-positiver Monozyten. CD95 fungiert als Rezeptor in der Vermittlung des extrinsischen Apoptoseweges. Auf Lymphozyten wurde eine vermehrte CD95-Expression im Sinne einer Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges zur Beendigung einer trainingsinduzierten Lymphozytenaktivierung bereits beschrieben [112, 132]. Die erhöhte CD95-Expression

könnte u.a. durch die Wirkung von Glucocorticoiden und einer Dysfunktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse bedingt sein, Faktoren, die auch beim OTS eine Rolle spielen [80, 110, 117, 186]. Eventuell führen ähnliche Mechanismen auch bei Monozyten zu vermehrter CD95-Expression und Sensibilität für Apoptosesignale. Zudem wird das OTS mit einer EBV-Reaktivierung in Zusammenhang gebracht [166]. Glykoproteine dieses Virus können ebenfalls zu vermehrter CD95-Expression auf Lymphozyten und Makrophagen führen [196]. Besonders auffällig bei den OTS-Patienten ist die im Vergleich zu allen anderen Gruppen stark erhöhte Expression des aktivierenden Fcγ-Rezeptors CD64. Seine Expression wird von Zytokinen wie IFN-γ oder TNF-α erhöht [59, 152], bei verstärkter Expression wird die Aktivierungsschwelle von Monozyten herabgesetzt und es kommt zu einer weiteren Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [165]. Die Ergebnisse der OTS-Gruppe könnten auf IFN-γ- oder TNF-α-vermittelte Aktivierung von Monozyten hinweisen [186]. In der Gruppe der Leistungssportler fällt ein Patient durch einen hohen Wert im Bereich der OTS-Patienten auf. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme (nach Besuch eines Trainingslagers) hatte der Patient eine Leistungsminderung bemerkt, aufgrund derer ein psychologischer Test durchgeführt wurde, der zunächst auf ein OTS hinwies. Die klinische und laborchemische Untersuchung des Patienten war jedoch, ebenso wie eine spätere psychologische Reevaluierung, unauffällig. Der Patient selbst schrieb die Leistungsminderung einer „Erkältung“ zu. Symptome von Infekten der oberen Atemwege sind häufig bei Athleten und vermutlich weniger auf tatsächliche, akute Infektion sondern vielmehr auf eine Virusreaktivierung zurückzuführen oder Zeichen einer Trainings-induzierten, systemischen Inflammation [166]. Infolge einer bewussten Überbelastung zur Leistungssteigerung kann es zu einer vorübergehenden Immunsuppression kommen. Dieses sogenannte Overreaching wird in der Literatur jedoch vom im Verlauf schwereren und länger andauernden Overtrainingsyndrom abgegrenzt [135, 189]. Die erhöhte CD64-Expression könnte jedoch auch auf eine akute virale Infektion zurückzuführen sein [150]. Eine erhöhte Expressionsdichte von CD64 als Zeichen einer Monozytenaktivierung wurde auch bei Ausdauersportlern in einer regenerativen Trainingsperiode nachgewiesen [68]. Letztendlich sind die genauen Pathomechanismen, die zur Entstehung des OTS führen, nicht eindeutig geklärt [110, 135], diskutiert werden u.a. Glutaminmangel [80, 116, 129], Dysfunktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse [80, 117, 186], verminderte Neutralisation von Sauerstoffradikalen [197] und reduzierte Sympathikusaktivität [80, 186]. Wenn auch in der Literatur widersprüchlich betrachtet [80, 110, 135, 169, 186], gelingt mit der

„Zytokinhypothese“ die schlüssigste Integration der vielfältigen Symptome. Zytokine wirken sich, neben der Rückkopplung an das Immunsystem, wiederum auf neuroendokrine Systeme und Aminosäurestoffwechsel aus und können so auch die hormonellen, psychischen und neurovegetativen Veränderungen beim OTS erklären [186]. Initiiert wird die Zytokinkaskade vermutlich durch Mikrotraumata mit nachfolgender systemischer Inflammation [185, 186]. So gesehen zeigen sich Parallelen zwischen Overtraining und anderen systemischen Inflammationssyndromen, wie z.B. nach Trauma, Operation oder bei einer Sepsis. Die beim OTS auftretenden biochemischen Veränderungen sind unspezifisch und treten auch infolge von Stressoren wie Trauma und Infektion auf [91, 180, 193] . In diesen chronischen Stresssituationen findet man ebenfalls eine Monozytenaktivierung, die sich z.B. auch in erhöhter CD64-Expression äußert [18, 44, 79, 90]. Zur Diagnosestellung des OTS herrscht bisher ebenfalls keine Einigkeit. Durch die sehr individuelle Symptomatik und die verschiedenen Schweregrade der Leistungseinschränkung sind die Studienpatienten oft nicht vergleichbar. Bisher konnte noch kein Test oder biologischer Marker zur Diagnosestellung etabliert werden [135], dabei wäre eine frühzeitige Erkennung gerade wegen des schmalen Grates zwischen akutem, leistungssteigerndem Overreaching und dem chronischen, langfristig leistungsminderndem OTS sehr wichtig. Bisher gibt es nur wenige Studien [64, 70, 129] die einen Unterschied in der Immunfunktion von Leistungssportlern und Patienten mit OTS, also zwischen erfolgreicher und mangelhafter Adaptation an Belastung, zeigen konnten. In einigen Studien zeigten sich keine Veränderungen zwischen den Gruppen [80, 130, 173], andere konnten mittels lymphozytärer Oberflächenmarker eine Differenzierung von Overtrainingpatienten und gesunden Athleten vornehmen [64, 70]. Nach unserem Wissen wurde die Expression von Oberflächenantigenen auf Monozyten von OTS-Patienten hingegen noch nicht untersucht. Im vorliegenden Patientenkollektiv konnte besonders für die Oberflächenmarker CD11b und CD64 ein deutlicher Unterschied zwischen OTS und gesunden Leistungssportlern gezeigt werden. Inwiefern diese Ergebnisse weitere Hinweise für die Pathophysiologie des OTS liefern können oder ob es sich um mögliche Diagnosemerkmale handelt, sollte mit größeren Patientenzahlen genauer untersucht werden.

## 4.6. Schlussfolgerung

Anhand der vorliegenden Ergebnisse ließen sich einerseits Gemeinsamkeiten im Immunstatus der Patienten mit inflammatorischem bzw. infektiösem

Krankheitsschwerpunkt feststellen, andererseits kristallisierten sich Oberflächenmarker heraus, die zur Differenzierung der Krankheitsbilder geeignet sein könnten:

