



Fakultät für Medizin
Klinikum rechts der Isar
Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
Experimentelle Unfallchirurgie

Analyse der Thrombozytenbeteiligung an der Ausbildung der posttraumatischen Immunantwort in einer klinisch experimentellen Studie.

Alexander Ditsch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel
Prüfer der Dissertation: Priv.-Doz. Dr. Marc Hanschen
Prof. Dr. Philipp Paprottka

Die Dissertation wurde am 14.07.2020 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät der Medizin am 29.12.2020 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
1 ZUSAMMENFASSUNG	7
2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	10
4 TABELLENVERZEICHNIS	11
5 EINLEITUNG	12
5.1 Polytrauma	12
5.2 SIRS, CARS, und MODS	12
5.3 Immunsystem	15
5.3.1 Einleitung	15
5.4 Th17-Zellen	15
5.4.1 Funktion	15
5.4.2 Entwicklung	16
5.5 CD4+ regulatorische T-Zellen	16
5.5.1 Funktion	16
5.5.2 Entwicklung	16
5.5.3 Populationen	17
5.5.4 Aktivierungsmarker CD69, CD62L, TNF-Rezeptor II, und GITR	18
5.6 Thrombozyten	19
5.6.1. Einleitung	19
5.6.2 Entstehung	19
5.6.3 Gerinnung	19
5.6.4 Immunfunktion	20
	3

5.6.5 Trauma	22
5.7 Durchflusszytometrie	22
5.7.1 Einleitung	22
5.7.2 Prinzip	23
5.7.3 Aufbau	23
5.7.4 Datenanalyse	23
5.8 ROTEM®	24
5.8.1 Methode	24
5.8.2 Tests	24
5.8.3 Messparameter	25
6 ZIELSETZUNG	26
7 MATERIAL UND METHODEN	28
7.1 Kollektiv	28
7.2 Blutentnahmen	28
7.3 Geräte	28
7.4 Verbrauchsmaterialien	29
7.4.1 Chemikalien und Puffer	29
7.4.2 Antikörper	29
7.5 Durchflusszytometrie	31
7.5.1 Funktionsprinzip Durchflusszytometrie	31
7.5.2 Färbung der CD4+ Tregs / Th17-Zellen und deren Aktivierungsparameter	31
7.5.3 Gating Strategie CD4+ Tregs/Th17-Zellen	31
7.5.4 Färbung Thrombozyten und deren Aktivierungsparameter	33
7.5.5 Gating Strategie Thrombozyten	34
7.6 Rotationsthromboelastometrie	34
7.6.1 Funktionsprinzip Rotationsthromboelastometrie	34

7.6.2 Durchführung Rotationsthromboelastometrie mit ROTEM® delta	35
7.7 Statistische Methoden	35
8 ERGEBNISSE	36
8.1 Patientenkollektiv	36
8.2 Charakterisierung der Aktivierung von CD4+ regulatorischen T-Zellen und Th17-Zellen	38
8.2.1 CD69	38
8.2.2 CD62L, TNF-R II, und GITR	39
8.3 Thrombozytäre Gerinnung	41
8.4 Plasmatische Gerinnung	42
8.5 Korrelation zwischen Immunologie und Gerinnung	45
9 DISKUSSION	46
9.1 Zusammenfassung	46
9.2 Diskussion der Methoden	46
9.2.1 Patientenkollektiv	46
9.2.2 Beobachtungszeitraum	47
9.2.3 Oberflächenmarker	48
9.2.4 Thromboelastometrie	51
9.3 Diskussion der Ergebnisse	52
9.3.1 Aktivierung von CD4+ Tregs und Th17-Zellen	52
9.3.2 Thrombozytäre Gerinnungs- und Immunfunktion	53
9.3.3 Plasmatische Gerinnung	55
9.3.4 Korrelation zwischen Immunologie und Gerinnung	56
10 SCHLUSSFOLGERUNG	58
10.1 Bedeutung der Studie	58
10.2 Ausblick	58

11 DANKSAGUNG

59

12 LITERATURVERZEICHNIS

60

1 Zusammenfassung

In dieser klinisch-experimentellen Arbeit wurde prospektiv die Aktivierung von CD4+ regulatorischen T-Zellen (CD4+ Tregs) und Th17-Zellen in Polytraumapatienten untersucht, die Ergebnisse wurden mit der Expansion und Aktivierung von Thrombozyten korreliert. Traumata stellen die häufigste Haupttodesursache in jungen Menschen unter 45 Jahren dar, dabei spielt die Dysregulation des Immunsystems vor allem für die späte Mortalität eine entscheidende Rolle. Während in den letzten Jahrzehnten ein deutlicher Fortschritt in der direkten Versorgung von Traumata zu verzeichnen ist, hat sich bei der Diagnostik und Therapie traumabedingter immunologischer Dysbalancen bisher wenig getan. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Aktivierung von CD4+ Tregs und Th17-Zellen nach Trauma, die Phänotypisierung der thrombozytären Gerinnung, sowie die Analyse deren Zusammenhang. Außerdem wurde parallel dazu die plasmatische Gerinnung untersucht. Dazu wurden in einer nicht-interventionellen klinischen Studie periphere Blutentnahmen zu neun verschiedenen Zeitpunkten, ab der Ankunft im Schockraum bis zehn Tage nach Aufnahme in der Klinik, untersucht. Zur Analyse der Expression von Aktivierungsmarkern wurden CD4+ Tregs und Th17-Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD69, CD62L, TNF-Rezeptor II, und G1TR angefärbt und mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Die Thrombozytenfunktion und plasmatische Gerinnung wurden mittels Rotationsthromboelastometrie (ROTEM®) analysiert. Außerdem wurden klinische Parameter und Daten aus Standard-Laborkontrollen zur Auswertung herangezogen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der CD69 Expression sowohl auf CD4+ Tregs, wie auch auf Th17-Zellen. Trotz unveränderter thrombozytärer Aktivierungsmarker zeigte sich ein deutlicher, signifikanter Anstieg der Thrombozytenzahl bei gleichzeitig abfallender thrombozytärer Gerinnungsfunktion. Daneben zeigte sich eine deutliche Zunahme der plasmatischen Gerinnungsfunktion. Wir konnten somit erstmals eine posttraumatische thrombozytäre Dysfunktion, sowie einen signifikanten Anstieg der Thrombozytenzahl, die signifikant mit dem Anstieg der Expression von CD69 auf CD4+ Tregs und Th17-Zellen korrelierte, nachweisen. Gleichzeitig stieg der Beitrag der plasmatischen Gerinnungsfaktoren zur Gerinnungsfunktion. Diese Erkenntnisse sollen dazu beitragen, das Verständnis der posttraumatischen Interaktion zwischen CD4+ Tregs und Thrombozyten im Menschen zu verbessern, um zukünftig immunologische Dysbalancen nach Trauma früher diagnostizieren und besser behandeln zu können.

2 Abkürzungsverzeichnis

AIS	Abbreviated Injury Scale
AK	Antikörper
ANV	Akutes Nierenversagen
APC	Allophycocyanin
ARDS	Acute respiratory distress syndrom
B	Regressionskoeffizient
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome
CD	Cluster of differentiation
CFT	Clot Formation Time
CRP	C-reaktivem Protein
CT	Clotting Time
DGU	Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FoxP3	Transkriptionsfaktor Forkhead Protein 3
FSC	Forward Scatter
GEE	Generalized estimating equations
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein
GPVI	Glycoprotein VI
HLA	Human Leukocyte Antigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
ISS	Injury Severity Score
KI	Konfidenzintervall
LI	Lyse Index
MCF	Maximum Clot Firmness
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
NETs	Neutrophil extracellular traps
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
PBA	4-Phenylbutyric acid
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Protein Kinase C
PMN	polymorphonukleäre Granulozyten
PRP	Platelet rich plasma
RORγ	Retinoid acid receptor-related orphan receptor gamma

Rotem	Rotational thromboelastometry
SD	Standard deviation
SE	Standard error
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SSC	Side Scatter
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TB	Trauma Bay
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-RII	Tumor necrosis factor receptor 2
Tregs	Regulatorische T-Zellen
vWF	Von-Willebrand-Faktor

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunologische Dysbalancen nach Trauma	15
Abbildung 2: Thromboelastometrie	25
Abbildung 3: Gating der CD4+ regulatorischen T-Zellen.....	32
Abbildung 4: Gating der Th17-Zellen	33
Abbildung 5: Gating der Thrombozyten.....	34
Abbildung 6: Relative Fluoreszenzintensität von CD69 auf CD4+ regulatorischen T-Zellen ...	38
Abbildung 7: Relative mediane Fluoreszenzintensität von CD69 auf Th17-Zellen.....	39
Abbildung 8: Relative mediane Fluoreszenzintensität von CD62L (L-Selektin)	40
Abbildung 9: Relative mediane Fluoreszenzintensität von TNF-Rezeptor II.....	40
Abbildung 10: Relative mediane Fluoreszenzintensität von GITR	41
Abbildung 11: Absolute Thrombozytenzahl in [1000/ μ l].....	42
Abbildung 12: Clot formation time (CFT) im extrinsischen Weg.	43
Abbildung 13: Clot formation time (CFT) im intrinsischen Weg.	43
Abbildung 14: Maximum clot firmness (MCF) im extrinsischen Weg.....	44
Abbildung 15: Maximum clot firmness (MCF) in fibtem.....	44
Abbildung 16: Maximum clot firmness (MCF) in intrinsischen Weg.....	45

4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zur Färbung der Lymphozyten verwendete Antikörper.....	30
Tabelle 2: Zur Färbung der Thrombozyten verwendete Antikörper.....	30
Tabelle 3: Deskriptive Statistik der Patientencharakteristika	37

5 Einleitung

5.1 Polytrauma

Mehr als 5 Millionen Menschen sterben jährlich an den direkten und indirekten Folgen von Verletzungen. Das entspricht neun Prozent aller weltweiten Todesfälle (WHO, 2014). Bei jungen Menschen in der Altersgruppe bis 45 Jahre stellen Verletzungen die häufigste Todesursache dar (MacKenzie, 2000; D. D. Trunkey, 1983; Wick et al., 1997). Dabei verursachen Unfälle und Verletzungen in den USA einen größeren Verlust an Lebensjahren, als Krebs und Herzerkrankungen (Donald D. Trunkey, 1983). Ein Polytrauma bezeichnet dabei mehrere gleichzeitig entstandene Verletzungen verschiedener Körperregionen, von denen mindestens eine oder die Kombination mehrerer Verletzungen lebensbedrohlich ist (Definition nach Harald Tscherne). Neben den rein medizinischen Kosten sind auch die wirtschaftlichen Kosten, die durch Folgen von Unfällen und Verletzungen entstehen, nicht zu vernachlässigen. So schätzt die Amerikanische Vereinigung für Unfallchirurgie, dass die mit Verletzung verbundenen Todesfälle die Vereinigten Staaten allein im Jahr 2005 136 Milliarden Dollar gekostet haben (<http://www.aast.org/GeneralInformation/costofinjury.aspx>). Während die frühe Mortalität nach Trauma hauptsächlich bedingt ist durch primäre Hirnverletzungen oder erheblichen Blutverlust, ist die späte Mortalität vornehmlich auf sekundäre Hirnverletzungen oder eine beeinträchtigte Immunfunktion zurückzuführen (Keel & Trentz, 2005). Die genauen Mechanismen dieser Immunaktivierung nach Polytrauma sind bis heute noch wenig verstanden und bedürfen dringend weiterer Grundlagenforschung, um in Zukunft Diagnostik und Therapie schwer verletzter Patienten zu verbessern.

5.2 SIRS, CARS, und MODS

Schwere Verletzungen gehen häufig mit einem erheblichen Gewebeschaden einher. Diese Gewebeschädigung aktiviert das Immunsystem zunächst nur lokal, kann sich im Verlauf allerdings auch systemisch ausbreiten. Wird dann keine Homöostase zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren mehr hergestellt, kann sich daraus ein systemisches inflammatorisches Response-Syndroms (SIRS) entwickeln. Ein SIRS, eine systemische Entzündungsreaktion des Organismus, stellt einen entscheidenden Risikofaktor für die hohe Mortalität nach schweren Verletzungen dar (Lenz et al., 2007). Bis zu 90 Prozent der Polytrauma Patienten entwickeln in der ersten Woche nach Trauma ein SIRS (Hoover et al., 2006). Vor allem Zellen und Mediatoren des angeborenen Immunsystems spielen hier eine

wichtige Rolle. Hauptsächlich involviert bei der Entwicklung eines SIRS sind polymorphonukleäre Granulozyten (PMN), Monozyten und Lymphozyten; aber auch Makrophagen, Parenchymzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind in dem komplexen Prozess der Immunantwort beteiligt (van Griensven et al., 2003). Durch die gleichzeitige Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen können Endothelschäden entstehen (Neunaber et al., 2011). Als Entzündungsmediatoren werden vor allem die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8, TNF- α , und IL-1 β ausgeschüttet (Neunaber et al., 2011). IL-6 triggert die Freisetzung von C-reaktivem Protein (CRP) und Procalcitonin (PCT), hemmt die Apoptose von neutrophilen Granulozyten und aktiviert natürliche Killerzellen (Hildebrand et al., 2005), gleichzeitig wirkt es aber auch anti-inflammatorisch, indem es die Freisetzung von löslichen TNF-Rezeptoren und IL-1 Rezeptor-Antagonisten fördert (Tilg et al., 1994; Xing et al., 1998). IL-6 Plasmakonzentrationen korrelieren außerdem mit dem Schweregrad des Traumas nach Injury Severity Score (ISS) und werden als einer der besten Outcome-Parameter für Polytrauma Patienten angesehen (Gebhard et al., 2000).

Ein SIRS kann dabei Organe schädigen, die keinen Bezug zum ursprünglichen Trauma haben und zu Akutem Lungenversagen (ARDS), Akutem Nierenversagen (ANV), Schock, und bis hin zu einem Multiorganversagen (MODS) führen. Dabei geht man davon aus, dass das primäre Trauma das Immunsystem derart beeinflusst, dass ein zweites relativ harmloses Ereignis genügt, um eine starke systemisch Entzündungsreaktion und die Entwicklung eines MODS auszulösen (Two-Hit Hypothese) (Butt & Shrestha, 2008). Ein MODS ist ein schweres Krankheitsbild, das einer intensivmedizinischen Behandlung bedarf, und dennoch häufig mit einer Mortalität von 30 bis 80 Prozent einhergeht (Baue et al., 1998).

Für die Diagnose SIRS müssen mindestens 2 der 4 folgenden Kriterien vorliegen (Herold, 2017):

1. Körpertemperatur $\geq 38^{\circ}\text{C}$ oder $\leq 36^{\circ}\text{C}$ (Hyperthermie oder Hypothermie)
2. Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$ (Tachykardie)
3. Atemfrequenz $\geq 20/\text{min}$ (Tachypnoe) oder Hyperventilation mit $\text{pCO}_2 \leq 32 \text{ mmHg}$
4. Leukozyten im Blutbild $\geq 12.000/\mu\text{l}$ (Leukozytose) oder $\leq 4.000/\mu\text{l}$ (Leukopenie) oder Linksverschiebung ($> 10\%$ unreife Granulozyten im Differentialblutbild)

Die Gründe für ein SIRS können vielfältig sein und umfassen unter anderem: Bakterielle Infektionen, Traumata, Verbrennungen, Pankreatitis, Blutungen, große Operationen und andere schwere Erkrankungen.

Das Immunsystem versucht dieser systemischen Entzündung mit einer kompensatorischen Reaktion entgegenzuwirken. Diese Reaktion, als kompensatorisches anti-inflammatorisches Response-Syndrom (CARS) bezeichnet, ist eine komplexe Reaktion des Immunsystems, bei der dieses kompensatorisch gehemmt wird (Bone, 1996a, 1996b). Dabei werden anti-inflammatorische Mediatoren freigesetzt werden, unter anderem IL-4, IL-10, IL-13, und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) (Collighan et al., 2004; Cox, 1996; Ertel et al., 1996). Einer der bedeutendsten Mediatoren ist dabei sicherlich IL-10, das verschiedene immunsuppressive Funktionen aufweist (Oberholzer et al., 2002), und nicht nur T-Zell Populationen beeinflusst, sondern vor allem auch durch die Herunterregulation von TNF immunsuppressiv wirkt (MacNeil et al., 1990). Dabei hat IL-10 im Tiermodell allerdings sowohl positive (Howard et al., 1993), als auch negative Auswirkungen (Steinhauser et al., 1999) auf das Outcome nach Sepsis gezeigt. Auch Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle, insbesondere CD4+ regulatorische T-Zellen (CD4+ Tregs), die die T-Zell Antwort unterdrücken, und natürliche Killerzellen, sowie gamma-delta T-Zellen hemmen (Ward et al., 2008). Während man früher noch ein zweiphasiges Modell der posttraumatischen Immunreaktion annahm (Moore et al., 1996), geht man heute davon aus, dass pro- und anti-inflammatorische Reaktionen parallel ablaufen (Hotchkiss et al., 2013). Normalerweise überwiegen die positiven Wirkungen dieser Mediatoren. Erst ein Ungleichgewicht zwischen diesen Kräften ist schädlich und kann zu Schock, Barriere- und Gerinnungsstörungen, sowie Anergie und Immunsuppression führen. Pro- und anti-inflammatorische Mediatoren können sich dabei gegenseitig verstärken und zu zunehmend destruktiver immunologischer Dissonanz führen (Bone, 1996a).