In der HLH-Gruppe fiel vor allem die im Vergleich zur Kontrolle erniedrigte CD14- und erhöhte CD16-Expression auf. Dies ist nach unserem Wissen die erste Studie, die eine erhöhte CD16-Expression bei 17 HLH Patienten feststellen konnte und somit die Ergebnisse von Untersuchungen mit weitaus geringeren Patientenzahlen [55, 195] bestätigen kann. Ein Teil der HLH-Patienten ähnelte in der Anzahl CD4- und HLA-DR-positiver Zellen und der Expressionsdichte von CD14 den Sepsispatienten. Somit bestehen offensichtlich nicht nur im klinischen Erscheinungsbild Ähnlichkeiten zwischen diesen Krankheitsbildern. Die verringerte HLA-DR-Expression bei Sepsis-bedingter Immunsuppression wurde mehrfach beschrieben [50, 52, 67, 83, 146, 203], die CD4-Expression hingegen wurde bei diesen Patienten nach unserem Wissen noch nicht untersucht. Außer bei Sepsis und HLH fand sich auch in der Traumagruppe zu allen Zeitpunkten eine deutliche Verringerung von CD4% und MFI. Uns ist nur eine Studie bekannt, die CD4 auf Monozyten von Traumapatienten untersucht hat und deren Ergebnisse wir bestätigen konnten [99]. Die Funktion von monozytärem CD4 ist bislang nicht vollständig geklärt. Möglicherweise trägt die verminderte Expression zur Immunsuppression bei diesen Patientengruppen bei [99] und CD4 ließe sich, ähnlich HLA-DR, als Verlaufsmarker für Immunrekonstitution nach Trauma oder Sepsis heranziehen. Die Polytraumapatienten unterschieden sich von den anderen Gruppen v.a. durch eine höhere Expressionsdichte des Adhäsionsrezeptors CD11b, der die transendotheliale Migration der Zellen und somit eine Einwanderung ins Gewebe begünstigt [2, 187]. Auch die Expressionsdichte der Fcγ-Rezeptoren CD16 und CD64 war im Rahmen der Immunantwort auf Trauma und Gewebeschaden erhöht. Es fiel auf, dass die Patienten mit geringen Score-Werten und unauffälligem Verlauf niedrige Expressionswerte für CD64 hatten und in der CD163-Expression den Normalspendern entsprachen. Die Patienten mit ungünstigem klinischen Verlauf und anfangs hohem Schweregrad der Erkrankung scheinen entsprechend der Score-Werte ein höheres Risiko für die Entwicklung einer Sepsis zu haben. Hinweise für Immunsuppression fanden sich bei diesen Patienten auch im Oberflächenmarkerprofil: Bei allen drei Patienten fehlte im Verlauf ein Wiederanstieg der HLA-DR-Expression, der CD11b-Anstieg fehlte bei zwei Patienten. Von den untersuchten Markern könnte vor allem, wie bereits zahlreiche andere Studien zeigten [37, 50, 51, 77, 99, 142, 146, 208], die Erholung der HLA-DR-Expression mit einem günstigen Verlauf im Zusammenhang stehen. Einzelne Besonderheiten im monozytären Expressionsmuster der

untersuchten Patienten müssten anhand größerer Studien auf ihre klinische Relevanz überprüft werden. Dabei sollten auch die funktionell unterschiedlichen Monozytensubsets, die erst seit kurzem neu definiert wurden [218, 224] in den Versuchsaufbau miteingebunden werden. Vor allem bei HLH bleibt zu klären, ob tatsächlich eine Expansion der CD14-CD16++-Untergruppe vorliegt und ob diese zur Pathogenese beiträgt oder eventuell protektiv wirkt [218]. Gegebenenfalls ließe sich CD16 als zusätzlicher Biomarker für Diagnostik und Therapiekontrolle bezüglich Transmigration von Monozyten ins Gewebe etablieren. Ein möglicher neuer Diagnostikansatz ergibt sich auch aus den Ergebnissen der OTS- und Leistungssportgruppen. Unsere Daten zeigten bei OTS eine erhöhte Expression von CD95 und vor allem CD64, zudem fehlte die bei den Leistungssportlern vorhandene Erhöhung der CD11b-Expressionsdichte. Bisher existieren noch keine verlässlichen molekularen Marker für die Diagnostik des OTS. Dies ist nach unserem Wissen die erste Studie, welche die Expression von monozytären Oberflächenmarkern zur Differenzierung zwischen OTS und gesunden Leistungssportlern heranzieht.

# 5. Zusammenfassung

Monozyten dienen der Antigenerkennung und –prozessierung und spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen und der Verbindung von angeborenem und spezifischem Immunsystem. Durch ihre Fähigkeit zu Phagozytose als ausgereifte Gewebsmakrophagen helfen sie zum einen, Inflammation zu begrenzen, andererseits können sie, je nach Art der freigesetzten Botenstoffe, Entzündungsvorgänge weiter unterhalten. Entsprechend dem Aktivierungsgrad exprimieren sie bestimmte Antigene auf ihrer Zelloberfläche. Die Rolle von Monozyten in der Pathogenese von inflammatorischen Zuständen wie Trauma, Langerhanszellhistiozytose (LCH) und Overtrainingsyndrom (OTS) bei Leistungssportlern, sowie in infektiösen Zuständen, wie Sepsis bzw. Hämophagozytischer Lymphohistiozytose (HLH), ist nicht vollständig geklärt. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Monozyten dieser Patienten in inflammatorischen bzw. infektiösen Zuständen im Hinblick auf die Veränderung ausgewählter Oberflächenrezeptoren untersucht. Ein Schwerpunkt lag auf dem Oberflächenexpressionsmuster der Immunantwort bei Polytrauma im zeitlichen Verlauf. Ziel der vorliegenden Arbeit war, die sich klinisch präsentierenden Inflammationszustände auf immunologische Gemeinsamkeiten zu untersuchen und dabei Oberflächenantigene herauszuarbeiten, die sich zur Diagnostik und Unterscheidung der Pathologien eignen könnten. Die Monozyten von insgesamt 55 Patienten mit den oben genannten Diagnosen wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von CD (cluster of differentiation) 4, CD11b, CD14, CD16, CD45, CD64, CD95, CD163 und HLA-DR untersucht und sowohl die Prozentzahl positiver Zellen als auch die Expressionsdichte (mean fluorescent intensity, MFI) erhoben. Als Vergleichsgruppen dienten sieben gesunde Personen und acht gesunde Leistungssportler. Bei den Polytraumapatienten wurde die Rezeptorexpression an sieben Messzeitpunkten von Krankenhausaufnahme bis zehn Tage nach Trauma erhoben und zur klinischen Charakterisierung zusätzlich Scoringsysteme bezüglich Schweregrad der Erkrankung bzw. des Traumas, der Organdysfunktionen sowie der generalisierten Entzündungsantwort angewandt. Die Auswertung erfolgte deskriptiv in Form einer explorativen Datenanalyse, statistisch anhand nichtparametrischer Tests und logistischer Regressionsanalyse. Die Patienten mit Sepsis fielen bei CD4, CD14, CD45, CD64, CD95 und HLA-DR durch erniedrigte Werte auf. Die Monozyten der HLH-Patienten zeigten im Vergleich zur gesunden Kontrolle vor allem eine deutlich erhöhte Expressionsdichte von CD16. Im Expressionsmuster von CD4, CD14 und HLA-DR

ähnelte ein Großteil der Patienten den Sepsispatienten. In der LCH-Gruppe konnte bei breiter Streuung der Werte kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle gefunden werden. Im Gegensatz zu den gesunden Leistungssportlern zeigten die OTS-Patienten eine verminderte Expression des Adhäsionsrezeptors CD11b, jedoch eine erhöhte CD64-Expression und Anzahl CD95-positiver Zellen. Die Polytraumapatienten zeichneten sich im Vergleich zur Kontrolle durch deutlich erniedrigte Prozent- und MFI- Werte von CD4 sowie eine erhöhte Expressionsdichte von CD11b, CD16 und CD64 aus. Gegenüber den Sepsis-und HLH-Patienten fiel vor allem ein vermehrter Anteil CD11b-positiver Zellen auf. Zudem war im Vergleich zur stark immunsupprimierten Sepsisgruppe die HLA-DR-Expression (Prozentzahl und MFI) höher, wenn auch nicht bei allen Patienten und Zeitpunkten Normalwerte erreicht wurden. Bei den polytraumatisierten Patienten mit komplikationsreichem Verlauf durch Infektionen und Entwicklung eines septischen Schocks manifestierte sich eine niedrige HLA-DR-Expressionsdichte bzw. eine langsamere Erholung der Werte. Aus den vorliegenden Ergebnissen können folgende Hypothesen generiert werden: Bei Leistungssportlern könnten CD11b, CD64 und CD95 in Zukunft bei der Diagnostik eines OTS hilfreich sein. Die breite Streuung der Werte in der LCH-Gruppe lieferte nur bei einzelnen Patienten einen Hinweis auf tumorbedingte Immunsuppression. Die erhöhte CD16-Expression der HLH-Patienten könnte auf das Vorhandensein eines proinflammatorischen Subsets hinweisen. Die erniedrigten Oberflächenexpressionswerte bei Sepsis lassen eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit der Monozyten vermuten. Bei Traumapatienten mit SIRS unterschied sich das Oberflächenexpressionsmuster von dem der Sepsispatienten mit SIRS und zusätzlicher Infektion. Vor allem CD4, CD11b, CD16, CD64 und HLA-DR scheinen zur Beurteilung des Immunstatus geeignet zu sein. Der vermehrte Anteil CD11b-positiver Zellen bei Polytraumatisierten könnte einen Hinweis auf vermehrte Endotheladhäsion geben, die zur Migration der Immunzellen in das geschädigte Gewebe führt. Der Wiederanstieg der HLA-DR-Expression bei Polytraumatisierten mit unkompliziertem Verlauf kann im Sinne einer Immunrekonstitution interpretiert werden. CD11b, CD64 und HLA-DR könnten dazu beitragen, neben der vorliegenden generalisierten Entzündungsantwort auf dem Boden eines Polytraumas infektiös-bedingte Entzündungsreaktion und klinische Verschlechterung zu erkennen. Aufgrund der geringen Fallzahlen sollten die aufgestellten Hypothesen durch Studien mit größerer Fallzahl verifiziert werden.

# 6. Literaturverzeichnis

1. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit.Care Med., 20: 864-874(1992)

2. Adams D H, Shaw S: Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. Lancet, 343: 831-836(1994)

3. Adib-Conquy M, Cavaillon J M: Compensatory anti-inflammatory response syndrome. Thromb.Haemost., 101: 36-47(2009)

4. Adib-Conquy M, Cavaillon J M: Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. FEBS Lett., 581: 3723-3733(2007)

5. Akira S, Hemmi H: Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. Immunol.Lett., 85: 85-95(2003)

6. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulme R, Lepage E, Le Gall R: Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. Intensive Care Med., 28: 108-121(2002)

7. Allen C E, Yu X, Kozinetz C A, McClain K L: Highly elevated ferritin levels and the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. Pediatr.Blood Cancer., 50: 1227-1235(2008)

8. Altieri D C: Regulation of leukocyte-endothelium interaction by fibrinogen. Thromb.Haemost., 82: 781-786(1999)

9. Ancuta P, Moses A, Gabuzda D: Transendothelial migration of CD16+ monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions. Immunobiology, 209: 11-20(2004)

10. Annels N E, Da Costa C E, Prins F A, Willemze A, Hogendoorn P C, Egeler R M: Aberrant chemokine receptor expression and chemokine production by Langerhans cells underlies the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis. J.Exp.Med., 197: 1385-1390(2003)

11. Antal-Szalmas P: Evaluation of CD14 in host defence. Eur.J.Clin.Invest., 30: 167-179(2000)

12. Antonelli M, Moreno R, Vincent J L, Sprung C L, Mendoca A, Passariello M, Riccioni L, Osborn J: Application of SOFA score to trauma patients. Sequential Organ Failure Assessment. Intensive Care Med., 25: 389-394(1999)

13. Arceci R J: When T cells and macrophages do not talk: the hemophagocytic syndromes. Curr.Opin.Hematol., 15: 359-367(2008)

14. Astiz M, Saha D, Lustbader D, Lin R, Rackow E: Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. J.Lab.Clin.Med., 128: 594-600(1996)

15. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F: Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. Science, 317: 666-670(2007)

16. Autero M, Saharinen J, Pessa-Morikawa T, Soula-Rothhut M, Oetken C, Gassmann M, Bergman M, Alitalo K, Burn P, Gahmberg C G: Tyrosine phosphorylation of CD45 phosphotyrosine phosphatase by p50csk kinase creates a binding site for p56lck tyrosine kinase and activates the phosphatase. Mol.Cell.Biol., 14: 1308-1321(1994)

17. Baker S P, O'Neill B, Haddon W,Jr, Long W B: The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. J.Trauma, 14: 187-196(1974)

18. Barth E, Fischer G, Schneider E M, Wollmeyer J, Georgieff M, Weiss M: Differences in the expression of CD64 and mCD14 on polymorphonuclear cells and on monocytes in patients with septic shock. Cytokine, 14: 299-302(2001)

19. Barth E, Fischer G, Schneider E M, Wollmeyer J, Georgieff M, Weiss M: Differences in the expression of CD64 and mCD14 on polymorphonuclear cells and on monocytes in patients with septic shock. Cytokine, 14: 299-302(2001)

20. Belge K U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L: The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. J.Immunol., 168: 3536-3542(2002)

21. Belge K U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L: The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. J.Immunol., 168: 3536-3542(2002)

22. Beutel K, Gross-Wieltsch U, Wiesel T, Stadt U Z, Janka G, Wagner H J: Infection of T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in children of non-Asian origin. Pediatr.Blood Cancer., 53: 184-190(2009)

23. Bianchi M E: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. J.Leukoc.Biol., 81: 1-5(2007)

24. Bone R C: Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). Ann.Intern.Med., 125: 680-687(1996)

25. Bone R C: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. Crit.Care Med., 24: 1125-1128(1996)

26. Bone R C, Sprung C L, Sibbald W J: Definitions for sepsis and organ failure. Crit.Care Med., 20: 724-726(1992)

27. Bowers K, Pitcher C, Marsh M: CD4: a co-receptor in the immune response and HIV infection. Int.J.Biochem.Cell Biol., 29: 871-875(1997)

28. Bronchard R, Albaladejo P, Brezac G, Geffroy A, Seince P F, Morris W, Branger C, Marty J: Early onset pneumonia: risk factors and consequences in head trauma patients. Anesthesiology, 100: 234-239(2004)

29. Brunialti M K, Martins P S, Barbosa de Carvalho H, Machado F R, Barbosa L M, Salomao R: TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. Shock, 25: 351-357(2006)

30. Brunialti M K, Martins P S, Barbosa de Carvalho H, Machado F R, Barbosa L M, Salomao R: TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. Shock, 25: 351-357(2006)

31. Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G: Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. J.Leukoc.Biol., 67: 97-103(2000)

32. Buyse S, Teixeira L, Galicier L, Mariotte E, Lemiale V, Seguin A, Bertheau P, Canet E, de Labarthe A, Darmon M, Rybojad M, Schlemmer B, Azoulay E: Critical care management of patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. Intensive Care Med., 36: 1695-1702(2010)

33. Castillo L, Carcillo J: Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis and severe sepsis/ systemic inflammatory response syndrome/multiorgan dysfunction syndrome/macrophage activation syndrome share common intermediate phenotypes on a spectrum of inflammation. Pediatr.Crit.Care.Med., 10: 387-392(2009)

34. Cavaillon J M, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D: Cytokine cascade in sepsis. Scand.J.Infect.Dis., 35: 535-544(2003)

35. Chantry D, Turner M, Brennan F, Kingsbury A, Feldmann M: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces both HLA-DR expression and cytokine production by human monocytes. Cytokine, 2: 60-67(1990)

36. Cheadle W G, Hershman M J, Wellhausen S R, Polk H C,Jr: HLA-DR antigen expression on peripheral blood monocytes correlates with surgical infection. Am.J.Surg., 161: 639-645(1991)

37. Cheron A, Floccard B, Allaouchiche B, Guignant C, Poitevin F, Malcus C, Crozon J, Faure A, Guillaume C, Marcotte G, Vulliez A, Monneuse O, Monneret G: Lack of recovery in monocyte human leukocyte antigen-DR expression is independently associated with the development of sepsis after major trauma. Crit.Care, 14: R208(2010)

38. Chung S, Kim J E, Park S, Han K S, Kim H K: Neutrophil and monocyte activation markers have prognostic impact in disseminated intravascular coagulation: in vitro effect of thrombin on monocyte CD163 shedding. Thromb.Res., 127: 450-456(2011)

39. Conklyn M J, Neote K, Showell H J: Chemokine-dependent upregulation of CD11b on specific leukocyte subpopulations in human whole blood: effect of anticoagulant on rantes and MIP-1 beta stimulation. Cytokine, 8: 762-766(1996)