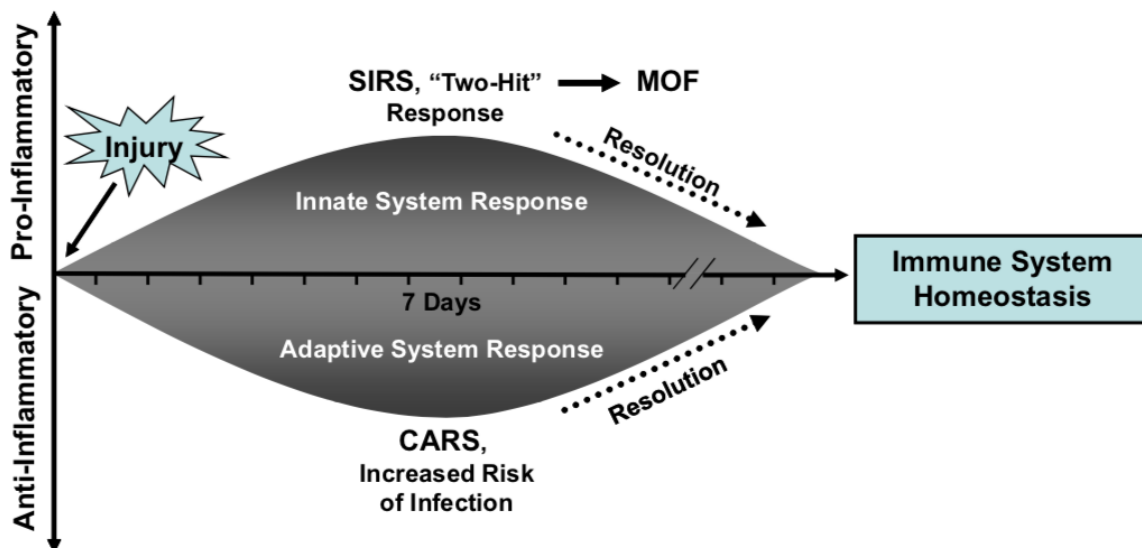


Abbildung 1: Immunologische Dysbalancen nach Trauma: Schwere Traumata können ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Reaktionen auslösen. Dysbalancen in der Immunregulation können zu Organschäden bis hin zu Multiorganversagen, oder auch zu Infektionen führen (Abb. entnommen aus: Stoecklein, Osuka, & Lederer, 2012).

5.3 Immunsystem

5.3.1 Einleitung

Polytraumata gehen einher mit deutlichen Veränderungen im Phänotyp und Aktivierungsprofil von zirkulierenden Lymphozyten (Walsh et al., 2000). Besonders Th17-Zellen und CD4+ Tregs sind bei der Kontrolle von Immunantworten von Bedeutung und werden durch Verletzungen und Sepsis beeinflusst (Venet et al., 2008).

5.4 Th17-Zellen

5.4.1 Funktion

Th17-Zellen sind ein Subtyp von T-Helferzellen, die in der Abwehr von Bakterien (vor allem extrazellulären bakteriellen Infektionen) und Pilzen beteiligt sind, und auch in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen; die Oberflächenexpression von IL-17A ist dabei ein spezifischer Marker von Th17-Zellen (Brucklacher-Waldert et al., 2009). Sie sind in vielen Bereichen des erworbenen Immunsystems die Hauptquelle für IL-17 (Park et al., 2005) und können durch dessen Sekretion die Aktivierung von CD8+ T-Zellen bewirken (Martin-Orozco et al., 2009). Insbesondere auch nach schweren Traumata konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-17A auf Th17-Zellen deutlich zunimmt (Hefele et al., 2019). Weitere Sekretionsprodukte sind IL-17F, IL-21, IL-22, IL-6, und TNF- α . Rezeptoren für diese Zytokine befinden sich auf verschiedensten Immunzellen, darunter neutrophile Granulozyten,

Lymphozyten, Epithel-, Endothel-, und Fibroblastenzellen. Die sezernierten Botenstoffe führen in den Zielzellen zu Entzündungsprozessen und zum Einwandern von weiteren Immunzellen ins betroffene Gewebe.

5.4.2 Entwicklung

Th17-Zellen entwickeln sich aus naiven T-Helferzellen. Für ihre Entwicklung, Differenzierung und Überleben stellen TGF β , IL-6, IL-21, und IL-23 wichtige Faktoren dar (Serrano Hernandez, 2009). Außerdem wird für deren Differenzierung eine Reihe von Transkriptionsfaktoren benötigt, darunter signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), retinoid acid receptor-related orphan receptor gamma (ROR γ), und nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) (Dong, 2011; Jin & Dong, 2013).

CD4⁺ Tregs spielen bei der Regulation von Th17-Zellen eine wichtige Rolle. Die beiden Subtypen beeinflussen sich gegenseitig, und vor allem das Verhältnis von Th17-Zellen zu CD4⁺ Tregs scheint einen bedeutenden Einfluss auf die Entwicklung und das Outcome von inflammatorischen und autoimmunen Erkrankungen zu haben (Noack & Miossec, 2014).

5.5 CD4⁺ regulatorische T-Zellen

5.5.1 Funktion

CD4⁺ regulatorische T-Zellen (CD4⁺ Tregs) stellen eine Subgruppe von T-Zellen dar, die anti-inflammatorische Wirkung auf den Organismus zeigen und damit zur Selbsttoleranz des Immunsystems beitragen. Sie wurden zuerst charakterisiert durch die Expression von CD25 und machen ca. 10% der CD4-positiven T-Zellen aus (Stoecklein et al., 2012). Sakaguchi und Kollegen zeigten 1995 zum ersten Mal, dass die Immunsuppression von einem Subset an T-Lymphozyten ausgeht, die sowohl CD4, als auch CD25 exprimieren (Sakaguchi et al., 1995). Seitdem begann die Forschung nach regulatorischen T-Zellen und deren Funktion, und ist in den letzten zwei Jahrzehnten deutlich gewachsen. CD4⁺ Tregs beeinflussen das Immunsystem durch Zell-Zell-Kontakte sowie durch die Sekretion von Zytokinen. Außerdem regulieren CD4⁺ Tregs die TLR-stimulierte Zytokinproduktion und beeinflussen so die inflammatorische Reaktion nach Trauma (Murphy et al., 2005).

5.5.2 Entwicklung

CD4⁺ Tregs stammen wie alle T-Zellen aus dem Knochenmark und entwickeln und differenzieren sich im Thymus weiter. Dort beginnt auch die Transkription von FoxP3 und die Differenzierung in verschiedene Subtypen. CD4⁺ Tregs entwickeln dabei eine höhere TCR

Diversität als Effektor T-Zellen. Ein großes Repertoire an TCR wird benötigt, damit eine optimale Immunregulation durch CD4+ Tregs gewährleistet werden kann (Fohse et al., 2011). Die TCR-Spezifität spielt eine entscheidende Rolle für die periphere Umwandlung von CD4+ Tregs und die Anpassung an die lokale Antigen-Landschaft (Lathrop et al., 2008). CD4+ Tregs scheinen dynamisch auf lokale Antigen-Umgebung zu reagieren (Walker et al., 2003). TNF kommt eine besondere Bedeutung bei der Regulation des Immunsystems zu, da es die Aktivität von CD4+ Tregs hemmt und damit deren immunsuppressive Funktion beeinflusst (Valencia et al., 2006). Auch Umweltfaktoren beeinflussen maßgeblich die Entwicklung und Differenzierung, Migration, und Funktion von regulatorischen T-Zellen; dabei spielen klassische Zytokine eine entscheidende Rolle, aber auch andere Faktoren wie Nahrungsmetabolite, Katabolite, Bakterienbestandteile und das Mikrobiom beeinflussen Entwicklung und Funktion dieser Lymphozyten (Hoepli et al., 2015). Auch Verletzungen können CD4+ Treg Funktionen induzieren oder verstärken, und deren Entwicklung kann zur Immunsuppression nach Verletzungen beitragen (Ni Choileain et al., 2006). Durch Verbrennungsverletzungen beispielsweise werden TCR-Signalwege in regulatorischen T-Zellen aktiviert (Hanschen et al., 2011).

Der Transkriptionsfaktor Forkhead Protein 3 (FoxP3) beeinflusst maßgeblich die Entwicklung und Funktion der CD4+ Tregs (Wan & Flavell, 2007), weshalb dieser häufig als Marker für die Identifikation von CD4+ Tregs verwendet wird. FoxP3 wirkt dabei als Repressor der Transkription und reguliert die Aktivität von CD4+ Tregs (Schubert et al., 2001). Außerdem kommt ihm auch in der Entwicklung und Funktion von CD4+ Tregs eine entscheidende Bedeutung zu (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Allerdings ist FoxP3 nicht spezifisch für CD4+ Tregs und wird auch auf anderen Lymphozytensubtypen exprimiert. Studien zeigten außerdem, dass die Spezifität und Sensitivität von CD4+ CD127^{low} Zellen vergleichbar ist mit der von CD4+ FoxP3⁺ Zellen, und als Alternative zu Identifikation von CD4+ Tregs verwendet werden kann, wobei diese Methode sogar mit weniger Antikörpern durchführbar und kostengünstiger ist (Dasgupta et al., 2013).

5.5.3 Populationen

Man unterscheidet mindestens 5 Subgruppen von regulatorischen T-Zellen: CD4+ nTregs inklusive inducing costimulator (ICOS)⁺ Tregs, CD4+ inducible/adaptive iTregs, CD4+ (IL)-10-produzierende Typ 1 Tregs (Tr1 Zellen), CD8+ Tregs, und CD4+ IL-17-produzierende Tregs (Zhang et al., 2014). Die genauen Rollen dieser Subpopulationen sind bisher allerdings noch

nicht klar, und Gegenstand aktueller Forschung. In anderen Publikationen werden außerdem im Thymus gebildete tTregs von in der Peripherie aus naiven T-Zellen entstandenen pTregs unterschieden. Die Nomenklatur der beschriebenen Subpopulationen ist bisher noch uneinheitlich, könnte sich aber in Zukunft mit besserem Verständnis derer Rollen und Funktionsmechanismen angleichen.

Der Nutzen von CD4⁺ Tregs auf das Outcome nach SIRS und Sepsis ist dabei noch nicht vollständig geklärt. Eine Studie am Mausmodell zeigte, dass der Transfer von in-vitro stimulierten CD4⁺ Tregs im Sepsis-Modell protektiv war (Heuer et al., 2005). Andere Studien konnten trotz Zunahme der Zellzahl und Steigerung der immunsuppressiven Funktion keinen Nutzen für das Gesamtüberleben im Sepsis-Modell nachweisen (Scumpia et al., 2006; Wisnoski et al., 2007).

5.5.4 Aktivierungsmarker CD69, CD62L, TNF-Rezeptor II, und GITR

CD69, CD62L, TNF-Rezeptor II, und GITR sind etablierte Aktivierungsmarker auf Lymphozyten.

CD69 ist ein Transmembran-Glykoprotein vom Typ II, mit einer extrazellulären C-Typ-Lektin-Bindungsdomäne (Marzio et al., 1999). Es ist ein frühes Leukozytenaktivierungsmolekül (Sancho et al., 2005), und trägt über die Produktion von TGF- β und IL-2 zur Differenzierung von CD4⁺ Tregs bei (Cibrian & Sanchez-Madrid, 2017). CD69 wird zu Beginn einer Immunreaktion durch NF- κ B hochreguliert und bei Aktivierung auf T- und B-Zellen exprimiert (Risso et al., 1991). Es wird auf vielen hämatopoetischen Zellen exprimiert (Testi et al., 1994), meist jedoch zum Nachweis einer Aktivierung von Lymphozyten und NK-Zellen verwendet. Im Mausmodell zeigte CD69 eine TGF- β 1-vermittelte negative Rückkopplung auf Immunreaktivität und Entzündungsreaktion (Sancho et al., 2003).

CD62L (L-Selektin) trägt in Immunreaktionen zur Leukozytenmigration bei (Wedepohl et al., 2012). Es spielt eine wesentliche Rolle bei der Migration von Lymphozyten in lymphatisches Gewebe und im Bereich von Entzündungsherden (Arbones et al., 1994).

TNF-RII (CD120) ist ein Membranrezeptor der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Superfamilie und wird nur auf Lymphozyten, überwiegend auf regulatorischen T-Zellen, exprimiert. Er trägt entscheidend zu Aktivierung, Proliferation und Funktion CD4⁺ Tregs bei, und scheint für deren immunsuppressive Aktivität sogar bedeutender zu sein als CD25 (Chen & Oppenheim, 2011). TNF-RII wird durch die Bindung von TNF- α aktiviert, was einen stimulierenden Effekt auf T-Lymphozyten ausübt.

Glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR) ist ein ko-stimulierendes Immun-Checkpoint-Molekül. GITR spielt eine Schlüsselrolle bei der Selbsttoleranz durch CD4+ Tregs, hemmt das Überleben von CD4+ Tregs und verlängert das Überleben von T-Effektorzellen. Studien zeigen, dass GITR eine entscheidende Rolle bei der immunologischen Selbsttoleranz durch CD4+ Tregs spielt (Shimizu et al., 2002).

In vielen Studien werden die verwendeten Oberflächenantikörper als Marker für die Aktivierung von CD4+ Tregs verwendet, da sie bei deren Aktivierung vermehrt exprimiert werden. Sie gelten daher als etabliert (Chen & Oppenheim, 2011; Grailer et al., 2009; Ronchetti et al., 2004; Ziegler et al., 1994)

5.6 Thrombozyten

5.6.1. Einleitung

Thrombozyten sind zellkernlose Blutbestandteile, denen (zusammen mit den plasmatischen Gerinnungsfaktoren) eine hohe Bedeutung bei der Blutstillung zukommt. Sie entstehen als Abschnürungen von Megakaryozyten des Knochenmarks, sind bikonvex (Jain, 1975) und haben einen Durchmesser von 2-3 μ m (Paulus, 1975). Thrombozyten werden nur in Säugetieren gefunden, eine Thrombozytenanzahl von 150.000 – 450.000/ μ l gilt als Normalwert. Neben ihrer Bedeutung für die Gerinnung spielen sie eine Rolle in Prozessen der angeborenen (Gaertner & Massberg, 2016) und erworbenen (Hampton, 2018) Immunreaktion.

5.6.2 Entstehung

Die Produktion von Thrombozyten wird durch Thrombopoetin reguliert, das in der Leber und Niere gebildet wird (Deutsch & Tomer, 2006). Megakaryozyten produzieren täglich 10^{11} Thrombozyten, deren Lebensdauer durchschnittlich 8-10 Tage beträgt (Harker et al., 2000; Kaushansky, 2005). Abgebaut werden Thrombozyten vor allem in der Milz und Lunge, ein geringer Teil außerdem in der Leber.

5.6.3 Gerinnung

Man unterscheidet eine primäre von einer sekundären Hämostase. Bei der primären Hämostase sind vor allem Thrombozyten beteiligt, während für die sekundäre Hämostase im Blutplasma enthaltene Gerinnungsfaktoren und Fibrin eine Rolle spielen. Man kann die primäre Hämostase in Adhäsion, Aktivierung, und Aggregation der Thrombozyten einteilen,

wobei diese Phasen nicht strikt voneinander getrennt werden können und sich gegenseitig überschneiden.

Eine Thrombenbildung wird in intakten Gefäßen durch die endotheliale Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin, CD39, sowie durch inhibitorische Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche, intrazelluläre inhibitorische Rezeptoren und weitere hemmende Signalwege, verhindert (Jones et al., 2012; Marcus et al., 2005; Palmer et al., 1987). Bei einer Endothelverletzung werden subendotheliale Strukturen freigelegt und Thrombozyten durch Kollagen, von-Willebrand-Faktor (VWF), Thrombin, ADP und weitere Faktoren aktiviert. Die Bindung von subendotheliale Kollagen an $\alpha_2\beta_1$ und Glycoprotein VI (GPVI), sowie über von-Willebrand Faktor an $\alpha_{IIb}\beta_3$ und an Glycoprotein Ib-IX-V führt dann zu Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten (Dubois et al., 2006). Die Aktivierung führt zu einer Morphologieänderung der Thrombozyten, der Ausbildung von Pseudopodien, und der Sekretion von intrazellulären Granula, die chemotaktisch weitere Thrombozyten an die Stelle der Endothelverletzung anziehen. Thrombozyten interagieren außerdem neben von-Willebrand Faktor und Fibrin auch mit Thrombin, Faktor Va, VIIa, IX, X, XI, und Prothrombin (Ahmad et al., 1992; Bouchard et al., 2010). Durch die Aktivierung der plasmatischen Hämostase wird das, zuvor als „weißer Thrombus“ bezeichnete, vorerst noch instabile Gerinnsel stabilisiert. Es kommt schließlich zu einem Verschmelzen der Thrombozyten und einer irreversiblen Aggregation. Da in das Netz aus Fibrin und Thrombozyten auch Erythrozyten eingefangen werden, wird das so entstandene Gerinnsel dann als „roter Thrombus“ bezeichnet.

Die Gerinnung mittels primärer und sekundärer Hämostase dient allerdings nur vorübergehend der Unterbrechung der Blutung. Langfristig wird das geschädigte Gewebe durch Reparaturprozesse ersetzt. Physiologische Prozesse tragen zum Umbau des Gewebes bei. Das Gerinnsel wird mittels Plasmin, das als proteolytisches Enzym Fibrin in lösliche Polypeptide spaltet, aufgelöst. Plasmin spaltet auch Fibrinogen, Prothrombin, und die Gerinnungsfaktoren V, VIII, IX, XI, und XIII (Schmidt, 2011). Die Thrombozyten werden im Verlauf phagozytiert (Movat et al., 1965).