40. Copes W S, Champion H R, Sacco W J, Lawnick M M, Keast S L, Bain L W: The Injury Severity Score revisited. J.Trauma, 28: 69-77(1988)

41. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang S Y, Senechal B, Puel A, Biswas S K, Moshous D, Picard C, Jais J P, D'Cruz D, Casanova J L, Trouillet C, Geissmann F: Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. Immunity, 33: 375-386(2010)

42. Cruikshank W W, Center D M, Nisar N, Wu M, Natke B, Theodore A C, Kornfeld H: Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 91: 5109-5113(1994)

43. da Costa C E, Szuhai K, van Eijk R, Hoogeboom M, Sciot R, Mertens F, Bjorgvinsdottir H, Debiec-Rychter M, de Krijger R R, Hogendoorn P C, Egeler R M, Annels N E: No genomic aberrations in Langerhans cell histiocytosis as assessed by diverse molecular technologies. Genes Chromosomes Cancer, 48: 239-249(2009)

44. Danikas D D, Karakantza M, Theodorou G L, Sakellaropoulos G C, Gogos C A: Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression. Clin.Exp.Immunol., 154: 87-97(2008)

45. Danish E H, Dahms B B, Kumar M L: Cytomegalovirus-associated hemophagocytic syndrome. Pediatrics, 75: 280-283(1985)

46. Davis B H, Zarev P V: Human monocyte CD163 expression inversely correlates with soluble CD163 plasma levels. Cytometry B.Clin.Cytom, 63: 16-22(2005)

47. De Freitas I, Fernandez-Somoza M, Essenfeld-Sekler E, Cardier J E: Serum levels of the apoptosis-associated molecules, tumor necrosis factor-alpha/tumor necrosis factor type-I receptor and Fas/FasL, in sepsis. Chest, 125: 2238-2246(2004)

48. Deo Y M, Graziano R F, Repp R, van de Winkel J G: Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R-directed immunotherapies. Immunol.Today, 18: 127-135(1997)

49. Deszo E L, Brake D K, Cengel K A, Kelley K W, Freund G G: CD45 negatively regulates monocytic cell differentiation by inhibiting phorbol 12-myristate 13-acetate-dependent activation and tyrosine phosphorylation of protein kinase Cdelta. J.Biol.Chem., 276: 10212-10217(2001)

50. Ditschkowski M, Kreuzfelder E, Rebmann V, Ferencik S, Majetschak M, Schmid E N, Obertacke U, Hirche H, Schade U F, Grosse-Wilde H: HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma. Ann.Surg., 229: 246-254(1999)

51. Docke W D, Hoflich C, Davis K A, Rottgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber S U, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P, Nebe T, Engel A, Monneret G, Spittler A, Schmolke K, Reinke P, Volk H D, Kunz D: Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. Clin.Chem., 51: 2341-2347(2005)

52. Docke W D, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk H D, Kox W: Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. Nat.Med., 3: 678-681(1997)

53. Dunham C M, Damiano A M, Wiles C E, Cushing B M: Post-traumatic multiple organ dysfunction syndrome--infection is an uncommon antecedent risk factor. Injury, 26: 373-378(1995)

54. Egeler R M, Favara B E, van Meurs M, Laman J D, Claassen E: Differential In situ cytokine profiles of Langerhans-like cells and T cells in Langerhans cell histiocytosis: abundant expression of cytokines relevant to disease and treatment. Blood, 94: 4195-4201(1999)

55. Emminger W, Zlabinger G J, Fritsch G, Urbanek R: CD14(dim)/CD16(bright) monocytes in hemophagocytic lymphohistiocytosis. Eur.J.Immunol., 31: 1716-1719(2001)

56. Ertel W, Keel M, Marty D, Hoop R, Safret A, Stocker R, Trentz O: Significance of systemic inflammation in 1,278 trauma patients. Unfallchirurg, 101: 520-526(1998)

57. Fabriek B O, van Bruggen R, Deng D M, Ligtenberg A J, Nazmi K, Schornagel K, Vloet R P, Dijkstra C D, van den Berg T K: The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. Blood, 113: 887-892(2009)

58. Faist E, Storck M, Hultner L, Redl H, Ertel W, Walz A, Schildberg F W: Functional analysis of monocyte activity through synthesis patterns of proinflammatory cytokines and neopterin in patients in surgical intensive care. Surgery, 112: 562-572(1992)

59. Fanger N A, Voigtlaender D, Liu C, Swink S, Wardwell K, Fisher J, Graziano R F, Pfefferkorn L C, Guyre P M: Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor Fc gamma RI (CD64) expressed on human blood dendritic cells. J.Immunol., 158: 3090-3098(1997)

60. Favara B E, Jaffe R, Egeler R M: Macrophage activation and hemophagocytic syndrome in langerhans cell histiocytosis: report of 30 cases. Pediatr.Dev.Pathol., 5: 130-140(2002)

61. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock H W: The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. Blood, 82: 3170-3176(1993)

62. Fingerle-Rowson G, Auers J, Kreuzer E, Fraunberger P, Blumenstein M, Ziegler-Heitbrock L H: Expansion of CD14+CD16+ monocytes in critically ill cardiac surgery patients. Inflammation, 22: 367-379(1998)

63. Friese M A, Jones E Y, Fugger L: MHC II molecules in inflammatory diseases: interplay of qualities and quantities. Trends Immunol., 26: 559-561(2005)

64. Fry R W, Grove J R, Morton A R, Zeroni P M, Gaudieri S, Keast D: Psychological and immunological correlates of acute overtraining. Br.J.Sports Med., 28: 241-246(1994)

65. Fry R W, Morton A R, Keast D: Overtraining in athletes. An update. Sports Med., 12: 32-65(1991)

66. Fukui M, Imamura R, Umemura M, Kawabe T, Suda T: Pathogen-associated molecular patterns sensitize macrophages to Fas ligand-induced apoptosis and IL-1 beta release. J.Immunol., 171: 1868-1874(2003)

67. Fumeaux T, Pugin J: Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 166: 1475-1482(2002)

68. Gabriel H, Rothe G, Korpys M, Schmitz G, Kindermann W: Enhanced expression of HLA-DR, Fc gamma receptor 1 (CD64) and leukocyte common antigen (CD45) indicate activation of monocytes in regenerative training periods of endurance athletes. Int.J.Sports Med., 18: 136-141(1997)

69. Gabriel H, Schwarz L, Born P, Kindermann W: Differential mobilization of leucocyte and lymphocyte subpopulations into the circulation during endurance exercise. Eur.J.Appl.Physiol.Occup.Physiol., 65: 529-534(1992)

70. Gabriel H H, Urhausen A, Valet G, Heidelbach U, Kindermann W: Overtraining and immune system: a prospective longitudinal study in endurance athletes. Med.Sci.Sports Exerc., 30: 1151-1157(1998)

71. Gadd S J, Eher R, Majdic O, Knapp W: Signal transduction via Fc gamma R and Mac-1 alpha-chain in monocytes and polymorphonuclear leucocytes. Immunology, 81: 611-617(1994)

72. Gaini S, Koldkjaer O G, Pedersen S S, Pedersen C, Moestrup S K, Moller H J: Soluble haemoglobin scavenger receptor (sCD163) in patients with suspected community-acquired infections. APMIS, 114: 103-111(2006)

73. Gaini S, Pedersen S S, Koldkaer O G, Pedersen C, Moestrup S K, Moller H J: New immunological serum markers in bacteraemia: anti-inflammatory soluble CD163, but not proinflammatory high mobility group-box 1 protein, is related to prognosis. Clin.Exp.Immunol., 151: 423-431(2008)

74. Gallucci S, Matzinger P: Danger signals: SOS to the immune system. Curr.Opin.Immunol., 13: 114-119(2001)

75. Gennarelli T A, Wodzin E: AIS 2005: a contemporary injury scale. Injury, 37: 1083-1091(2006)

76. Gerber J S, Mosser D M: Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fcgamma receptors. Microbes Infect., 3: 131-139(2001)

77. Gouel-Cheron A, Allaouchiche B, Guignant C, Davin F, Floccard B, Monneret G, AzuRea Group: Early interleukin-6 and slope of monocyte human leukocyte antigen-DR: a powerful association to predict the development of sepsis after major trauma. PLoS One, 7: e33095(2012)

78. Graziani-Bowering G, Filion L G, Thibault P, Kozlowski M: CD4 is active as a signaling molecule on the human monocytic cell line Thp-1. Exp.Cell Res., 279: 141-152(2002)

79. Groselj-Grenc M, Ihan A, Pavcnik-Arnol M, Kopitar A N, Gmeiner-Stopar T, Derganc M: Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children. Intensive Care Med., 35: 1950-1958(2009)

80. Halson S L, Jeukendrup A E: Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. Sports Med., 34: 967-981(2004)

81. Harton J A, Ting J P: Class II transactivator: mastering the art of major histocompatibility complex expression. Mol.Cell.Biol., 20: 6185-6194(2000)

82. Hasko G, Deitch E A, Szabo C, Nemeth Z H, Vizi E S: Adenosine: a potential mediator of immunosuppression in multiple organ failure. Curr.Opin.Pharmacol., 2: 440-444(2002)

83. Haveman J W, Muller Kobold A C, Tervaert J W, van den Berg A P, Tulleken J E, Kallenberg C G, The T H: The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. Neth.J.Med., 55: 132-141(1999)

84. Hayes A L, Smith C, Foxwell B M, Brennan F M: CD45-induced tumor necrosis factor alpha production in monocytes is phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and nuclear factor-kappaB-independent. J.Biol.Chem., 274: 33455-33461(1999)

85. Heinzelmann M, Mercer-Jones M, Cheadle W G, Polk H C,Jr: CD14 expression in injured patients correlates with outcome. Ann.Surg., 224: 91-96(1996)

86. Henter J I, Elinder G, Soder O, Hansson M, Andersson B, Andersson U: Hypercytokinemia in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Blood, 78: 2918-2922(1991)

87. Henter J I, Horne A, Arico M, Egeler R M, Filipovich A H, Imashuku S, Ladisch S, McClain K, Webb D, Winiarski J, Janka G: HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. Pediatr.Blood Cancer., 48: 124-131(2007)

88. Herbein G, Doyle A G, Montaner L J, Gordon S: Lipopolysaccharide (LPS) down-regulates CD4 expression in primary human macrophages through induction of endogenous tumour necrosis factor (TNF) and IL-1 beta. Clin.Exp.Immunol., 102: 430-437(1995)

89. Hietbrink F, Koenderman L, Rijkers G, Leenen L: Trauma: the role of the innate immune system. World J.Emerg.Surg., 1: 15(2006)

90. Hirsh M, Mahamid E, Bashenko Y, Hirsh I, Krausz M M: Overexpression of the high-affinity Fcgamma receptor (CD64) is associated with leukocyte dysfunction in sepsis. Shock, 16: 102-108(2001)

91. Hoffman-Goetz L, Pedersen B K: Exercise and the immune system: a model of the stress response? Immunol.Today, 15: 382-387(1994)

92. Hong S, Mills P J: Effects of an exercise challenge on mobilization and surface marker expression of monocyte subsets in individuals with normal vs. elevated blood pressure. Brain Behav.Immun., 22: 590-599(2008)

93. Horneff G, Sack U, Kalden J R, Emmrich F, Burmester G R: Reduction of monocyte-macrophage activation markers upon anti-CD4 treatment. Decreased levels of IL-1, IL-6, neopterin and soluble CD14 in patients with rheumatoid arthritis. Clin.Exp.Immunol., 91: 207-213(1993)

94. Hotchkiss R S, Karl I E: The pathophysiology and treatment of sepsis. N.Engl.J.Med., 348: 138-150(2003)

95. Hotchkiss R S, Tinsley K W, Swanson P E, Schmieg R E,Jr, Hui J J, Chang K C, Osborne D F, Freeman B D, Cobb J P, Buchman T G, Karl I E: Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. J.Immunol., 166: 6952-6963(2001)

96. Institut für Medizinische Immunologie Charité Universitätsmedizin Berlin: , Flowzytometrie Praktikum Humanmedizin. 2010-last update. Available: http://immunologie.charite.de/regelstudiengang/lehrmaterial/ [01/15, 2013]

97. Janeway C A,Jr, Medzhitov R: Innate immune recognition. Annu.Rev.Immunol., 20: 197-216(2002)

98. Janka G E: Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. Annu.Rev.Med., 63: 233-246(2012)

99. Kampalath B, Cleveland R P, Chang C C, Kass L: Monocytes with altered phenotypes in posttrauma patients. Arch.Pathol.Lab.Med., 127: 1580-1585(2003)

100. Kampalath B, Cleveland R P, Kass L: Reduced CD4 and HLA-DR expression in neonatal monocytes. Clin.Immunol.Immunopathol., 87: 93-100(1998)

101. Kannourakis G, Abbas A: The role of cytokines in the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis. Br.J.Cancer Suppl., 23: S37-40(1994)

102. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H: CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum., 46: 2578-2586(2002)

103. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Tomihisa T, Okamoto K, Shigematsu A: Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. Anesth.Analg., 92: 1322-1326(2001)

104. Kazazi F, Mathijs J M, Foley P, Cunningham A L: Variations in CD4 expression by human monocytes and macrophages and their relationships to infection with the human immunodeficiency virus. J.Gen.Virol., 70 ( Pt 10): 2661-2672(1989)

105. Keel M, Trentz O: Pathophysiology of polytrauma. Injury, 36: 691-709(2005)

106. Kim O Y, Monsel A, Bertrand M, Coriat P, Cavaillon J M, Adib-Conquy M: Differential down-regulation of HLA-DR on monocyte subpopulations during systemic inflammation. Crit.Care, 14: R61(2010)

107. Kirchhoff C, Biberthaler P, Mutschler W E, Faist E, Jochum M, Zedler S: Early down-regulation of the pro-inflammatory potential of monocytes is correlated to organ dysfunction in patients after severe multiple injury: a cohort study. Crit.Care, 13: R88(2009)

108. Kitchens R L, Munford R S: CD14-dependent internalization of bacterial lipopolysaccharide (LPS) is strongly influenced by LPS aggregation but not by cellular responses to LPS. J.Immunol., 160: 1920-1928(1998)

109. Kolackova M, Kudlova M, Kunes P, Lonsky V, Mandak J, Andrys C, Jankovicova K, Krejsek J: Early expression of FcgammaRI (CD64) on monocytes of cardiac surgical patients and higher density of monocyte anti-inflammatory scavenger CD163 receptor in "on-pump" patients. Mediators Inflamm., 2008: 235461(2008)

110. Kreher J B, Schwartz J B: Overtraining syndrome: a practical guide. Sports Health., 4: 128-138(2012)

111. Kristiansen M, Graversen J H, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman H J, Law S K, Moestrup S K: Identification of the haemoglobin scavenger receptor. Nature, 409: 198-201(2001)

112. Kruger K, Frost S, Most E, Volker K, Pallauf J, Mooren F C: Exercise affects tissue lymphocyte apoptosis via redox-sensitive and Fas-dependent signaling pathways. Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol., 296: R1518-27(2009)

113. Kuroki K, Takahashi H K, Iwagaki H, Murakami T, Kuinose M, Hamanaka S, Minami K, Nishibori M, Tanaka N, Tanemoto K: beta2-adrenergic receptor stimulation-induced immunosuppressive effects possibly through down-regulation of co-stimulatory molecules, ICAM-1, CD40 and CD14 on monocytes. J.Int.Med.Res., 32: 465-483(2004)