5.6.4 Immunfunktion

Neben ihrer Rolle bei der Blutgerinnung, haben Thrombozyten auch Einfluss auf angeborene und erworbene Immunreaktionen (Weyrich & Zimmerman, 2004). Sie sind an entzündlichen Prozessen beteiligt, interagieren mit Bakterien (Kerrigan & Cox, 2010) und können bakterielle

Peptidoglykane und Lipopolysaccharide über Toll-like Rezeptoren wie TLR2 und TLR4, erkennen (Semple et al., 2011). Außerdem können bei Aktivierung durch die Expression von Oberflächenrezeptoren und Freisetzung verschiedener Moleküle, Immunantworten verstärkt werden (Semple et al., 2011). Eine Übersicht über von Thrombozyten ausgeschütteten Mediatoren bei Entzündungen zeigen Klinger und Jelkmann (Klinger & Jelkmann, 2002). Über den Einfluss von Thrombozyten auf das Outcome in SIRS und Sepsis gibt es in der Literatur widersprüchliche Daten. Einerseits tragen Thrombozyten zur Hyperinflammation, Sepsis und Mikrothrombose bei, und sind darüber hinaus an der Entwicklung Sepsis-bedingter Komplikationen wie Akutem Nierenversagen oder Akutem Lungenversagen beteiligt (de Stoppelaar et al., 2014). Klinische Daten zeigten einen Zusammenhang zwischen der Behandlung mit Thrombozytenaggregationshemmern und einer verringerten Kurzzeit-Mortalität, niedrigerer Prävalenz von Akutem Lungenversagen, und geringerer Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Behandlung (Akinosoglou & Alexopoulos, 2014). Andererseits war eine erhöhte Thrombozytenfunktion in einer klinischen Studie mit einer verringerten Mortalität assoziiert (Adamzik et al., 2012).

Durch die Aktivierung der Gerinnung können Infektionen eingegrenzt werden, was als Immunthrombose bezeichnet wird, und dazu dienen soll, die Ausbreitung von Infektionen lokal zu kontrollieren (Gaertner & Massberg, 2016). Thrombozyten können darüber hinaus direkt die Aktivität von Neutrophilen, Endothelzellen und Lymphozyten beeinflussen, sie können zusammen mit Neutrophilen die Freisetzung von neutrophil extracellular traps (NETs) induzieren, und pathogene Krankheitserreger internalisieren und infizierte Zellen direkt abtöten (Jenne et al., 2013). Sie verbessern nicht nur die Antigenpräsentation und die CD8+ T-Zell Reaktionen, sondern haben auch eine Bedeutung bei der T-Zell abhängigen humoralen Immunität (Elzey et al., 2005). Thrombozyten regulieren besonders auch die Immunantworten durch Th1, Th17, und regulatorische T-Zellen, wobei sie fördernd auf regulatorische T-Zellen wirken, auf die Aktivierung von Th1/Th17-Zellen jedoch einen biphasischen Einfluss zu haben scheinen (Zhu et al., 2014). Dabei spielen Zell-Zell-Kontakte, verschiedene Chemokine, wie Platelet factor 4, aber auch die Expression des CD40 Liganden eine Rolle (Gerdes et al., 2011; Lievens et al., 2010; C. Y. Liu et al., 2005). In SIRS und Sepsis wird häufig eine Aktivierung von Thrombozyten gefunden, wobei eine Thrombozytopenie mit einem schlechten Outcome assoziiert ist (Katz et al., 2011; Russwurm et al., 2002; Vincent et al., 2002). Die Thrombozytenaktivierung kann darüber hinaus einen Hinweis auf die spätere Entwicklung von

Multiorganversagen geben (Lundahl et al., 1998). Durch Sepsis wird allerdings auch die thrombozytäre Gerinnungsfunktion beeinflusst und die VEGF-Freisetzung erhöht (Yaguchi et al., 2004).

Darüber hinaus sind Thrombozyten in chronisch inflammatorischen Prozessen wie Synovitis oder Rheumatoider Arthritis involviert (Boilard et al., 2010).

5.6.5 Trauma

Thrombozyten beeinflussen die Gerinnung nach schweren Traumen maßgeblich (R. A. Davenport & Brohi, 2009). Verletzungen führen zu einer erhöhten Thrombozytenaktivierung und schnelleren Adhäsion und Aggregation (R. Davenport, 2013). Schwere Verletzungen führen normalerweise zu einer verstärkten Thrombozytenaktivierung und -funktion (Jacoby et al., 2001). Allerdings weisen einige Studien auf eine thrombozytäre Dysfunktion nach Trauma hin (Kutcher et al., 2012).

Die Inzidenz von Gerinnungsstörungen nach Trauma ist hoch, und gilt als unabhängiger Prädiktor für die Mortalität (MacLeod et al., 2003). Schon eine leicht verminderte Thrombozytenaktivierung scheint ein Zeichen für eine Koagulopathie zu sein, die mit einer erhöhten Mortalität in Traumapatienten einhergeht (Solomon et al., 2011). Auch eine erhöhte Thrombozytenaktivierung mit verminderter Thrombozytenfunktion ist mit erhöhter Mortalität assoziiert (Jacoby et al., 2001). In einer deutschen Studie mit 8724 Patienten war das Vorliegen einer Trauma-bedingten Koagulopathie mit der Verletzungsschwere und einem verminderten Outcome assoziiert (Maegele et al., 2007). Und Brown und Kollegen zeigten in einer klinischen Studie, dass die Thrombozytenzahl umgekehrt mit der 24-Stunden Mortalität und Transfusion von Blutprodukten korrelierte (Brown et al., 2011).

5.7 Durchflusszytometrie

5.7.1 Einleitung

Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das die Analyse von in Flüssigkeit suspendierten Zellen oder Partikeln erlaubt (Shapiro, 2003). Dabei wird mittels Laserstrahlen idealerweise jede Zelle einzeln erfasst und anhand des Streulichts, das für verschiedene Zellen charakteristisch ist, analysiert. Es können außerdem Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, um besondere Eigenschaften zu analysieren. Darüber hinaus sind bestimmte Geräte fähig, Zellen anhand derer Eigenschaften oder Fluoreszenzmarkierung in unterschiedliche Gefäße zu sortieren (sog. Flow Sorter) (Cossarizza et al., 2017).

5.7.2 Prinzip

Zellen oder Partikel, die zuvor in einer Flüssigkeit suspendiert und gegebenenfalls mittels Fluoreszenzantikörpern markiert wurden, werden von dem Gerät aufgenommen und, durch einen Hüllstrom fokussiert, durch den Messbereich des Durchflusszytometers geführt. Dort treffen mehrere Laserstrahlen auf die Probe, und das Streulicht- und Fluoreszenzsignal wird durch einen Detektor ausgewertet. Während das Vorwärtsstreulicht (FSC) Rückschlüsse auf das Volumen einer Zelle oder eines Partikels erlaubt, können anhand des Seitwärtsstreulichts (SSC) die Granularität, Zellkerneigenschaften, und die Vesikelmenge einer Zelle bestimmt werden. Mittels antikörpergebundener Fluorophore können Oberflächenproteine von Zellen identifiziert werden. Jedes Fluorophor hat spezielle Anregungs- und Emissionswellenlängen, die sich teilweise auch überschneiden. Abhängig von Wellenlängenspektrum der eingesetzten Fluorophore, und der Anzahl der Laser und Detektoren eines Durchflusszytometers, lassen sich somit Zellen mit unterschiedlich vielen Fluorophoren anfärben, und dementsprechend unterschiedlich viele Oberflächenproteine einer Zelle identifizieren.

5.7.3 Aufbau

Ein Durchflusszytometer besteht aus einer Messzelle, durch die die Probe, in einem Hüllstrom geleitet, befördert wird, und in der die Messung der Probe stattfindet. Dabei wird die Probe mittels einer Lichtquelle, meist mehreren Lasern, bestrahlt. Da unterschiedliche Fluorophore überlappende Wellenlängenspektren besitzen, werden optische Filter und teildurchlässige Spiegel verwendet, um die Fluoreszenzsignale aufzutrennen. Diese werden dann von Detektoren aufgenommen, das Signal häufig noch mittels Photomultipliern verstärkt, und anschließend im Computer verarbeitet.

5.7.4 Datenanalyse

Am Computer kann eine Farbkompensation für sich überlappende Wellenlängenspektren von Fluorophoren durchgeführt werden (Roederer, 2001). Die Daten können ein-, zwei-, oder dreidimensional dargestellt werden, und mittels „Gates“ können Teilmengen einzeln analysiert werden. Darüber hinaus existieren mittlerweile schon automatisierte Algorithmen zur Identifikation von Zellpopulationen, ebenso gibt es ein offenes Projekt zur Bewertung und zum Vergleich von Clustering-Methoden, und dem Ziel, Leitlinien für deren Anwendung zu erstellen ("FlowCAP - Flow Cytometry: Critical Assessment of Population Identification Methods,")

5.8 ROTEM®

5.8.1 Methode

Die Rotationsthromboelastometrie basiert auf dem Verfahren der Thrombelastographie, das 1948 wurde zum ersten Mal in Heidelberg beschrieben wurde (Hartert, 1948). In den 1990er Jahren wurde das Prinzip weiterentwickelt und später in Rotationsthromboelastometrie umbenannt (Lang & von Depka, 2006). Dieses diagnostische Verfahren dient zur Bestimmung von Gerinnungseigenschaften in Vollblut.

Bei der Rotationsthromboelastometrie dreht sich ein Stempel in einem, mit Citratblut gefüllten, unbewegten Gefäß. Je nach Test werden verschiedene Reagenzien zur Aktivierung der Gerinnung hinzugefügt und die Messung gestartet. Es werden dann bei 37°C verschiedene Parameter eines in der Folge entstehenden Blutgerinnsels erfasst und grafisch dargestellt. ROTEM® kann dabei frühzeitig Veränderungen der In-vivo Gerinnung erkennen (Rugeri et al., 2007). Außerdem kann die Festigkeit des Gerinnsels, dessen Auflösung, und weitere spezielle Fragestellungen untersucht werden. Der frühzeitigen Diagnose von Blutverlust und unstillbaren Blutungen kommt in der Klinik ein hoher Stellenwert zu, da dies entscheidenden Einfluss auf das Outcome von Traumapatienten hat; ROTEM® stellt dabei eine schnelle und zuverlässige Methode zur Diagnose einer Hyperfibrinolyse dar, und ermöglicht eine frühzeitige Behandlung mit antifibrinolytischen Medikamenten (Levrat et al., 2008). Eine mittels ROTEM® festgestellte Hyperfibrinolyse ist mit einem schlechten Outcome nach schweren Verletzungen assoziiert (Schochl et al., 2009).

5.8.2 Tests

Zur Aktivierung der Gerinnung werden Calcium und – je nach Fragestellung – verschiedene zusätzliche Aktivatoren dem Citratblut hinzugefügt. Mit in-tem wird die Kontaktphase der Hämostase aktiviert und der intrinsische, durch ex-tem mittels Tissue Factor vor allem der extrinsische Gerinnungsweg gemessen. Fib-tem misst den plasmatischen Anteil der Gerinnung, indem Thrombozyten mittels Cytochalasin D irreversibel gehemmt werden. Beim ap-tem Test wird die Fibrinolyse durch Aprotinin gehemmt, wodurch eine Hyperfibrinolyse diagnostiziert werden kann.

Abnormale ex-tem oder fib-tem Amplituden und MCF-Werte können dabei eine Koagulopathie diagnostizieren und Bluttransfusionen, sowie die Mortalität vorhersagen (Veigas et al., 2016). Der Beitrag der Thrombozyten zur Gerinnung kann errechnet werden aus

($MCF_{EXTM} - MCF_{FIBTEM}$), da in fib-tem die Thrombozytenaktivität durch Cytochalasin D gehemmt wird (Schochl et al., 2009).

5.8.3 Messparameter

Parameter, die bei der Messung mittels ROTEM® erhoben werden, sind unter anderem:

- Die Clotting Time (CT): Misst die Zeit von Zugabe der aktivierenden Reagenzien bis zum Beginn der Gerinnelbildung. Die CT (ex-tem) entspricht dabei dem Quick-Wert, die CT (in-tem) der aPTT.
- Die Clot Formation Time (CFT): Misst die Zeit von Gerinnelbildung bis zu einer Amplitude von 20mm.
- Die Maximum Clot Firmness (MCF): Misst die maximale Gerinnselfestigkeit.
- Die Amplitudenwerte A5, A10, A15, und A20: Messen die Gerinnselfestigkeit nach 5, 10, 15, und 20 Minuten.
- Der Lyse-Index (LI): Gibt den Anteil der Gerinnselfestigkeit im Vergleich zur MCF nach einem definierten Zeitraum (meist 60 Minuten) an, und liefert somit Hinweise für eine Hyperfibrinolyse.

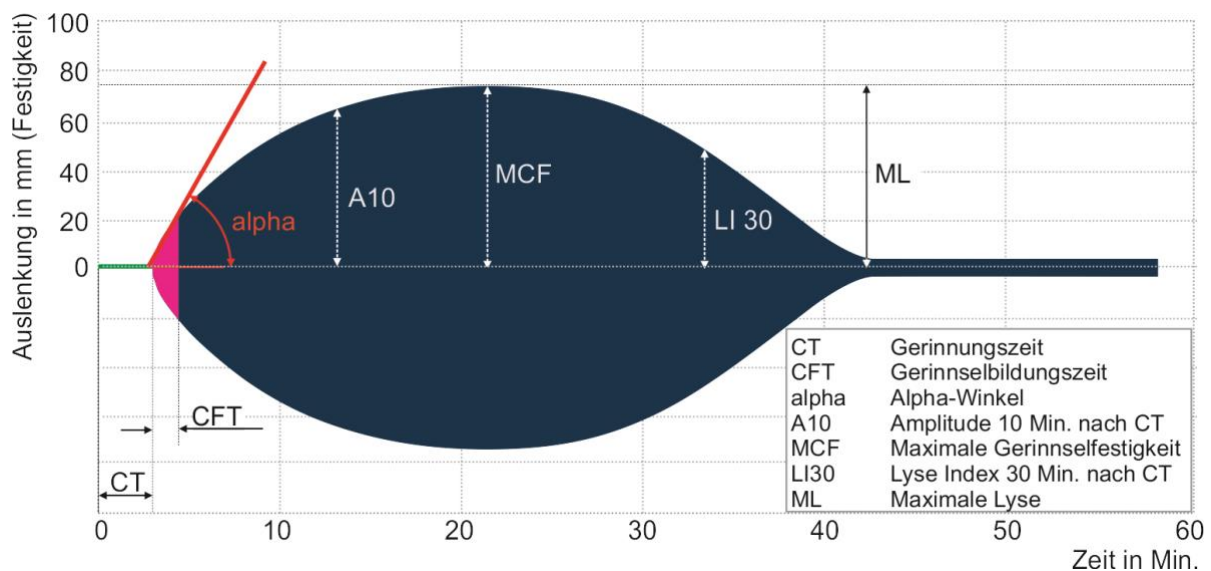


Abbildung 2: Das Ergebnis der Thromboelastometrie wird als Kurve ausgegeben, aus der die Elastizität über die Zeit bei Bildung und Auflösung des Gerinnsels abgelesen werden kann. (Grafik entnommen vom Webauftritt von ROTEM®, <https://www.rotem.de/methodik/rotem-delta-und-sigma-analyse/>)

6 Zielsetzung

Viele Mechanismen der posttraumatischen Immunantwort sind noch weitgehend ungeklärt. Deren Verständnis könnte erheblich zur Verbesserung von Diagnostik und Therapie in der Versorgung Schwerverletzter beitragen. CD4+ Tregs werden posttraumatisch als protektiv angesehen. Die Mechanismen derer Aktivierung sind jedoch wenig verstanden. Auch Thrombozyten scheinen posttraumatisch protektive Effekte zu haben. Außerdem interagieren diese mit verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen, unter anderem mit CD4+ Tregs. Unsere Arbeitsgruppe konnte zum ersten Mal im Mausmodell zeigen, dass sich CD4+ Tregs und Thrombozyten nach Trauma gegenseitig in ihrer Aktivität verstärken (Bergmann et al., 2016). Wir erwarten im Menschen ebenfalls Interaktionen zwischen Thrombozyten und CD4+ Tregs nach Trauma und definieren damit die Ziele dieser Arbeit wie folgt:

CHARAKTERISIERUNG DER AKTIVIERUNG VON CD4+ TREGS UND TH17-ZELLEN IN BEZUG AUF DIE AKTIVIERUNGSPARAMETER CD69, CD62L, TNF-R II, UND GITR NACH TRAUMA.

Wie verhält sich die Aktivierung von CD4+ Tregs und Th17-Zellen nach Trauma?

Welche der untersuchten Oberflächenproteine/Aktivierungsmarker werden nach Trauma auf diesen Subpopulationen vermehrt exprimiert?

Wie verhält sich die Aktivierung von CD4+ Tregs zu der von Th17-Zellen?

PHÄNOTYPISIERUNG DER THROMBOZYTÄREN GERINNUNG NACH TRAUMA

Wie wirkt sich Trauma auf die Gerinnung aus? Welche Rolle spielen Thrombozyten hierbei?

UNTERSUCHUNG DER PLASMATISCHEN GERINNUNG

Welche Auswirkungen hat Trauma auf den plasmatischen Teil der Gerinnung?

KORRELATION ZWISCHEN IMMUNOLOGIE UND GERINNUNG, SPEZIELL DER AKTIVIERUNG VON CD4+ TREGS UND TH17-ZELLEN, UND DER AKTIVIERUNG UND HÄMOSTATISCHEN FUNKTION VON THROMBOZYTEN

Wie verhalten sich Thrombozyten im Verhältnis zu CD4+ Tregs und Th17-Zellen nach Trauma?

Zur Beantwortung dieser Fragen bedienen wir uns der bereits erwähnten Methoden, der Durchflusszytometrie und der ROTEM®. Außerdem wurden klinische Parameter und Standard-Laborwerte untersucht. Serielle Messungen dienen dem Nachweis einer Kinetik über die ersten 10 Tage nach Trauma.

Ziel soll sein, zu einem besseren Verständnis der Mechanismen der Immunreaktion nach Polytrauma beizutragen, um zukünftige Diagnose- und Therapiemöglichkeiten nach Polytrauma zu verbessern.

7 Material und Methoden

7.1 Kollektiv

Die Studie wurde in der Abteilung für Unfallchirurgie am Universitätsklinikum rechts der Isar in München durchgeführt. Im Zeitraum zwischen Dezember 2014 und Mai 2017 wurden 20 Patienten in die prospektive Studie eingeschlossen. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Klinik geprüft (Aktenzeichen 5925/13). Als Einschlusskriterien wurde die Diagnose eines Polytraumas mit einem Injury Severity Score (ISS) von mindestens 16, und ein Alter zwischen 18 und 95 Jahren verwendet. Schwangere Frauen und Strafgefangene wurden ausgeschlossen.

7.2 Blutentnahmen

Die Blutproben wurden an neun verschiedenen Zeitpunkten entnommen: Direkt nach der Ankunft im Schockraum (TB), nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden, sowie nach 5, 7 und 10 Tagen. Das Blut wurde in Monovetten (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) gesammelt, die Citrat für die Thromboelastometrie und Ethylendiamintetraacetat (EDTA) für die Zellfärbungen und Durchflusszytometrie enthielten.

7.3 Geräte

Die Detektion und Differenzierung von T-Zell Subpopulationen, sowie die Analyse der Oberflächenantigene wurde durchflusszytometrisch mit einem MACSQuant® Analyzer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt. Die Reagenzien für die Kalibrierung des Gerätes, Pufferung, Wasch- und Reinigungsschritte (MACSQuant® Calibration Beads, MACSQuant® Running Buffer, MACSQuant® Storage Solution und MACSQuant® Washing Solution) wurden ebenfalls von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, bezogen.

Die hämostatische Funktion und Aktivierung von Thrombozyten wurde mit Citrat-Vollblut an einem ROTEM® Delta (TEM International GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden die Reagenzien ex-tem, in-tem, fib-tem und star-tem genutzt, ebenfalls von der Firma TEM International GmbH, München.

7.4 Verbrauchsmaterialien

7.4.1 Chemikalien und Puffer

Für die Versuche wurden die unten aufgeführten Chemikalien verwendet. Die Erythrozyten im EDTA-Blut wurden mittels Schwinger-Lösung lysiert und der Zelldebris durch Zentrifugation bei 1500g und 4° Celsius für 10 Minuten abzentrifugiert. Für die Thrombozyten Färbungen wurde Citratblut bei 190g für 10 Minuten zentrifugiert und das Thrombozyten-reiche Plasma (PRP) für die Färbung verwendet. Für die Fixierung der Zellen wurde 1%ige Paraformaldehyd-Lösung (PFA 1%) verwendet. Die Zellfärbung wurde in PBA als Pufferlösung durchgeführt.

Chemikalie	Inhaltsstoffe und Hersteller
PBS	PBS von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PBA	PBS, Albumin aus Rinderserum von Carl Roth GmbH, Karlsruhe, und Sodiumazid von Sigma-Aldrich (St. Lois, MO, USA)
PFA 1%	Paraformaldehyd von Carl Roth GmbH, Karlsruhe, verdünnt mit PBS von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Schwinger Lösung	Aqua mit Ammoniumchlorid von Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D), Kaliumcarbonat von Caesar & Lorentz GmbH (Hilden, D), und EDTA von Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)

7.4.2 Antikörper

Es wurden die unten aufgeführten Antikörper verwendet.

Um ein unspezifisches Binden von Antikörpern am Fc-Teil der Leukozytenpopulationen zu verhindern, wurde ein Fc-Block verwendet. Zur Identifikation der Zellpopulationen wurden für Th17-Zellen fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen CD4, CD161, und CD196, für CD4+ Tregs gegen CD4, CD25, und CD127 verwendet. Zur Quantifizierung der Aktivierung wurden auf beiden Zellpopulationen die Antikörper anti-CD69, anti-CD62L, anti-CD120b (TNF-RII), und anti-GITR verwendet.

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Hersteller
Anti-CD4	OKT4	APC	eBioscience, San Diego, CA
Anti-CD4	OKT4	AlexaFluor® 488	eBioscience, San Diego, CA
Anti-CD161	HP-3G10	ef450	eBioscience, San Diego, CA
Anti-CD25	BC96	ef450	eBioscience, San Diego, CA
Anti-CD196	R6H1	FITC	eBioscience, San Diego, CA
Anti-CD127	eBioRDR5	APC-eFlour® 780	eBioscience, San Diego, CA
Anti-CD69	FN50	PE	eBioscience, San Diego, CA
Anti-CD62L	DREG-56	PE	eBioscience, San Diego, CA
Anti-CD120b (TNF-R II)	hTNFR-M1	PE	BD Biosciences, San Jose, CA
Anti-GITR	eBioAITR	PE	Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA

Tabelle 1: Antikörpername, Klon, Fluorochrom, und Hersteller der zur Färbung der Lymphozyten verwendeten Antikörper

Für die Oberflächenfärbung der Thrombozyten wurden die Oberflächenantigene CD41, CD62P, CD63 und TLR9 angefärbt.

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Hersteller
Anti-CD41	HIP8	VioBlue	BioLegend, San Diego, CA
Anti-CD62P	Psel.KO2.3	APC	eBioscience, San Diego, CA
Anti-CD63	H5C6	PE	BioLegend, San Diego, CA
Anti-TLR9	5G5	FITC	abcam, Cambridge, UK

Tabelle 2: Antikörpername, Klon, Fluorochrom, und Hersteller der zur Färbung der Thrombozyten verwendeten Antikörper

7.5 Durchflusszytometrie

7.5.1 Funktionsprinzip Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, das die Analyse von Zellen mithilfe eines Lichtstrahls erlaubt. Dabei passieren Zellen einer Suspension in einem Hüllstrom den Messbereich eines Laserstrahls, wobei jede Zelle einzeln anhand des Streulichts auf Größe und Komplexität analysiert wird. Es können bis zu 10.000 Zellen pro Sekunde vermessen werden. Ein Teil des Lichts wird absorbiert, das gestreute Licht, sowie von den Zellen emittiertes Licht, wird im Winkel 0° als Vorwärtsstreulicht und im Winkel 90° als Seitwärtsstreulicht detektiert. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter) stellt ein Maß für das Volumen einer Zelle dar, während das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter) Rückschlüsse auf intrazelluläre Bestandteile und deren Zusammensetzung erlaubt. Zusätzlich können anhand des gestreuten Lichts an Antikörper gebundene Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden, wodurch die Expression von Oberflächenproteinen quantitativ bestimmt werden kann (Kurec, 2014).

7.5.2 Färbung der CD4+ Tregs / Th17-Zellen und deren Aktivierungsparameter

Zur Oberflächenfärbung der CD4+ Tregs wurden die Antigene CD4, CD25 und CD127 verwendet, Th17-Zellen wurden anhand der Expression von CD4, CD161 und CD196 identifiziert. Als Aktivierungsparameter nutzen wir die etablierten Oberflächenantigene CD69, CD62L, TNF-RII und GITR.

Zuerst wurde dem EDTA Blut Schwingerlösung zur Lyse der Erythrozyten hinzugegeben. Anschließend wurde die Zell-Lösung gewaschen und mit PBA als Pufferlösung versetzt. Ein Fc-Block wurde hinzugegeben, um die unspezifische Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu verhindern. Danach wurden für die Färbung von Th17-Zellen anti-CD4, anti-CD161, und anti-CD196 Antikörper hinzugegeben, CD4+ Tregs wurden mittels anti-CD4, anti-CD25, und anti-CD127 angefärbt. Um die Aktivierung der Zellen zu detektieren, wurde außerdem anti-CD69, anti-CD62L, anti-TNF-RII, und anti-GITR hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 4°C wurden die Zellen gewaschen, mit PBA verdünnt und direkt im Durchflusszytometer analysiert.

7.5.3 Gating Strategie CD4+ Tregs/Th17-Zellen

Im Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) wurden zu Beginn des Gatings Zelldebris und Zelldoubletten ausgeschlossen. Anhand der Streulichteigenschaften in FSC und SSC lässt sich die Lymphozytenpopulation gut von den Populationen der Monozyten und Granulozyten

unterscheiden. Es wurde ein Gate um die entsprechende Population gezogen. Zur Identifikation von CD4+ Tregs wurde die Expression von CD25, in ef450, sowie die niedrige Expression von CD127, mittels Fluorochrom APC eFlour 780, und die Expression von CD4 in AlexaFlour® 488 genutzt. Th17-Zellen wurden anhand ihrer Expression von CD161, mittels Fluorochrom ef450, und CD196, mittels Fluorochrom FITC, sowie CD4 mittels APC identifiziert. Die Aktivierungsmarker CD69, CD62L, CD120b (TNF RII), und GITR wurden auf beiden Lymphozytenpopulationen in jeweils unterschiedlichen Wells angefärbt und einzeln durch selektives Gating mittels des Fluorochroms PE ausgewertet, da diese Aktivierungsmarker alle mit dem gleichen Fluorochrom angefärbt wurden. Für die Auswertung wurde die mediane Fluoreszenzintensität der Antikörper, sowie die absoluten Zellzahlen verwendet.

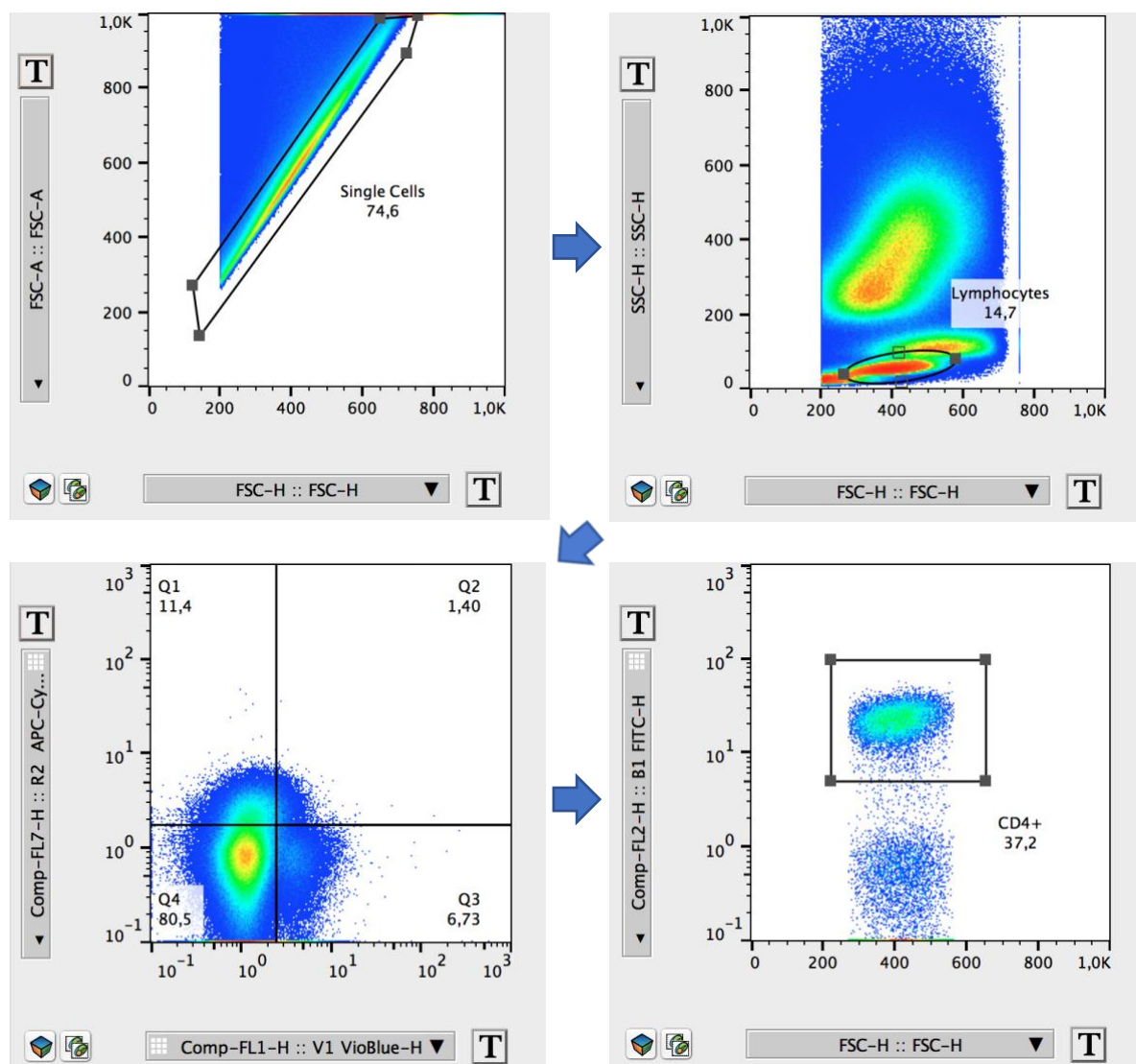


Abbildung 3: Gating der CD4+ regulatorischen T-Zellen. Zuerst wurden anhand von Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) Doubletten und Zelldebris ausgeschlossen. Danach wurde die Population der Lymphozyten ausgewählt. Davon wurde die Zellpopulation gewählt, die sich CD25+, CD127low (rechter unterer Quadrant), und CD4+ darstellt. Anschließend wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD62L, TNF-RII, und GITR bestimmt.

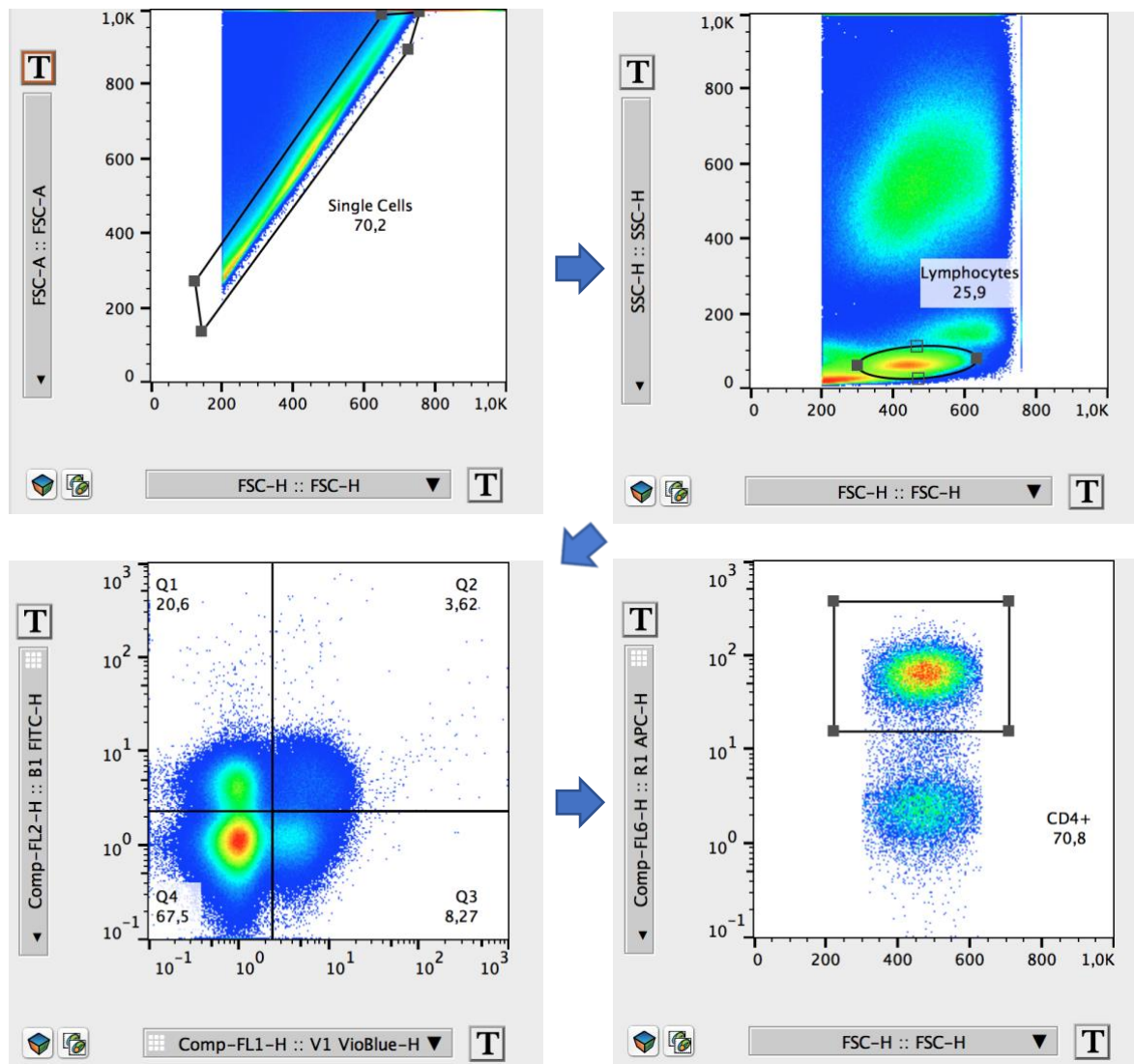


Abbildung 4: Gating der Th17-Zellen. Zuerst wurden anhand von Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) Doubletten und Zelldebris ausgeschlossen. Danach wurde die Lymphozytenpopulation, wie beim Gating der CD4+ regulatorischen T-Zellen, ausgewählt. Anschließend wurde die Population gewählt, die CD161+, CD196+ (rechter oberer Quadrant), und CD4+ war. Anschließend wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD62L, TNF-RII, und GITR bestimmt.