114. Kuwata K, Yamada S, Kinuwaki E, Naito M, Mitsuya H: Peripheral hemophagocytosis: An early indicator of advanced systemic inflammatory response syndrome/hemophagocytic syndrome. Shock, 25: 344-350(2006)

115. Lackner H, Urban C, Sovinz P, Benesch M, Moser A, Schwinger W: Hemophagocytic lymphohistiocytosis as severe adverse event of antineoplastic treatment in children. Haematologica, 93: 291-294(2008)

116. Lakier Smith L: Overtraining, excessive exercise, and altered immunity: is this a T helper-1 versus T helper-2 lymphocyte response? Sports Med., 33: 347-364(2003)

117. Lehmann M, Foster C, Keul J: Overtraining in endurance athletes: a brief review. Med.Sci.Sports Exerc., 25: 854-862(1993)

118. Lendemans S, Kreuzfelder E, Waydhas C, Schade F U, Flohe S: Differential immunostimulating effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and interferon gamma (IFNgamma) after severe trauma. Inflamm.Res., 56: 38-44(2007)

119. Levy M M, Fink M P, Marshall J C, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal S M, Vincent J L, Ramsay G, SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit.Care Med., 31: 1250-1256(2003)

120. Li T L, Gleeson M: The effect of single and repeated bouts of prolonged cycling on leukocyte redistribution, neutrophil degranulation, IL-6, and plasma stress hormone responses. Int.J.Sport Nutr.Exerc.Metab., 14: 501-516(2004)

121. Li Y, Lee P Y, Kellner E S, Paulus M, Switanek J, Xu Y, Zhuang H, Sobel E S, Segal M S, Satoh M, Reeves W H: Monocyte surface expression of Fcgamma receptor RI (CD64), a biomarker reflecting type-I interferon levels in systemic lupus erythematosus. Arthritis Res.Ther., 12: R90(2010)

122. Liles W C, Ledbetter J A, Waltersdorph A W, Klebanoff S J: Cross-linking of CD45 enhances activation of the respiratory burst in response to specific stimuli in human phagocytes. J.Immunol., 155: 2175-2184(1995)

123. Liles W C, Ledbetter J A, Waltersdorph A W, Klebanoff S J: Cross-linking of CD45 enhances activation of the respiratory burst in response to specific stimuli in human phagocytes. J.Immunol., 155: 2175-2184(1995)

124. Löffler G, Petrides P E: Biochemie und Pathobiochemie. 8, völlig neu bearbeitete Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg, (2007)

125. Lukaszewicz A C, Faivre V, Payen D: Is monocyte HLA-DR expression monitoring a useful tool to predict the risk of secondary infection? Minerva Anestesiol., 76: 737-743(2010)

126. Lukaszewicz A C, Grienay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, Payen D: Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. Crit.Care Med., 37: 2746-2752(2009)

127. Lynch E A, Heijens C A, Horst N F, Center D M, Cruikshank W W: Cutting edge: IL-16/CD4 preferentially induces Th1 cell migration: requirement of CCR5. J.Immunol., 171: 4965-4968(2003)

128. Lynch G W, Turville S, Carter B, Sloane A J, Chan A, Muljadi N, Li S, Low L, Armati P, Raison R, Zoellner H, Williamson P, Cunningham A, Church W B: Marked differences in the structures and protein associations of lymphocyte and monocyte CD4: resolution of a novel CD4 isoform. Immunol.Cell Biol., 84: 154-165(2006)

129. Mackinnon L T, Hooper S: Mucosal (secretory) immune system responses to exercise of varying intensity and during overtraining. Int.J.Sports Med., 15 Suppl 3: S179-83(1994)

130. Mackinnon L T, Hooper S L, Jones S, Gordon R D, Bachmann A W: Hormonal, immunological, and hematological responses to intensified training in elite swimmers. Med.Sci.Sports Exerc., 29: 1637-1645(1997)

131. Marchant A, Duchow J, Delville J P, Goldman M: Lipopolysaccharide induces up-regulation of CD14 molecule on monocytes in human whole blood. Eur.J.Immunol., 22: 1663-1665(1992)

132. Mars M, Govender S, Weston A, Naicker V, Chuturgoon A: High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? Biochem.Biophys.Res.Commun., 249: 366-370(1998)

133. Mathy N L, Scheuer W, Lanzendorfer M, Honold K, Ambrosius D, Norley S, Kurth R: Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. Immunology, 100: 63-69(2000)

134. Matzinger P: The danger model: a renewed sense of self. Science, 296: 301-305(2002)

135. Meeusen R, Duclos M, Foster C, Fry A, Gleeson M, Nieman D, Raglin J, Rietjens G, Steinacker J, Urhausen A: Prevention, diagnosis, and treatment of the overtraining syndrome: joint consensus statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. Med.Sci.Sports Exerc., 45: 186-205(2013)

136. Mehta RL, Lenert P, Zanetti M.: Synthetic peptides of human CD4 enhance binding of immunoglobulins tomonocyte/macrophage cells. II. Mechanisms of enhancement. Cell Immunology, 146-154(1994)

137. Meisel C, Schefold J C, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk H D: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 180: 640-648(2009)

138. Moestrup S K, Moller H J: CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. Ann.Med., 36: 347-354(2004)

139. Moller H J: Soluble CD163. Scand.J.Clin.Lab.Invest., 72: 1-13(2012)

140. Moller H J, Moestrup S K, Weis N, Wejse C, Nielsen H, Pedersen S S, Attermann J, Nexo E, Kronborg G: Macrophage serum markers in pneumococcal bacteremia: Prediction of survival by soluble CD163. Crit.Care Med., 34: 2561-2566(2006)

141. Monneret G, Elmenkouri N, Bohe J, Debard A L, Gutowski M C, Bienvenu J, Lepape A: Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. Clin.Chem., 48: 1589-1592(2002)

142. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard A L, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P: Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. Intensive Care Med., 32: 1175-1183(2006)

143. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A: Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. Mol.Med., 14: 64-78(2008)

144. Moreno R P, Metnitz P G, Almeida E, Jordan B, Bauer P, Campos R A, Iapichino G, Edbrooke D, Capuzzo M, Le Gall J R, SAPS 3 Investigators: SAPS 3--From evaluation of the patient to evaluation of the intensive care unit. Part 2: Development of a prognostic model for hospital mortality at ICU admission. Intensive Care Med., 31: 1345-1355(2005)

145. Morgado J M, Rama L, Silva I, de Jesus Inacio M, Henriques A, Laranjeira P, Pedreiro S, Rosado F, Alves F, Gleeson M, Pais M L, Paiva A, Teixeira A M: Cytokine production by monocytes, neutrophils,

and dendritic cells is hampered by long-term intensive training in elite swimmers. Eur.J.Appl.Physiol., 112: 471-482(2012)

146. Muller Kobold A C, Tulleken J E, Zijlstra J G, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg C G, Tervaert J W: Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. Intensive Care Med., 26: 883-892(2000)

147. Murphy K P, a Travers P: Janeway - Immunologie. 7 Aufl, Spektrum, Akad. Verl., (2009)

148. Neidhardt R, Keel M, Steckholzer U, Safret A, Ungethuem U, Trentz O, Ertel W: Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients. J.Trauma, 42: 863-70; discussion 870-1(1997)

149. Nierhaus A, Montag B, Timmler N, Frings D P, Gutensohn K, Jung R, Schneider C G, Pothmann W, Brassel A K, Schulte Am Esch J: Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. Intensive Care Med., 29: 646-651(2003)

150. Nuutila J, Hohenthal U, Laitinen I, Kotilainen P, Rajamaki A, Nikoskelainen J, Lilius E M: Simultaneous quantitative analysis of FcgammaRI (CD64) expression on neutrophils and monocytes: a new, improved way to detect infections. J.Immunol.Methods, 328: 189-200(2007)