7.5.4 Färbung Thrombozyten und deren Aktivierungsparameter

Zur Färbung der Thrombozyten wurde Citrat-Blut zur Gewinnung von Thrombozyten-reichem Plasma (PRP) zentrifugiert. Die Zellen wurden mittels PBS und 1%iger PFA-Lösung fixiert. Nach dem Waschen wurden anti-CD41, anti-CD62P, anti-CD63, und anti-Toll-like-Receptor 9 (CD289) Antikörper hinzugegeben und für 45 Minuten inkubiert. Nach erneuten Waschschrinen wurden die Zellen in PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

7.5.5 Gating Strategie Thrombozyten

Zu Beginn des Gatings wurde Zelldebris in FSC und SSC ausgeschlossen. Es wurden anhand der CD41 Expression – mittels VioBlue gefärbt – Thrombozyten identifiziert und ein Gate für diese erstellt. Anschließend wurden die Aktivierungsmarker anhand der Fluoreszenzintensität der Fluorochrome APC (CD62P), PE (CD63), und FITC (Toll-like receptor 9) dargestellt und anhand des Median der Fluoreszenzintensität und der absoluten Zellzahl ausgewertet.

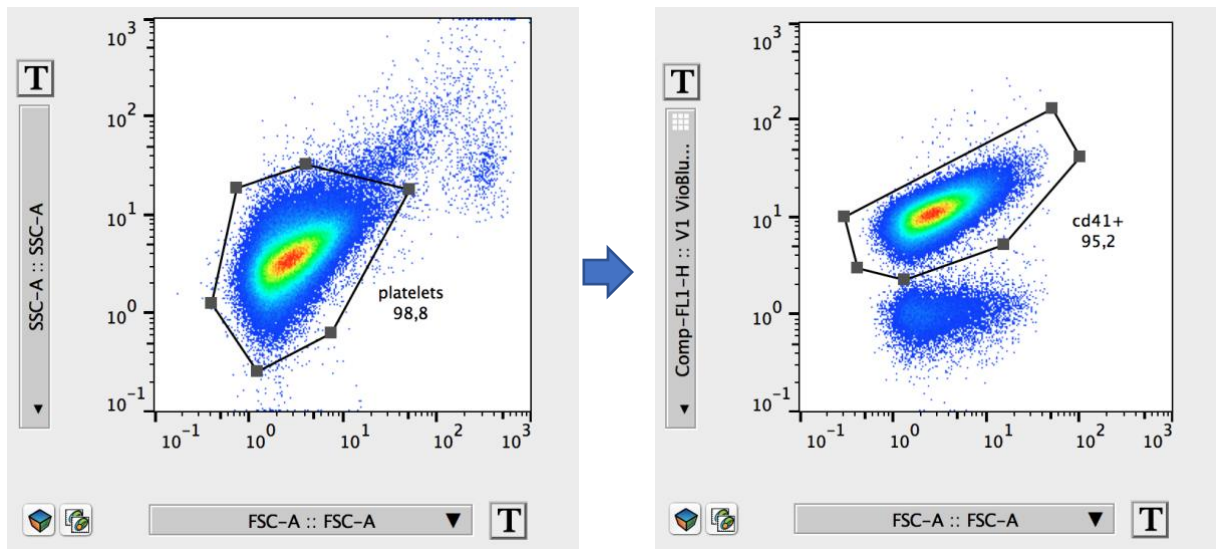


Abbildung 5: Gating der Thrombozyten. Anhand von Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) wurde Zelldebris und andere Zellen ausgeschlossen. Anschließend wurden Thrombozyten anhand der Oberflächenexpression von CD41 identifiziert. Danach wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD62P, CD63, und TLR9 bestimmt.

7.6 Rotationsthromboelastometrie

7.6.1 Funktionsprinzip Rotationsthromboelastometrie

Die Thrombelastometrie ist ein Verfahren zur Bestimmung der Gerinnungsfunktion von Vollblut. Dabei können sowohl der extrinsische und intrinsische Weg der Gerinnung, sowie der plasmatische Anteil beurteilt werden. Außerdem erlaubt dieses Verfahren zusätzlich die Messung der Festigkeit eines Blutgerinnsels und die Bestimmung der Dauer bis zur Lyse. Bei der klassischen Thromboelastometrie ragt ein Stempel in die Blutprobe, die sich in einem in Längsrichtung schwenkenden Gefäß befindet. Bildet sich dort ein Blutgerinnsel, so wird die Bewegung auf den Stempel übertragen und vom Gerät registriert. Bei der Rotationsthrombelastometrie dreht sich ein Stempel in einem unbewegten Gefäß.

7.6.2 Durchführung Rotationsthromboelastometrie mit ROTEM® delta

Die thromboelastometrischen Daten wurden an einem ROTEM® delta und mit den ROTEM® Cup & Pin pro Messzellen durchgeführt. Dazu wurden die Pins auf die Messstäbe des ROTEM® delta aufgesteckt und die Cups in den Küvettenhaltern fixiert. Es wurde mithilfe des automatisierten Pipettiersystems star-tem® zur Rekalzifizierung des Citratblutes, sowie je einfach ex-tem® zur Aktivierung des extrinsischen, in-tem® zur Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems sowie fib-tem® zur Beurteilung der plasmatischen Gerinnung in die Cups gegeben. Anschließend wurde Citratblut hinzugefügt, die Cups auf den Messstempel gesteckt und die Messung gestartet.

7.7 Statistische Methoden

Zur Auswertung der Daten wurde die IBM SPSS® Statistics Software, Version 25, verwendet. Die Werte der deskriptiven statistischen Analyse werden in Form von Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Da es sich um Messwiederholungen handelt, und gleichzeitig einzelne Werte fehlen, wurden zur Auswertung generalisierte Schätzgleichungen (GEEs) verwendet, um auf statistisch signifikante Änderungen der Mittelwerte im Zeitverlauf zu testen. Angegeben sind im Folgenden der Regressionskoeffizient (B), der Standardfehler (SE), das 95% -Konfidenzintervall (95% -KI), und der Wahrscheinlichkeitswert (p). Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Weiterhin kann bei Messwiederholungen die Berechnung eines Korrelationskoeffizienten wie bei einer einfachen Stichprobe mit unverbundenen Werten zu irreführenden Ergebnissen führen. Deshalb wurde die Korrelation innerhalb der Subjekte nach Bland und Altman wie folgt berechnet (Bland & Altman, 1995): Es wurde eine multiple Regression durchgeführt, bei der eine der untersuchten Variablen als Outcome Variable, die andere und die Anzahl der untersuchten Subjekte als Prädiktor Variablen definiert wurden. Die Anzahl der Subjekte hat somit 19 Freiheitsgrade. Der Korrelationskoeffizient innerhalb der Subjekte ergibt sich mittels:

$$r = \sqrt{\frac{\text{Quadratsumme der Variablen}}{\text{Quadratsumme der Variablen} + \text{Quadratsumme der Fehler}}}$$

Das Vorzeichen des Korrelationskoeffizienten ergibt sich anhand des Vorzeichens der Regressionsgleichung. Das Signifikanzniveau kann aus dem zugehörigen F-Test oder t-Test für die Regressionsgleichung bestimmt werden.

8 Ergebnisse

8.1 Patientenkollektiv

20 Patienten wurden in die Studie eingeschlossen. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 46.5 ± 18.7 Jahre. 70 % der Patienten waren Männer, 30% Frauen. Der durchschnittliche ISS betrug 28.4 ± 11.8 . 17 Patienten (85%) überlebten die ersten 10 Tage nach Trauma. Diese verbrachten im Durchschnitt 13.2 ± 16.6 Tage auf der Intensivstation, und wurden 3.8 ± 2.0 -mal operiert. Die meistverletzten Regionen waren in absteigender Reihenfolge: Extremitäten/Beckengürtel (85%), Brust (80%), Kopf/Halsbereich (60%), Externes (50%), Gesicht (45%), und Abdomen/Beckeninhalt (30%). Die meisten Patienten erlitten einen Verkehrsunfall (13 Patienten, 65%), 4 Patienten (20%) einen mutmaßlichen Suizidversuch.

	Häufigkeit (Prozent)	Mittelwert ± SD
Patientenzahl	20 (100%)	
Alter		46.5 ± 18.7
Geschlecht		
männlich	14 (70%)	
weiblich	6 (30%)	
ISS		28.4 ± 11.8
Überleben	17 (85%)	
Davon:		
ICU Tage		13.2 ± 16.6
OP-Anzahl		3.8 ± 2.0
AIS Werte		
Kopf/Hals	13 (65%)	2.6 ± 1.2
Gesicht	9 (45%)	2.8 ± 0.7
Brust	16 (80%)	3.7 ± 1.0
Abdomen/Beckeninhalt	6 (30%)	2.5 ± 1.0
Extremitäten/Beckengürtel	17 (85%)	2.9 ± 0.8
Externes	10 (50%)	1.1 ± 0.3
Verletzungsmechanismus		
Verkehrsunfall	13 (65%)	
Suizidversuch	4 (20%)	
andere	3 (15%)	

Tabelle 3: Deskriptive Statistik der Patientencharakteristika

8.2 Charakterisierung der Aktivierung von CD4+ regulatorischen T-Zellen und Th17-Zellen

8.2.1 CD69

Es gab einen signifikanten Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität der PE-gebundenen CD69 Antikörper, der auf CD4+ Tregs ($B = 0.001$, $SE = 0.0312$, 95% CI [1.040; 1.162], $p < 0.001$), sowie auf Th17-Zellen ($B = 0.002$, $SE = 0.0005$, 95% CI [0.001; 0.003], $p < 0.001$) detektiert wurde.

Die Anstiege korrelierten dabei signifikant miteinander ($r = 0.62$, $p < 0.001$).

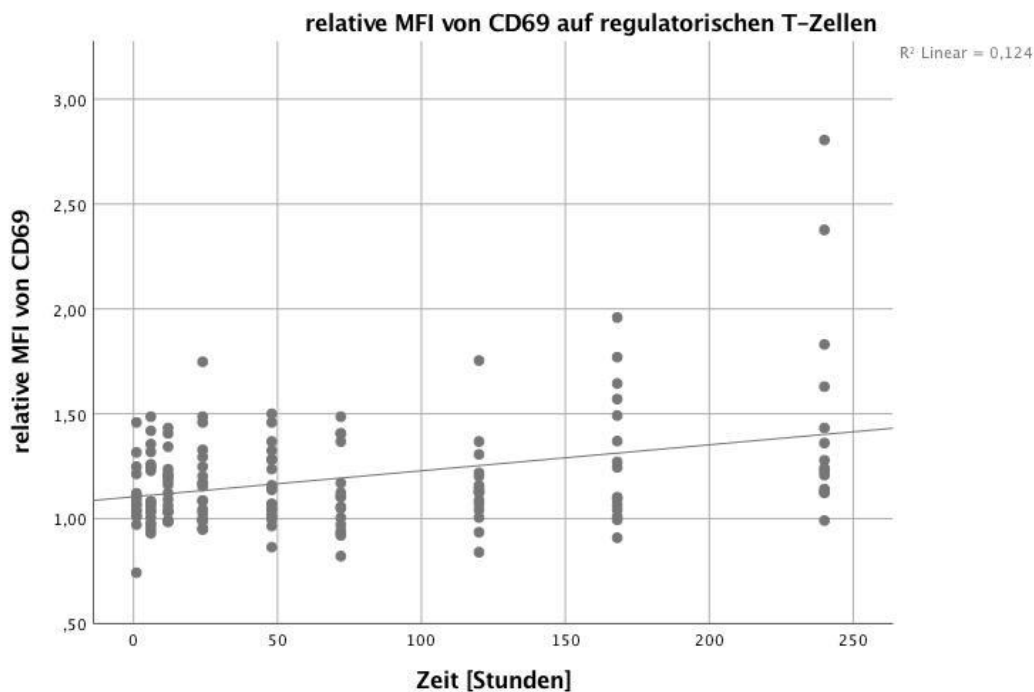


Abbildung 6: Relative mediane Fluoreszenzintensität von CD69 auf CD4+ regulatorischen T-Zellen.

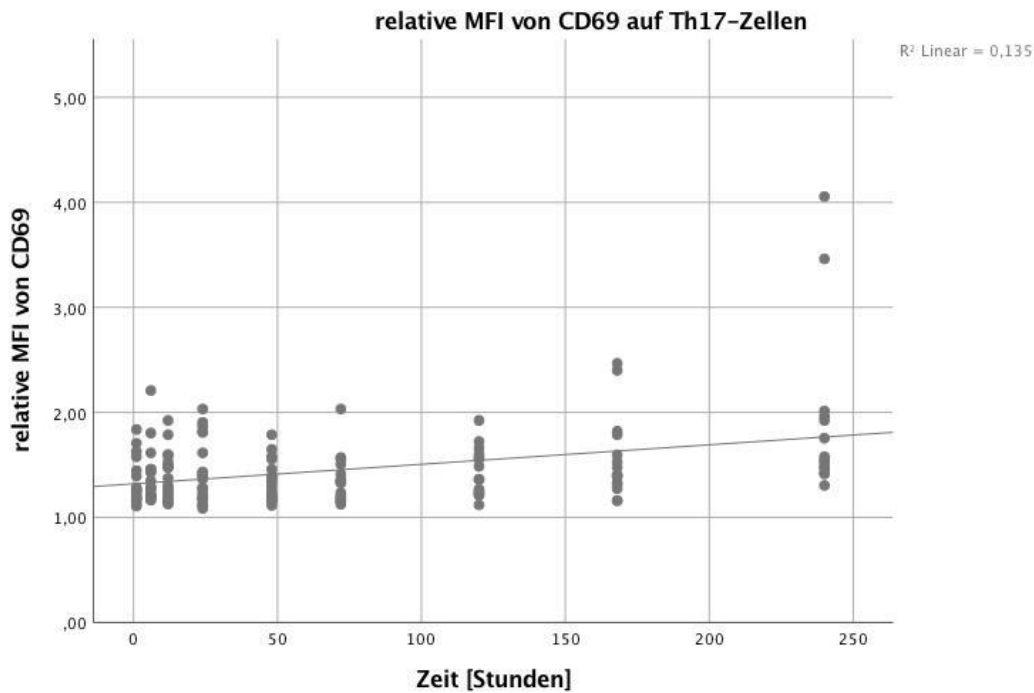


Abbildung 7: Relative mediane Fluoreszenzintensität von CD69 auf Th17-Zellen.

8.2.2 CD62L, TNF-R II, und GITR

Die mediane Fluoreszenzintensität der anderen PE-gebundenen Aktivierungsmarker CD62L (CD4+ Tregs (B = -0.024, SE = 0.0148, 95% CI [-0.053; 0.005], p = 0.108) und Th17-Zellen (B = -0.015, SE = 0,0055, 95% CI [-0.026; -0.004], p = 0.008)), TNF-RII (CD4+ Tregs (B = 0.001, SE = 0.0027, 95% CI [-0.004; 0.006], p = 0,783) und Th17-Zellen (B = -0.002, SE = 0.0015, 95% CI [-0.004; 0.001], p = 0.317)), und GITR (CD4+ Tregs (B = 5.569E-5, SE = 0.0002, 95% CI [0.000; 0.000], p = 0.722) und Th17-Zellen (B = 0.000, SE = 0.0003, 95% CI [0.000; 0.001], p = 0.370)) zeigten keine signifikanten Änderungen im Verlauf.

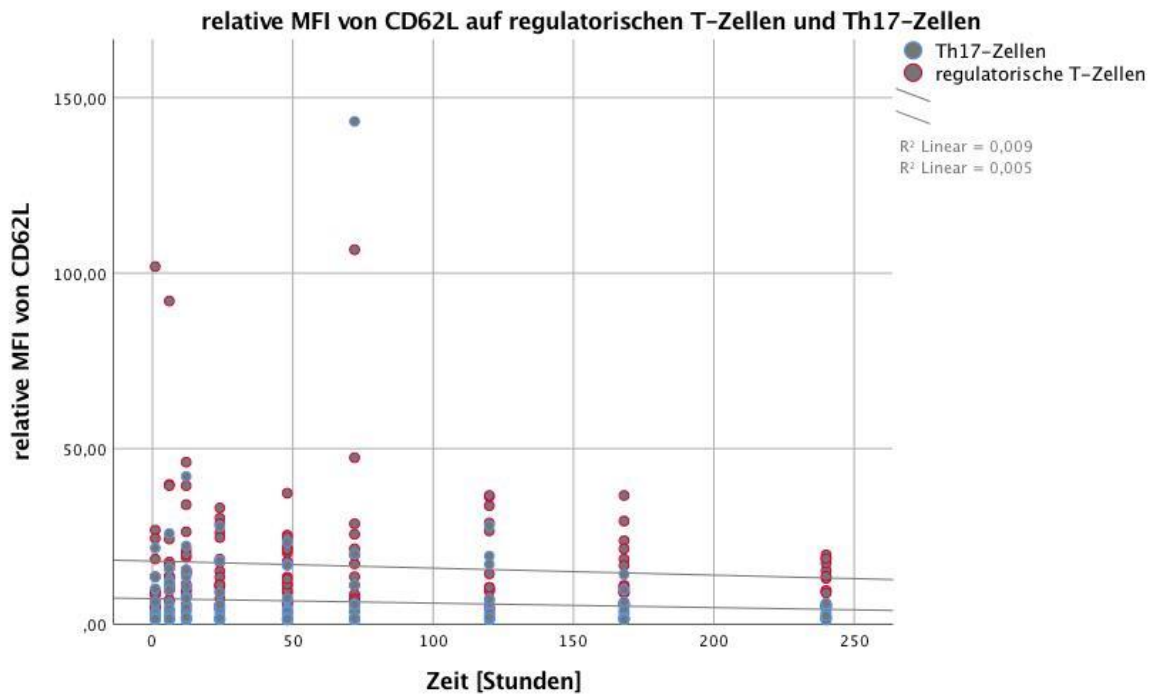


Abbildung 8: Relative mediane Fluoreszenzintensität von CD62L (L-Selektin) auf CD4+ regulatorischen T-Zellen und Th17-Zellen.