151. Pahl M V, Vaziri N D, Connall T, Morrison D, Kim C, Kaupke C J, Wilson S E: Systemic upregulation of leukocyte integrins in response to lower body ischemia-reperfusion during abdominal aortic aneurysm repair. J.Natl.Med.Assoc., 97: 172-179(2005)

152. Pan L Y, Mendel D B, Zurlo J, Guyre P M: Regulation of the steady state level of Fc gamma RI mRNA by IFN-gamma and dexamethasone in human monocytes, neutrophils, and U-937 cells. J.Immunol., 145: 267-275(1990)

153. Park D R, Thomsen A R, Frevert C W, Pham U, Skerrett S J, Kiener P A, Liles W C: Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. J.Immunol., 170: 6209-6216(2003)

154. Park S M, Schickel R, Peter M E: Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. Curr.Opin.Cell Biol., 17: 610-616(2005)

155. Penninger J M, Irie-Sasaki J, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos A J: CD45: new jobs for an old acquaintance. Nat.Immunol., 2: 389-396(2001)

156. Perera P Y, Mayadas T N, Takeuchi O, Akira S, Zaks-Zilberman M, Goyert S M, Vogel S N: CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. J.Immunol., 166: 574-581(2001)

157. Perry S E, Mostafa S M, Wenstone R, Shenkin A, McLaughlin P J: HLA-DR regulation and the influence of GM-CSF on transcription, surface expression and shedding. Int.J.Med.Sci., 1: 126-136(2004)

158. Perry S E, Mostafa S M, Wenstone R, Shenkin A, McLaughlin P J: Is low monocyte HLA-DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis? Intensive Care Med., 29: 1245-1252(2003)

159. Philippidis P, Athanasiou T, Nadra I, Ashrafian H, Haskard D O, Landis R C, Taylor K M: Anti-inflammatory haemoglobin scavenging monocytes are induced following coronary artery bypass surgery. Eur.J.Cardiothorac.Surg., 37: 1360-1366(2010)

160. Phillips J H, Chang C W, Lanier L L: Platelet-induced expression of Fc gamma RIII (CD16) on human monocytes. Eur.J.Immunol., 21: 895-899(1991)

161. Piani A, Hossle J P, Birchler T, Siegrist C A, Heumann D, Davies G, Loeliger S, Seger R, Lauener R P: Expression of MHC class II molecules contributes to lipopolysaccharide responsiveness. Eur.J.Immunol., 30: 3140-3146(2000)

162. Pradeu T, Cooper E L: The danger theory: 20 years later. Front.Immunol., 3: 287(2012)

163. Qi X, Peng Y, Gu J, Li S, Zheng S, Zhang J, Wang T: Inflammatory cytokine release in patients with unstable angina after coronary angioplasty. Jpn.Heart J., 43: 103-115(2002)

164. Randolph G J, Sanchez-Schmitz G, Liebman R M, Schakel K: The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. J.Exp.Med., 196: 517-527(2002)

165. Ravetch J V, Bolland S: IgG Fc receptors. Annu.Rev.Immunol., 19: 275-290(2001)

166. Reid V L, Gleeson M, Williams N, Clancy R L: Clinical investigation of athletes with persistent fatigue and/or recurrent infections. Br.J.Sports Med., 38: 42-45(2004)

167. Rezzonico R, Imbert V, Chicheportiche R, Dayer J M: Ligation of CD11b and CD11c beta(2) integrins by antibodies or soluble CD23 induces macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta production in primary human monocytes through a pathway dependent on nuclear factor-kappaB. Blood, 97: 2932-2940(2001)

168. Robey E, Axel R: CD4: collaborator in immune recognition and HIV infection. Cell, 60: 697-700(1990)

169. Robson P: Elucidating the unexplained underperformance syndrome in endurance athletes : the interleukin-6 hypothesis. Sports Med., 33: 771-781(2003)

170. Rongcun Y, Maes H, Corsi M, Dellner F, Wen T, Kiessling R: Interferon gamma impairs the ability of monocyte-derived dendritic cells to present tumour-specific and allo-specific antigens and reduces their expression of CD1A, CD80 AND CD4. Cytokine, 10: 747-755(1998)

171. Rothe, G. , Sack U. , Tarnok A.: Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Rothe G (Hrsg) Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Karger, Basel, S. 27-34 (2007)

172. Rouphael N G, Talati N J, Vaughan C, Cunningham K, Moreira R, Gould C: Infections associated with haemophagocytic syndrome. Lancet Infect.Dis., 7: 814-822(2007)

173. Rowbottom D G, Keast D, Goodman C, Morton A R: The haematological, biochemical and immunological profile of athletes suffering from the overtraining syndrome. Eur.J.Appl.Physiol.Occup.Physiol., 70: 502-509(1995)

174. Salmon J E, Pricop L: Human receptors for immunoglobulin G: key elements in the pathogenesis of rheumatic disease. Arthritis Rheum., 44: 739-750(2001)

175. Schaer C A, Vallelian F, Imhof A, Schoedon G, Schaer D J: CD163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system. J.Leukoc.Biol., 82: 106-110(2007)

176. Schaer D J, Schaer C A, Buehler P W, Boykins R A, Schoedon G, Alayash A I, Schaffner A: CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. Blood, 107: 373-380(2006)

177. Schaer D J, Schleiffenbaum B, Kurrer M, Imhof A, Bachli E, Fehr J, Moller H J, Moestrup S K, Schaffner A: Soluble hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163 as a lineage-specific marker in the reactive hemophagocytic syndrome. Eur.J.Haematol., 74: 6-10(2005)

178. Scherberich J E, Nockher W A: Blood monocyte phenotypes and soluble endotoxin receptor CD14 in systemic inflammatory diseases and patients with chronic renal failure. Nephrol.Dial.Transplant., 15: 574-578(2000)

179. Schneider E M, Lorenz I, Muller-Rosenberger M, Steinbach G, Kron M, Janka-Schaub G E: Hemophagocytic lymphohistiocytosis is associated with deficiencies of cellular cytolysis but normal expression of transcripts relevant to killer-cell-induced apoptosis. Blood, 100: 2891-2898(2002)

180. Shek P N, Shephard R J: Physical exercise as a human model of limited inflammatory response. Can.J.Physiol.Pharmacol., 76: 589-597(1998)

181. Shephard R J: Adhesion molecules, catecholamines and leucocyte redistribution during and following exercise. Sports Med., 33: 261-284(2003)

182. Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W: Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. Lancet, 364: 545-548(2004)

183. Smith C W, Anderson D C, Taylor A A, Rossen R D, Entman M L: Leukocyte adhesion molecules and myocardial ischemia. Trends Cardiovasc.Med., 1: 167-170(1991)

184. Smith E P: Hematologic disorders after solid organ transplantation. Hematology Am.Soc.Hematol.Educ.Program., 2010: 281-286(2010)

185. Smith L L: Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? J.Strength Cond Res., 18: 185-193(2004)

186. Smith L L: Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? Med.Sci.Sports Exerc., 32: 317-331(2000)

187. Springer T A: Adhesion receptors of the immune system. Nature, 346: 425-434(1990)

188. Stefanou D C, Asimakopoulos G, Yagnik D R, Haskard D O, Anderson J R, Philippidis P, Landis R C, Taylor K M: Monocyte Fc gamma receptor expression in patients undergoing coronary artery bypass grafting. Ann.Thorac.Surg., 77: 951-955(2004)

189. Steinacker J M, Lormes W, Reissnecker S, Liu Y: New aspects of the hormone and cytokine response to training. Eur.J.Appl.Physiol., 91: 382-391(2004)

190. Stepp S E, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, Bhawan S, Certain S, Mathew P A, Henter J I, Bennett M, Fischer A, de Saint Basile G, Kumar V: Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Science, 286: 1957-1959(1999)

191. Steppich B, Dayyani F, Gruber R, Lorenz R, Mack M, Ziegler-Heitbrock H W: Selective mobilization of CD14(+)CD16(+) monocytes by exercise. Am.J.Physiol.Cell.Physiol., 279: C578-86(2000)