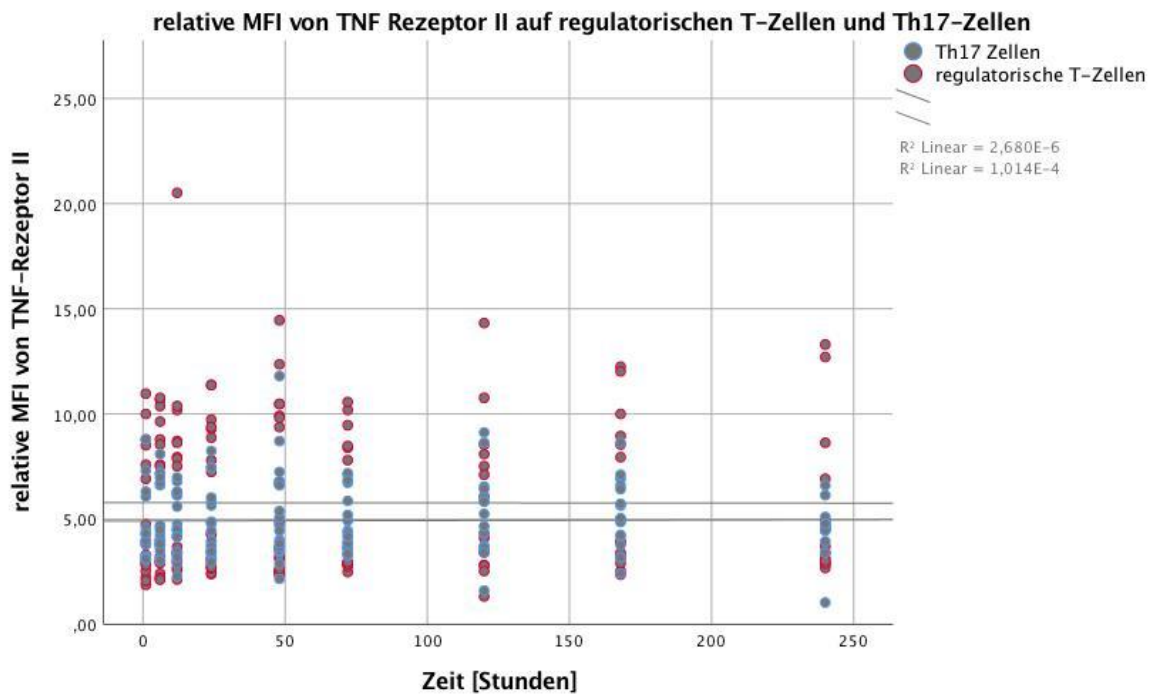


Abbildung 9: Relative mediane Fluoreszenzintensität von TNF-Rezeptor II auf CD4+ regulatorischen T-Zellen und Th17-Zellen.

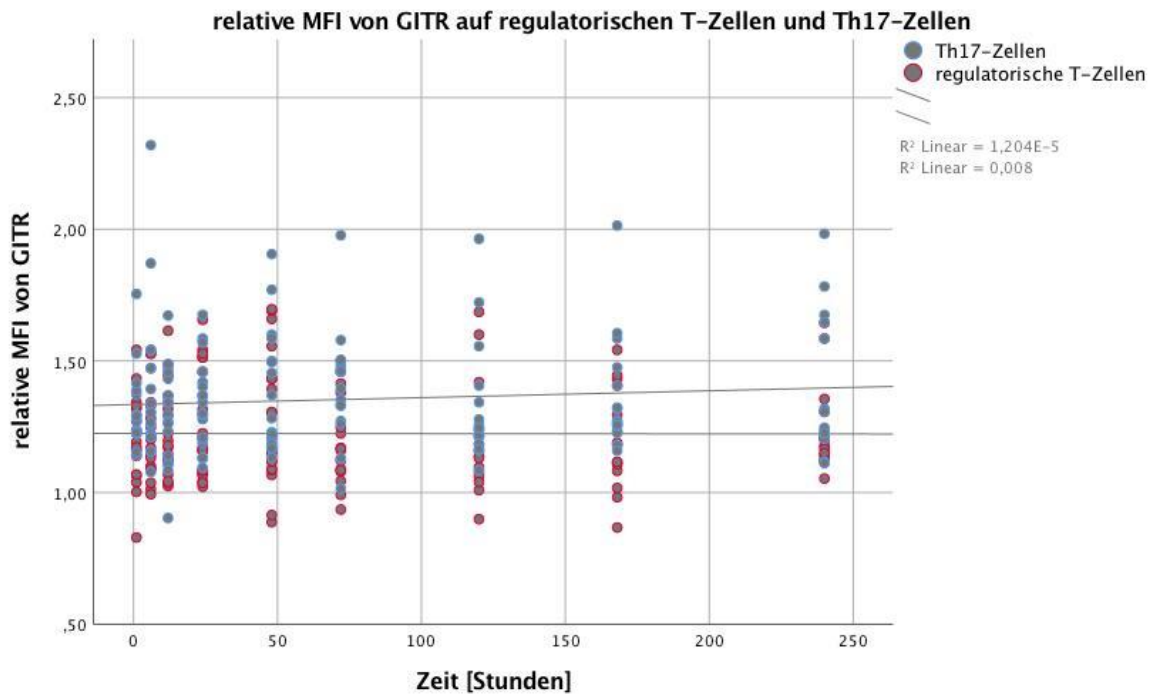


Abbildung 10: Relative mediane Fluoreszenzintensität von GITR auf regulatorischen T-Zellen und Th17-Zellen

8.3 Thrombozytäre Gerinnung

Obwohl die Aktivierungsmarker auf Thrombozyten über den Zeitraum von 10 Tagen keine signifikante Änderung zeigten, war ein signifikanter Anstieg der Thrombozytenzahl zu beobachten ($B = 1.051$, $SE = 0.1714$, 95% CI [0.715; 1.387], $p < 0.001$).

Gleichzeitig nahm die thrombozytäre Gerinnungsfunktion – abgebildet durch die Differenz von ex-tem MCF und fib-tem MCF – im Laufe der Zeit ab ($B = -0.040$, $SE = 0.0077$, 95% CI [-0.055; -0.025]). Diese Abnahme war signifikant ($p < 0.001$).

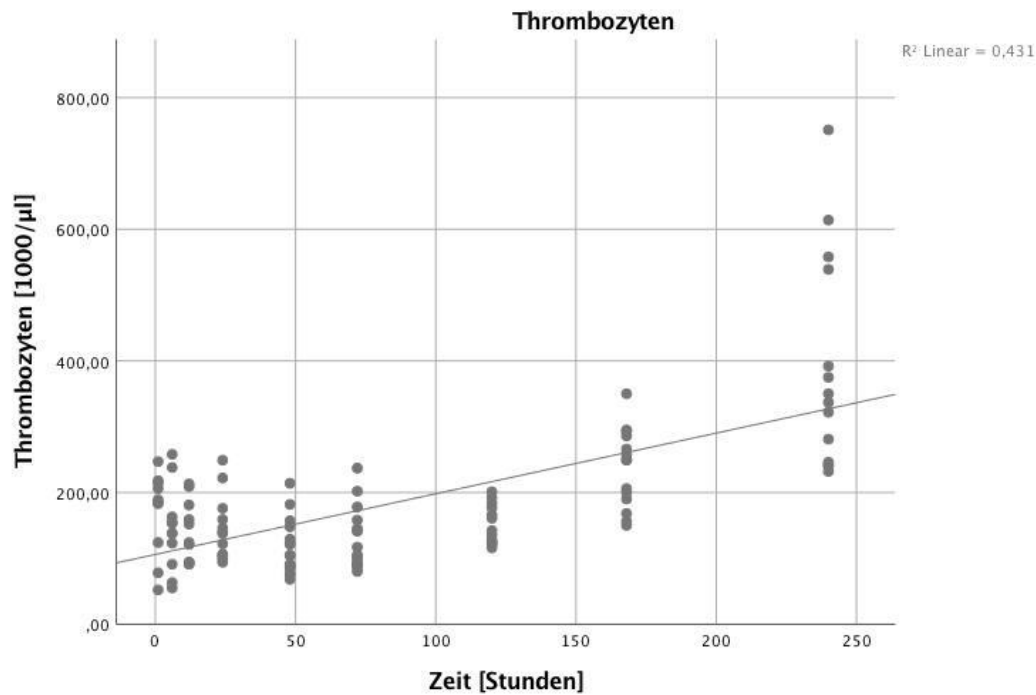


Abbildung 11: Absolute Thrombozytenzahl in [1000/ μ l].

8.4 Plasmatische Gerinnung

Es zeigte sich eine Abnahme der clot formation time (CFT) sowohl im extrinsischen ($B = -0.357$, $SE = 0.0891$, 95% CI [-0.539; -0.183], $p < 0.001$), wie auch intrinsischen Pfad ($B = -0.339$, $SE = 0.0981$, 95% CI [-0.531; -0.147], $p < 0.001$). Darüber hinaus war ein Anstieg der maximum clot firmness (MCF) in der in-tem- ($B = 0.083$, $SE = 0.0053$, 95% CI [0.072; 0.093], $p < 0.001$), ex-tem- ($B = 0.069$, $SE = 0.0140$, 95% CI [0.041; 0.096], $p < 0.001$), und fib-tem-Messung ($B = 0.111$, $SE = 0.0070$, 95% CI [0.097; 0.124], $p < 0.001$) zu beobachten.

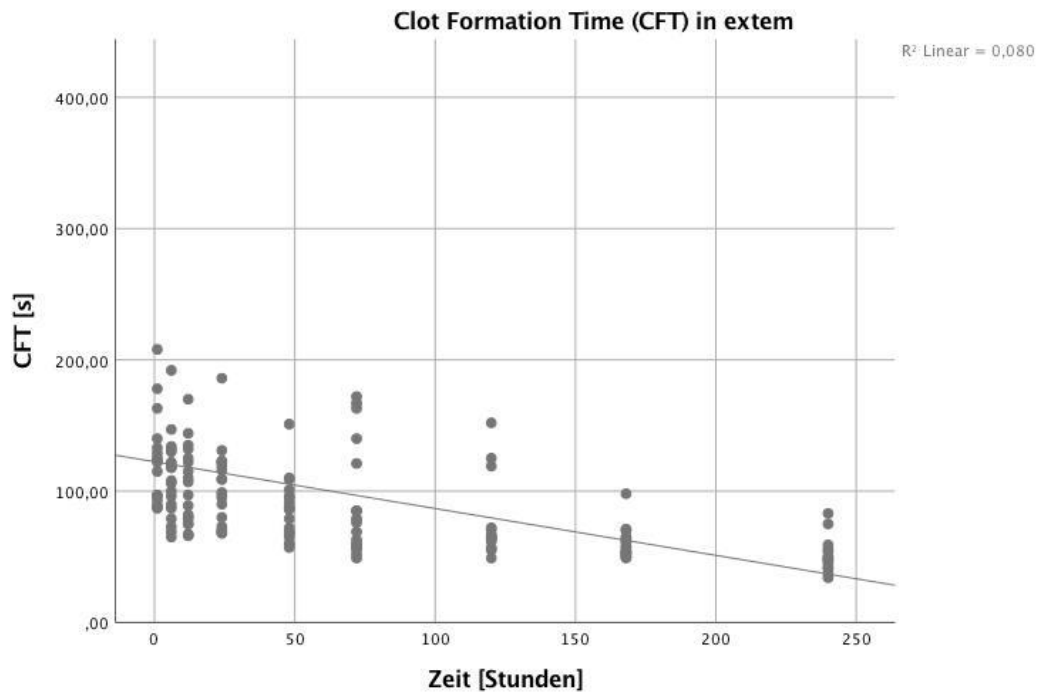


Abbildung 12: Clot formation time (CFT) im extrinsischen Weg.

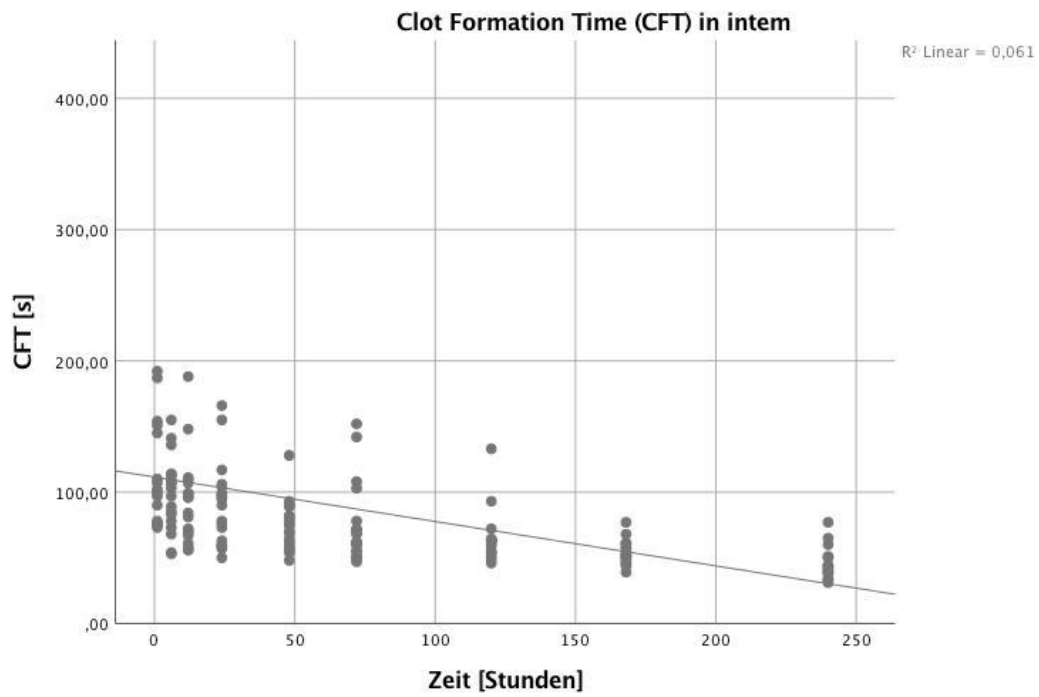


Abbildung 13: Clot formation time (CFT) im intrinsischen Weg.

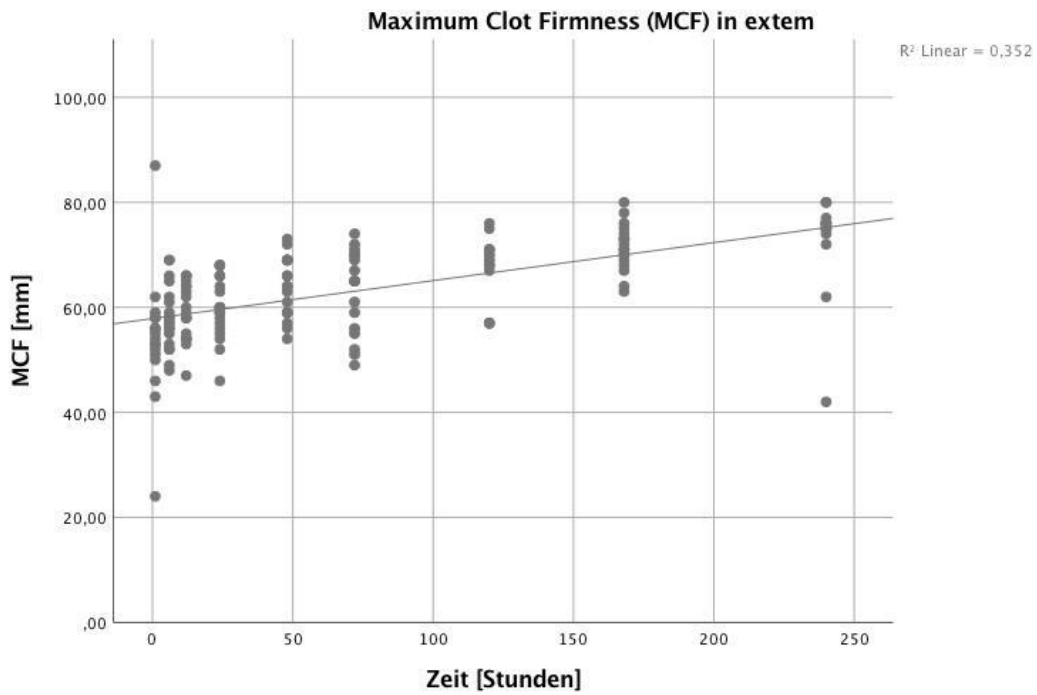


Abbildung 14: Maximum clot firmness (MCF) im extrinsischen Weg

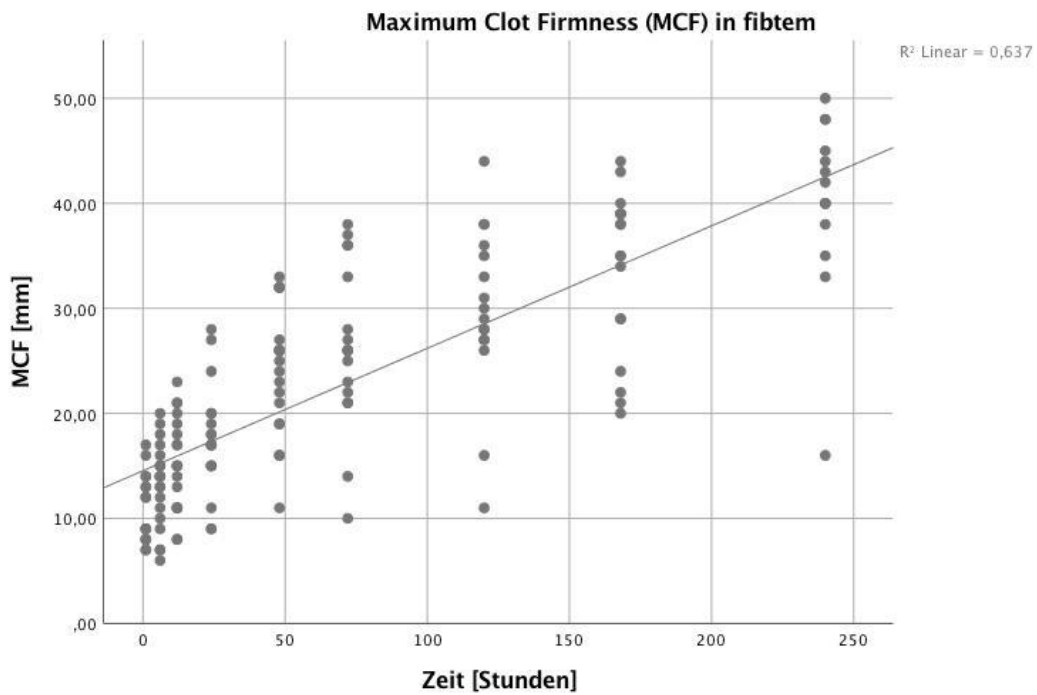


Abbildung 15: Maximum clot firmness (MCF) in fibtem. Dies entspricht dem plasmatischen Anteil im extrinsischen Weg der Gerinnung, da der thrombozytäre Anteil an der Gerinnung gehemmt wird.