192. Sullivan K E, Delaat C A, Douglas S D, Filipovich A H: Defective natural killer cell function in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis and in first degree relatives. Pediatr.Res., 44: 465-468(1998)

193. Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Totsuka M, Sato K, Sugawara K: Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. Exerc.Immunol.Rev., 8: 6-48(2002)

194. Szabo G, Miller C L, Kodys K: Antigen presentation by the CD4 positive monocyte subset. J.Leukoc.Biol., 47: 111-120(1990)

195. Takeyama N, Yabuki T, Kumagai T, Takagi S, Takamoto S, Noguchi H: Selective expansion of the CD14(+)/CD16(bright) subpopulation of circulating monocytes in patients with hemophagocytic syndrome. Ann.Hematol., 86: 787-792(2007)

196. Tanner J E, Alfieri C: Epstein-Barr virus induces Fas (CD95) in T cells and Fas ligand in B cells leading to T-cell apoptosis. Blood, 94: 3439-3447(1999)

197. Tanskanen M, Atalay M, Uusitalo A: Altered oxidative stress in overtrained athletes. J.Sports Sci., 28: 309-317(2010)

198. te Velde A A, de Waal Malefijt R, Huijbens R J, de Vries J E, Figdor C G: IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. J.Immunol., 149: 4048-4052(1992)

199. Thylen P, Fernvik E, Haegerstrand A, Lundahl J, Jacobson S H: Dialysis-induced serum factors inhibit adherence of monocytes and granulocytes to adult human endothelial cells. Am.J.Kidney Dis., 29: 78-85(1997)

200. Ting J P, Trowsdale J: Genetic control of MHC class II expression. Cell, 109 Suppl: S21-33(2002)

201. Trimmel H, Luschin U, Kohrer K, Anzur C, Vevera D, Spittler A: Clinical outcome of critically ill patients cannot be defined by cutoff values of monocyte human leukocyte antigen-DR expression. Shock, 37: 140-144(2012)

202. Tron K, Manolov D E, Rocker C, Kachele M, Torzewski J, Nienhaus G U: C-reactive protein specifically binds to Fcgamma receptor type I on a macrophage-like cell line. Eur.J.Immunol., 38: 1414-1422(2008)

203. Tschaikowsky K, Hedwig-Geissing M, Schiele A, Bremer F, Schywalsky M, Schuttler J: Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients. Crit.Care Med., 30: 1015-1023(2002)

204. Tschoeke S K, Ertel W: Immunoparalysis after multiple trauma. Injury, 38: 1346-1357(2007)

205. Turina M, Dickinson A, Gardner S, Polk H C,Jr: Monocyte HLA-DR and interferon-gamma treatment in severely injured patients--a critical reappraisal more than a decade later. J.Am.Coll.Surg., 203: 73-81(2006)

206. Vallelian F, Schaer C A, Kaempfer T, Gehrig P, Duerst E, Schoedon G, Schaer D J: Glucocorticoid treatment skews human monocyte differentiation into a hemoglobin-clearance phenotype with enhanced heme-iron recycling and antioxidant capacity. Blood, 116: 5347-5356(2010)

207. van Furth R, Cohn Z A: The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. J.Exp.Med., 128: 415-435(1968)

208. Venet F, Lepape A, Monneret G: Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU - from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions. Crit.Care, 15: 231(2011)

209. Venet F, Tissot S, Debard A L, Faudot C, Crampe C, Pachot A, Ayala A, Monneret G: Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. Crit.Care Med., 35: 1910-1917(2007)

210. Vincent J L, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter P M, Sprung C L, Colardyn F, Blecher S: Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. Crit.Care Med., 26: 1793-1800(1998)

211. Walsh N P, Gleeson M, Shephard R J, Gleeson M, Woods J A, Bishop N C, Fleshner M, Green C, Pedersen B K, Hoffman-Goetz L, Rogers C J, Northoff H, Abbasi A, Simon P: Position statement. Part one: Immune function and exercise. Exerc.Immunol.Rev., 17: 6-63(2011)

212. Washington State University: . Available: http://www.vetmed.wsu.edu/tkp/search.aspx [11/10, 2012]

213. Watanabe Y, Lee S, Allison A C: Control of the expression of a class II major histocompatibility gene (HLA-DR) in various human cell types: down-regulation by IL-1 but not by IL-6, prostaglandin E2, or glucocorticoids. Scand.J.Immunol., 32: 601-609(1990)

214. Weaver L K, Pioli P A, Wardwell K, Vogel S N, Guyre P M: Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors. J.Leukoc.Biol., 81: 663-671(2007)

215. Webb D S, Shimizu Y, Van Seventer G A, Shaw S, Gerrard T L: LFA-3, CD44, and CD45: physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. Science, 249: 1295-1297(1990)

216. Weighardt H, Heidecke C D, Emmanuilidis K, Maier S, Bartels H, Siewert J R, Holzmann B: Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production. Surgery, 127: 309-315(2000)

217. Wong K L, Tai J J, Wong W C, Han H, Sem X, Yeap W H, Kourilsky P, Wong S C: Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. Blood, 118: e16-31(2011)

218. Wong K L, Yeap W H, Tai J J, Ong S M, Dang T M, Wong S C: The three human monocyte subsets: implications for health and disease. Immunol.Res., 53: 41-57(2012)

219. Wright S D, Levin S M, Jong M T, Chad Z, Kabbash L G: CR3 (CD11b/CD18) expresses one binding site for Arg-Gly-Asp-containing peptides and a second site for bacterial lipopolysaccharide. J.Exp.Med., 169: 175-183(1989)

220. Wu J F, Ma J, Chen J, Ou-Yang B, Chen M Y, Li L F, Liu Y J, Lin A H, Guan X D: Changes of monocyte human leukocyte antigen-DR expression as a reliable predictor of mortality in severe sepsis. Crit.Care, 15: R220(2011)

221. Yildirim N, Tekin I O, Dogan S M, Aydin M, Gursurer M, Cam F, Gungorduk A, Akoz A: Expression of monocyte and lymphocyte adhesion molecules is increased in isolated coronary artery ectasia. Coron.Artery Dis., 18: 49-53(2007)

222. Ziegler-Heitbrock H W, Ulevitch R J: CD14: cell surface receptor and differentiation marker. Immunol.Today, 14: 121-125(1993)

223. Ziegler-Heitbrock L: The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. J.Leukoc.Biol., 81: 584-592(2007)

224. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart D N, Leenen P J, Liu Y J, MacPherson G, Randolph G J, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn J M, Lutz M B: Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood, 116: e74-80(2010)

225. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart D N, Leenen P J, Liu Y J, MacPherson G, Randolph G J, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn J M, Lutz M B: Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood, 116: e74-80(2010)

# Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. hc. Michael Georgieff für die Möglichkeit, in seiner Abteilung zu promovieren.

Bei Prof. Dr. Manfred Weiss möchte ich mich ganz herzlich für die hervorragende Betreuung und Unterstützung beim Verfassen der Arbeit und sein beständiges Interesse an deren Fortgang und Gelingen bedanken.

Frau Prof. Dr. Marion Schneider danke ich vielmals für die zahlreichen Anregungen bei der Bearbeitung des Themas sowie für die Einführung in das spannende Gebiet der Immunologie und die Labortechniken.

Prof. Dr. Claus Doberauer, Prof. Dr. Markus Huber-Lang und Prof. Dr. Jürgen Steinacker möchte ich für die Bereitstellung der Patienten und klinischen Daten sowie die Unterstützung bei Rückfragen danken.

Vielen Dank auch Dr. Harald Hohmann für die theoretische und praktische Einarbeitung in die Methodik.

Darüber hinaus danke ich im Besonderen Herrn Prof. Josef Högel für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung.

Zudem danke ich meinen Mitdoktorandinnen Lina Brach und Zehra Güldü für die Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

# Curriculum vitae

*Aus Datenschutzgründen entfernt*