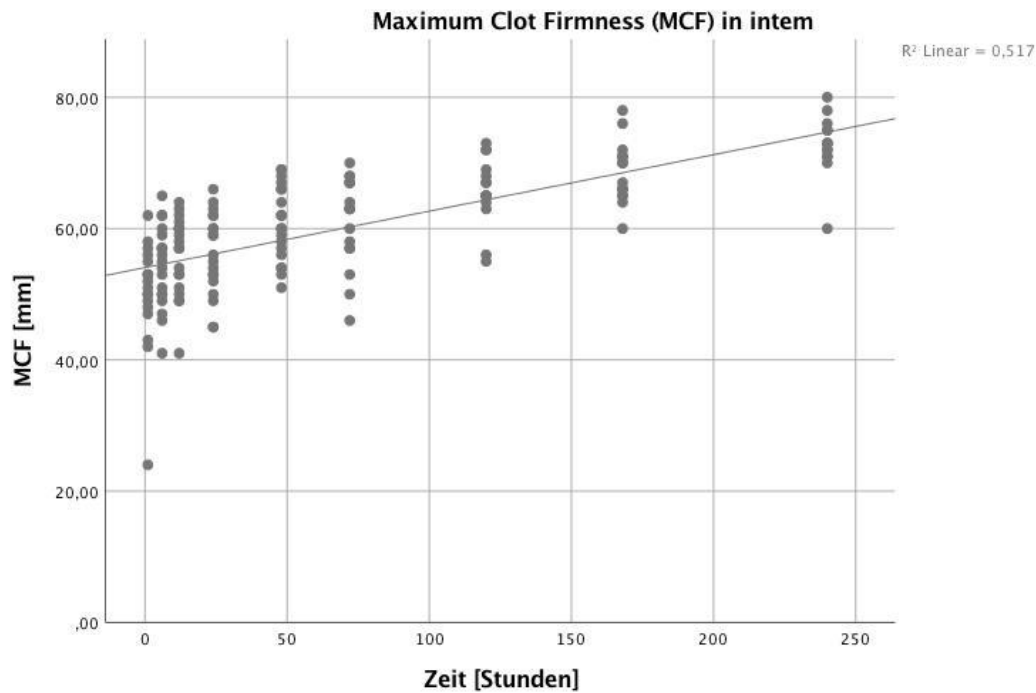


Abbildung 16: Maximum clot firmness (MCF) in intrinsischen Weg.

8.5 Korrelation zwischen Immunologie und Gerinnung

Es zeigte sich ein positiver linearer Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Thrombozyten und dem Anstieg der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD4+ Tregs, sowie zwischen dem Anstieg der Thrombozyten und dem Anstieg der Expression von CD69 auf Th17-Zellen. Der Anstieg der Thrombozytenzahl korrelierte signifikant sowohl mit dem Anstieg der CD69 Expression auf CD4+ Tregs ($r = 0.60$, $p < 0.001$), als auch mit dem Anstieg der CD69 Expression auf Th17-Zellen ($r = 0.54$, $p < 0.001$).

9 Diskussion

9.1 Zusammenfassung

In dieser nicht-invasiven klinisch-experimentellen humanen Studie, wurde zum ersten Mal die posttraumatische Aktivierung von CD4+ Tregs und Th17-Zellen mit der posttraumatischen Antwort von Thrombozyten korreliert. Peripheres Blut von 20 Polytraumapatienten wurde zu 9 spezifischen Zeitpunkten entnommen, von der Ankunft im Schockraum bis 10 Tage nach Aufnahme in der Klinik. Mittels Durchflusszytometrie und Rotationsthromboelastometrie wurde die Aktivierung von CD4+ Tregs, Th17-Zellen, und Thrombozyten, sowie die Hämostase und Thrombozytenfunktion untersucht. Zusätzlich wurden klinische Parameter und Standard-Laborwerte evaluiert. Während die Aktivierungsparameter CD62L, TNF-Rezeptor II, und GITR unverändert blieben, zeigte sich ein signifikanter posttraumatischer Anstieg der Expression von CD69, sowohl auf CD4+ Tregs, als auch auf Th17-Zellen. Dieser korrelierte signifikant positiv mit einem deutlichen, signifikanten Anstieg der Thrombozytenanzahl, bei gleichzeitig abnehmender thrombozytärer Gerinnungsfunktion. Parallel war eine deutliche Zunahme der plasmatischen Gerinnung zu verzeichnen.

9.2 Diskussion der Methoden

9.2.1 Patientenkollektiv

Die Studie umfasste 20 Polytraumapatienten, wobei ein Polytrauma mehrere gleichzeitig entstandene Verletzungen, von denen mindestens eine oder deren Kombination lebensbedrohlich ist, bezeichnet (nach Harald Tscherne), mit einem Injury Severity Score von mindestens 16. Der Injury Severity Score wurde 1974 zum ersten Mal beschrieben, und wird berechnet, indem jede Verletzung mittels Abbreviated Injury Scale (AIS) bewertet und anschließend die Summe der Quadrate der höchsten AIS Bewertungen für die drei schwerstverletzten Körperregionen gebildet wird. Er korreliert dabei deutlich besser mit der Mortalität als der AIS für die schwerste Verletzung allein (Baker et al., 1974). Die demografischen Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten kommen dabei den Daten des TraumaRegisters der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie sehr nahe (TraumaRegister Jahresbericht 2018). Das Traumaregister DGU® ist ein freiwilliger Zusammenschluss unfallchirurgischer Schwerpunktkliniken mit standardisierter

Dokumentation zur Erfassung und Auswertung von Unfallverletzungen. Nach eigenen Angaben wurden 2017 allein 35.000 Fälle aus fast 700 Kliniken eingegeben ("TraumaRegister DGU®,"). Das Durchschnittsalter unserer Patienten betrug 46.5 Jahre (TraumaRegister: 51.9), der Männeranteil 70% (TraumaRegister: 69.8%), der Anteil der Überlebenden 85% (TraumaRegister: 89%), und die Anzahl der durchgeführten OP's pro Patient 3.8 (TraumaRegister: 3.3). Während in dem vorliegenden Patientenkollektiv 65% der Verletzungen durch Verkehrsunfälle und 20% mutmaßlich durch Suizidversuch verursacht waren, betrug dieser Anteil im TraumaRegister nur 48.5% bzw. 4.4%, ein deutlich größerer Teil an Verletzungen ist im TraumaRegister auf Stürze aus großer Höhe zurückzuführen. Deutlich unterschied sich die Verletzungsschwere der untersuchten Patienten: Während unsere Patienten im Durchschnitt einen ISS von 28.5 und einen Aufenthalt auf der Intensivstation von 13.2 Tagen aufwiesen, waren dies im TraumaRegister ein ISS von 18.2 und ein Intensivaufenthalt von 6.2 Tagen ("Allgemeiner Jahresbericht 2018, TraumaRegister DGU®,"). Damit war unser Patientenkollektiv bei ansonsten demografisch vergleichbaren Daten im Durchschnitt deutlich schwerer verletzt. Dies könnte durch die Größe der Klinik bedingt sein, da es sich beim Klinikum rechts der Isar in München um eine Universitätsklinik und ein überregionales Traumazentrum handelt. Allerdings ist die Stichprobenanzahl der Studie aktuell mit 20 Patienten noch relativ gering und nur bedingt als repräsentativ anzusehen. Zukünftig sollen noch weitere Patienten in die Studie eingeschlossen werden, um aussagekräftigere Daten zu erhalten, und Subgruppenanalysen im Patientenkollektiv zu ermöglichen.

9.2.2 Beobachtungszeitraum

Häufig wurde in der Literatur ein dreigipfliges Modell der Mortalität nach Trauma angenommen (Gunst et al., 2010). Dabei ist die Einteilung nicht ganz einheitlich. Meistens wird die sofortige Mortalität jedoch als Versterben am Unfallort, in der ersten Stunde nach Unfall, und in der Notaufnahme, die frühe Mortalität als Versterben innerhalb der ersten 24 Stunden, und die späte Mortalität als Versterben nach 24 Stunden definiert (Sobrin & Shafi, 2013). Neuere Studien gehen allerdings davon aus, dass mit der Entwicklung von Trauma-Systemen und der verbesserten Traumaversorgung diese Verteilung nicht mehr aktuell ist (Demetriades et al., 2005), und berichten eher von einer bimodalen Verteilung (Meislin et al., 1997) oder sogar ausschließlich einem initialen Peak in der ersten Stunde mit darauf folgenden stetigem Abfall der Mortalität (Lansink et al., 2013). Sehr wenig untersucht ist außerdem die späte

Mortalität von Traumapatienten nach Klinikaufenthalt, sowie die Langzeit Mortalität. Claridge und Kollegen beschreiben eine signifikant erhöhte Mortalität bis zu einem Jahr nach Entlassung aus dem Krankenhaus, die auf ein ursprüngliches Trauma zurückzuführen ist (Claridge et al., 2010). Außerdem scheinen Polytraumapatienten nach Entlassung aus dem Krankenhaus neben einer höheren Mortalität auch andere Todesursachen als die Allgemeinbevölkerung aufzuweisen: Hauptursachen sind neben kardiovaskulären Erkrankungen und einem zweiten schweren Trauma, neurologische Erkrankungen, Selbstmord, und maligne Erkrankungen (Probst et al., 2009). Da sich die vorliegende Arbeit allerdings mit der potentiell reversiblen Mortalität von Polytrauma, bedingt durch immunologische Dysbalancen, beschäftigt, wurden Patientenproben nur bis 10 Tagen nach Aufnahme in der Klinik untersucht. Serielle Blutentnahmen dienten dabei dem Nachweis der Kinetik der Expression von Aktivierungsmarkern und der Thrombozytenfunktion. Da Hanschen und Mitarbeiter eine frühe posttraumatische Aktivierung von CD4+ Tregs bereits nach 15 Minuten, sowie einen Peak der Aktivierung in lokalen Lymphknoten bereits innerhalb der ersten Stunden nachweisen konnten (Hanschen et al., 2011), wurden die Proben in den ersten Stunden und Tagen in kürzeren Intervallen entnommen und untersucht.

Für zukünftige Studien wären zusätzlich spätere Untersuchungen interessant, da wir in den ersten 10 Tagen nach Trauma noch kein Abflachen des Anstiegs von CD69 Expression und Thrombozytenzahl beobachten konnten.

9.2.3 Oberflächenmarker

Th17-Zellen werden charakterisiert durch die Oberflächenexpression von CD4, CD161 und CD196 (CCR6) und können auch über diese identifiziert werden (Sollazzo et al., 2011). Für CD4+ Tregs ist die Expression von CD4 und CD25 charakteristisch. CD25 ist ein IL-2 Rezeptor und spielt eine wichtige Rolle für die Homöostase von CD4+ Tregs (Letourneau et al., 2009). Es wird zwar auch auf anderen Subpopulationen von Lymphozyten exprimiert, gilt aber dennoch als etablierter Marker zur Identifikation von CD4+ Tregs (Triplett et al., 2012). FoxP3 reguliert die Entwicklung und Funktion von CD4+ Tregs und wird üblicherweise als intrazellulärer Marker für die Identifikation von CD4+ Tregs herangezogen (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Studien zeigten, dass die Verwendung von CD127 eine kosteneffektive Alternative zu FoxP3 darstellt (Dasgupta et al., 2013), und dass die Verwendung der Oberflächenmarker CD4, CD25 und CD127 zu einer sehr reinen Population von CD4+ Tregs führt (W. Liu et al., 2006). Es wurden zwar in der Literatur verschiedene Subtypen von

regulatorischen T-Zellen identifiziert (Zhang et al., 2014), in der vorliegenden Studie wurde aber nicht zwischen diesen Subpopulationen differenziert, da die Interaktion von CD4+ Tregs und Thrombozyten im posttraumatischen Setting generell nachgewiesen und charakterisiert werden sollte. Eine Analyse der beteiligten Subpopulationen wäre sicher in Zukunft, und bei einer größeren Stichprobengröße, sinnvoll.

Als Marker für die Aktivierung der Lymphozytenpopulationen wurden die Oberflächenproteine CD69, CD62L, TNF-Rezeptor II, und GITR verwendet, da diese als etabliert gelten und in vielen Studien verwendet werden (Chen & Oppenheim, 2011; Grailer et al., 2009; Ronchetti et al., 2004; Ziegler et al., 1994).

CD69 ist ein C-Lectin-Membranrezeptor vom Typ II, dessen Gene sich im Menschen auf Chromosom 12 befinden, und der bei Aktivierung von Leukozyten schnell exprimiert wird (Gonzalez-Amaro et al., 2013). Es wird vor allem bei chronischen Entzündungen und an Stellen der aktiven Immunantwort nachgewiesen und scheint als regulatorisches Molekül die Entzündungsreaktion zu modulieren (Sancho et al., 2005). CD69 vermittelt die Produktion von TGF- β und scheint bei der Regulierung des Gleichgewichts der Th1/Th2-Differenzierung beteiligt zu sein (Sancho et al., 2005). Während man früher davon ausging, dass die Expression von CD69 immunologische Reaktionen aktiviert, gehen mittlerweile immer mehr Studien davon aus, dass CD69 an der Hemmung lymphozytärer Funktionen beteiligt ist, und sich so eher immunsuppressiv auswirkt (Martin et al., 2010; Shioy et al., 2006). Einigkeit besteht jedoch dahingehend, dass CD69 sowohl in Th17-Lymphozyten, als auch in CD4+ Tregs eine wichtige Rolle bei der Regulation von Inflammation und Entzündung spielt (Cortes et al., 2014; Gonzalez-Amaro et al., 2013).

CD62L (L-Selektin) ist ein Typ I-Transmembranprotein aus der Gruppe der Selektine. Es dient als „Homing-Rezeptor“ für Lymphozyten und wird üblicherweise auf der Oberfläche verschiedener T-Zell Populationen exprimiert. Es vermittelt den Beginn der Adhäsionskaskade, das Binden und Rollen der Leukozyten an Endothelzellen, und ermöglicht somit die Migration von Leukozyten in Entzündungsgewebe und zur Immunüberwachung (Wedepohl et al., 2012). Die Migration von Lymphozyten aus der Blutbahn in entzündetes Gewebe und in lymphatisches Gewebe ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Immunüberwachung und die Steuerung adäquater Immunantworten. Darüber hinaus hat L-Selektin auch signalgebende Funktionen und vermittelt die Leukozytenrekrutierung in chronisch entzündetem Gewebe und bei Autoimmunerkrankungen (Grailer et al., 2009). Die

Migration von CD4⁺ Tregs ist in entzündetem Gewebe von besonderer Bedeutung, so scheinen CD4⁺ Tregs auch mehr CD62L zu exprimieren und einen höheren Turnover dieses Oberflächenproteins aufzuweisen (Venturi et al., 2007). Interessanterweise können CD4⁺ Tregs auch anhand der Expression von CD62L in verschiedene Subsets eingeteilt werden, wobei CD62L⁺ Subsets effektiver immunsuppressiv wirken als CD62L⁻ Populationen (Fu et al., 2004; Taylor et al., 2004). In dieser Studie wurde allerdings nicht differenziert zwischen unterschiedlichen Subpopulationen der CD4⁺ Tregs. CD62L sollte lediglich der Untersuchung der Aktivierung von CD4⁺ Tregs und Th17-Lymphozyten dienen.

Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor II (TNF-R II), auch CD120b genannt, ist ein Membranrezeptor der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Superfamilie, der nur auf Lymphozyten exprimiert wird. Er bindet TNF- α (Santee & Owen-Schaub, 1996), kann in Zellen eine Apoptose auslösen (Grell et al., 1994), trägt zur Proliferation von Thymozyten und peripheren T-Zellen (Tartaglia et al., 1993; Tartaglia et al., 1991), sowie zur Induktion der Zytokinsekretion in T-Zellen bei (Vandenabeele et al., 1992). Er ist außerdem bedeutend bei der Hemmung der Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen (Jacobsen et al., 1995) und bei der Inaktivierung und Clearance von TNF durch die Niere (Bemelmans et al., 1993). TNF-R II spielt besonders auch in CD4⁺ Tregs eine wichtige Rolle. Er wird nicht ausschließlich, aber überwiegend auf CD4⁺ Tregs exprimiert und trägt auf diesen entscheidend zur Aktivierung, Proliferation und zum Überleben CD4⁺ Tregs bei. Darüber hinaus scheint es eine entscheidende Bedeutung für die immunsuppressive Wirkung CD4⁺ Tregs zu haben, und in Bezug auf die Aktivität sogar wichtiger als CD25 zu sein (Chen & Oppenheim, 2011).

Glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR), auch Tumor necrosis factor receptor superfamily member 18 genannt, ist ebenfalls ein Mitglied der TNF-Rezeptor Superfamilie. Es wird bei Aktivierung von T-Zellen vermehrt exprimiert und trägt zur Regulation der CD4⁺ Treg-vermittelten immunologischen Selbsttoleranz bei. In Studien wurde eine duale Funktion von GITR beschrieben, da es sowohl an der Inaktivierung von T-Zellen beteiligt ist, als auch Aktivierung und Funktionalität von T-Zellen erhöhen kann (Kohm et al., 2004). Es gibt außerdem Hinweise, dass es die Apoptose von T-Zellen hemmt (Nocentini et al., 1997). GITR spielt eine Schlüsselrolle in CD4⁺ Tregs, und scheint in diesen immunsuppressiven Funktionen zu stimulieren (Shevach & Stephens, 2006; Shimizu et al., 2002). Es zeigt außerdem kostimulatorische Wirkungen auf deren Proliferation (Ronchetti et al., 2004), und ist an der

Regulation des Zusammenspiels von CD4+ Tregs und T-Effektorzellen beteiligt (Esparza & Arch, 2006).

Aufgrund der hier beschriebenen Bedeutung für die Aktivierung von T-Zellen, und im Speziellen für Proliferation und Funktion CD4+ regulatorischer T-Zellen, eigneten sich die verwendeten Antikörper gut, die Aktivierung von CD4+ Tregs und Th17-Zellen zu quantifizieren. Sicherlich existieren weitere Oberflächenmarker, deren Analyse für die Aktivität und Proliferation von T-Zellen interessant wäre, außerdem lässt sich durchaus für die Verwendung des intrazellulären Markers FoxP3 argumentieren. Die verwendeten Antikörper stellen jedoch durchaus ein valides Konzept dar, die Aktivierung der untersuchten Lymphozytenpopulationen zu evaluieren.

9.2.4 Thromboelastometrie

Zur Beurteilung der thrombozytären Gerinnungsfunktion, sowie der plasmatischen Gerinnung nach Trauma verwendeten wir das Verfahren der Rotationsthromboelastometrie (ROTEM®). ROTEM® stellt ein einfaches und schnelles Verfahren zur Quantifizierung von Gerinnungseigenschaften in Vollblut dar, mit dem außerdem die Gerinnselfestigkeit und Fibrinolyse beurteilt werden können. Es wird auch bereits im klinischen Setting als „Point-of-care“ Gerät für unterschiedlichste Indikationen verwendet, primär jedoch zur Diagnose von Gerinnungsstörungen. Da es sich um ein artifizielles System handelt, werden physiologische Verhältnisse nur bedingt dargestellt. Das Strömungsverhalten, verschiedene Medikamentenwirkungen und auch bestimmte Störungen der primären Hämostase können nicht adäquat abgebildet werden und bleiben so bei der Auswertung unberücksichtigt. Dennoch kommen mehrere Studien zu dem Schluss, dass sich ROTEM® gut eignet, systemische Störungen der in-vivo Koagulation zu diagnostizieren und besonders in Traumapatienten ein hilfreiches Instrument zur Steuerung von Transfusionen darstellen kann (Rugeri et al., 2007). Studien deuten zudem darauf hin, dass sich mittels ROTEM® die Mortalität in Traumapatienten vorhersagen lässt (Veigas et al., 2016). In dieser Studie sollte die Gerinnungsfunktion, sowie deren thrombozytärer und plasmatischer Beitrag in Polytraumapatienten untersucht und mit der Aktivierung CD4+ regulatorischer T-Zellen und Th17-Lymphozyten korreliert werden. Mit ROTEM® stand uns damit ein einfaches, schnelles und gut validiertes Verfahren zur Verfügung.

9.3 Diskussion der Ergebnisse

9.3.1 Aktivierung von CD4+ Tregs und Th17-Zellen

Wir fanden posttraumatisch einen deutlichen Anstieg der Aktivierung von CD4+ Tregs und Th17-Zellen, ausgedrückt durch einen signifikanten Anstieg der Expression des Oberflächenmarkers CD69. In vorangegangenen Studien konnte unsere Arbeitsgruppe bereits eine Aktivierung von CD4+ Tregs nach Trauma nachweisen (Hanschen et al., 2011). Auch andere Studien zeigen eine Induktion und Verstärkung der Aktivität von CD4+ Tregs und deren immunsuppressive Funktion nach Trauma (Ni Choileain et al., 2006). Viele weitere Studien kommen zu dem Schluss, dass CD4+ Tregs die Inflammation und Selbstreaktivität durch T-Zellen in Trauma und anderen entzündlichen Erkrankungen beeinflussen (Stoecklein et al., 2012). Darüber hinaus konnten Bergmann und Kollegen im Mausmodell zeigen, dass Thrombozyten in Wechselwirkung mit CD4+ Tregs die Immunantwort nach Trauma regulieren (Bergmann et al., 2016). Die Mechanismen, die der Aktivierung von CD4+ Tregs, sowie der Interaktion mit Thrombozyten zugrunde liegen, sind bislang jedoch noch weitgehend ungeklärt. Aktivierte CD4+ Tregs regulieren neben T-Zellen auch direkt B-Zellen und können so Immunreaktionen beeinflussen und Autoreaktivität verhindern (Zhao et al., 2006). Dennoch besteht in der Literatur keine Einigkeit über den Effekt von regulatorischen T-Zellen auf Outcomes in-vivo. Während einige Studien einen positiven Effekt auf das Outcome bei Sepsis zeigten (Heuer et al., 2005), hatten CD4+ Tregs in anderen Studien keinen Einfluss auf die Sepsis-Mortalität (Scumpia et al., 2006). Weiterhin ist unklar, welche Subtypen CD4+ regulatorischer T-Zellen in welcher Form an der posttraumatischen Immunregulation beteiligt sind. Mindestens 5 verschiedene Subtypen von regulatorischen T-Zellen werden unterschieden, darunter nTregs, iTregs, Tr1 Zellen, CD8(+) Tregs, und IL17-produzierende Tregs; allerdings bleibt die Funktion der einzelnen Subtypen bisher weiterhin unklar (Zhang et al., 2014). Wir haben bewusst auf eine Differenzierung unterschiedlicher Treg Subtypen verzichtet, da generell der Einfluss und die Interaktion mit Thrombozyten im posttraumatischen Setting untersucht werden sollte. Es herrscht allerdings bislang in der Literatur auch noch Uneinigkeit über Subpopulationen regulatorischer T-Zellen und deren Marker. Weiterhin weisen diese Zellen eine gewisse Plastizität auf, unter anderem ist in der Literatur eine Konversion regulatorischer T-Zellen in Th17-Zellen, die sogar gegensätzliche Funktionen aufweisen, beschrieben (Deknuydt et al., 2009). Im Hinblick auf die unterschiedlichen Funktionen von CD4+ Tregs und Th17-Zellen, sowie der Bedeutung derer

Balance für Entwicklung von SIRS, Sepsis und Organversagen (Guo et al., 2017), ist deren gleichzeitige Aktivierung und die Expression von CD69 auf beiden Lymphozytenpopulationen sehr interessant.

Hinsichtlich der posttraumatischen Interaktion von CD4+ Tregs mit Thrombozyten beschrieben Bock und Kollegen in vorangegangenen Arbeiten parakrine Interaktionen über TLR4 und TNFR-II (Bock et al., 2018). In der vorliegenden Studie wurden nur Oberflächenmarker von CD4+ Tregs und Th17-Zellen untersucht. Andere Mechanismen und Botenstoffe der Interaktion zwischen T-Zellen und Thrombozyten sollten zukünftig ebenfalls adressiert werden. Auch konnte eine Interaktion von Thrombozyten und CD4+ Tregs im Mausmodell nur früh nach Trauma beobachtet werden (Bergmann et al., 2016). Dabei sollte jedoch nicht unberücksichtigt bleiben, dass das humane und murine Immunsystem signifikante Unterschiede in deren Funktionsweise aufweisen (Mestas & Hughes, 2004). Zusätzliche Subgruppenanalysen und der Einfluss der CD4+ Treg/Th17- Aktivierung auf das klinische Outcome sollte in weiteren Studien und bei Weiterführung der Studie mit einer größeren Studienpopulation untersucht werden. Darüber hinaus wären auch Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten interessant, da innerhalb der ersten 10 Tage nach Trauma kein Abflachen des Anstiegs der Leukozytenaktivierung verzeichnet werden konnte. Durch Vergrößerung der Studienpopulation könnten zusätzlich weitere Zusammenhänge entdeckt und validere Aussagen getroffen werden.

9.3.2 Thrombozytäre Gerinnungs- und Immunfunktion

Obwohl sich die Aktivierungsparameter CD62P, CD63, und TLR9 in den ersten 10 Tagen nach Trauma nicht signifikant änderten, konnten wir einen deutlichen, signifikanten Anstieg der Thrombozytenzahl nach Trauma beobachten. Gleichzeitig fiel der thrombozytäre Beitrag an der Gerinnungsfunktion über die gleiche Zeit ab. Eine intravasale Koagulopathie, die nicht selten nach schweren Verletzungen und Immobilisation auftritt, könnte den Effekt der Zunahme der Thrombozytenzahl abgeschwächt haben. Andererseits könnte ein Teil des Anstiegs auch auf die Transfusion von Thrombozyten zurückzuführen sein. Die eingeschränkte Funktion transfundierter Thrombozyten könnte zur Abnahme des Beitrags der Thrombozyten an der Gerinnung mitgewirkt, aber ebenfalls auch immunologische Funktionen beeinflusst haben (Cauwenberghs et al., 2007; Ng et al., 2018). Dabei ist jedoch noch fraglich, inwieweit die Gerinnungsfunktion und deren Einschränkung mit der immunologischen Funktion von Thrombozyten zusammenhängt.

Dass Thrombozyten mit verschiedenen Zellen des Immunsystems wechselwirken und dadurch immunologische Funktionen modulieren, ist bekannt. Verschiedene Signalrezeptoren auf Thrombozyten, die für die Hämostase entscheidend sind, haben entzündungshemmende oder immunregulatorische Funktionen (Vieira-de-Abreu et al., 2012). Viele Studien beschreiben die Bedeutung der Thrombozyten für die Regulation der Immunfunktion. Sie übernehmen zahlreiche Funktionen der angeborenen und erworbenen Immunität, exprimieren und sezernieren zahlreiche Moleküle, mittels derer Immunantworten initiiert und moduliert werden (Semple et al., 2011).

Die Studienlage zur Thrombozytenfunktion nach Trauma ist allerdings uneindeutig. Während einige Studien im Tiermodell eine Zunahme der Thrombozytenaktivität und eine endotoxinvermittelte gesteigerte Akkumulation und Aggregation nachweisen (Almqvist et al., 1983; Beijer et al., 1987; Itoh et al., 1996), stellen andere Studien im Mausmodell eine beeinträchtigte Thrombozytenfunktion und einen Anstieg der Thrombozytenzahl 6 Tage nach Trauma fest (Midura et al., 2016). In klinischen Studien wird mehrfach über verminderte Thrombozytenzahl und -funktion in Sepsis-Patienten (Cowan et al., 1976; Leytin et al., 2002), wie auch in Trauma-Patienten (Kutcher et al., 2012) berichtet. Auch prognostisch kommt der Thrombozytenanzahl in mehreren Studien Bedeutung zu. Eine klinische Studie zeigt eine inverse Korrelation der Thrombozytenzahl nach Trauma mit der 24-Stunden Mortalität, und schließt daraus, dass Patienten von einer erhöhten Thrombozytenzahl und einer niedrigeren Transfusionsschwelle profitieren könnten (Brown et al., 2011). Eine beeinträchtigte Thrombozytenfunktion war in Sepsis-Patienten auch prognostisch für spätere Organ-Dysfunktionen und das Patientenoutcome von Bedeutung (Lundahl et al., 1998). In einer anderen klinischen Studie wiesen Patienten mit Thrombozytopenie an Tag 4 eine deutlich erhöhte Mortalität als die restlichen Patienten auf (33% zu 16%) (Akca et al., 2002).

Immer mehr Studien weisen zudem die immunologische Funktion von Thrombozyten und deren Interaktion mit Zellen des Immunsystems nach (Stokes & Granger, 2012). Auch im Mausmodell wurde eine Modulation der systemischen Immunantwort nach Trauma durch Thrombozyten beschrieben (Elzey et al., 2003). In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass Thrombozyten durch die Interaktion mit CD4⁺ Tregs die Immunreaktion nach Trauma beeinflussen. (Bergmann et al., 2016).

Die Thrombozytenanzahl und -aktivierung könnte im klinischen Kontext als diagnostischer Marker für immunologische Dysbalance sowie zur Prognose des Outcomes in Trauma- und Sepsispatienten verwendet werden. Darüber hinaus könnten Thrombozyten ein Ziel für eine immunmodulatorische Therapie darstellen.

9.3.3 Plasmatische Gerinnung

Es zeigte sich eine Zunahme der Gerinnungsfunktion im extrinsischen sowie im intrinsischen Weg der Gerinnung, ausgedrückt durch eine kürzere Zeit bis zur Gerinnelbildung (Clot Formation Time), sowie eine höhere Festigkeit des gebildeten Blutgerinnsels (Maximum Clot Firmness). Diese Zunahme war vor allem bedingt durch plasmatische Gerinnungsfaktoren. Bluttransfusionen wurden bei der Auswertung allerdings nicht berücksichtigt, und könnten das Ergebnis der Gerinnungsmessung beeinflussen haben. Da es sich bei der Messung mittels ROTEM® um ein artifizielles System handelt, können auch Einflussgrößen wie das Strömungsverhalten, Medikamentenwirkungen, und Wechselwirkungen mit Endothelzellen und anderen Molekülen nicht adäquat abgebildet werden. Trotzdem kommen viele Studien zu dem Schluss, dass sich ROTEM®, besonders in Trauma Patienten, gut zur Diagnose von in-vivo Gerinnungsstörungen eignet (Rugeri et al., 2007).

Der Einfluss von Trauma auf die Gerinnung ist schon länger bekannt, und ist häufig zu beobachten. In einer Studie von Engelman und Kollegen wiesen 85% der untersuchten Polytraumapatienten eine Hyperkoagulabilität auf (Engelman et al., 1996). Diese wird auch als (akute) traumatische Koagulopathie bezeichnet, und kann von prognostischer Bedeutung sein, da dieser Zustand mit einem schlechten klinischen Outcome assoziiert ist (Cap & Hunt, 2015). Auch eine Hyperfibrinolyse, die nicht selten nach Trauma auftritt, korrelierte mit Outcome (Schochl et al., 2009). Unter anderem kann die erhöhte Bildung und gestörte Regulation von Thrombin dabei einen hyperkoagulativen Zustand in Patienten auslösen (Selby et al., 2009). Neben der Gefahr einer venösen Thrombose und Thrombembolie, scheint der Grad der Gerinnungsaktivierung außerdem mit Organversagen und mit der Prognose nach Verletzungen zusammenzuhängen (Garcia-Avello et al., 1998).

Zwar wurde in einer klinischen Studie von Schreiber und Kollegen eine Hyperkoagulabilität nach Trauma vor allem in den ersten 24 Stunden nachgewiesen, wobei diese in Frauen deutlich stärker ausgeprägt war als in Männern (Schreiber et al., 2005). Wilson und Kollegen konnten jedoch zeigen, dass nach operativer Versorgung von Femurhalsfrakturen eine

Hyperkoagulabilität nachweisbar war, die selbst 6 Wochen nach OP noch bestand (Wilson et al., 2001).

Immer mehr Studien zeigen Zusammenhänge zwischen Gerinnung und Immunfunktion auf. Dabei scheinen sich Gerinnungssystem und Entzündungsreaktion gegenseitig zu beeinflussen (Levi et al., 2004). Auch mikrovaskuläre Störungen, sowie die Aktivierung und Dysfunktion von Endothelzellen, spielen dabei nicht nur für die Gerinnung, sondern auch für die Initiation, Aufrechterhaltung und Modulation der Immunfunktion eine wichtige Rolle (Aird, 2003). Eine systemische Entzündung führt zur Aktivierung der Gerinnung, und zur Hemmung antikoagulatorischer Mechanismen und der Fibrinolyse (Schouten et al., 2008). Gleichzeitig trägt die Gerinnungsaktivierung und Fibrinablagerung zur Abwehr von Infektionserregern und zur Eindämmung der Entzündungsreaktion bei (Bateman et al., 2003). Bei der Gerinnungsaktivierung in inflammatorischen Zuständen stellen vor allem Zytokine entscheidende Faktoren dar (Esmon, 2005). Auch Tissue Factor, der von Endothelzellen, aber auch von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (Osterud & Flaegstad, 1983), ist für die Kommunikation zwischen Gerinnung und Entzündung von Bedeutung. Zellfragmente von aktivierten oder apoptotischen Zellen, sogenannte Mikropartikel, können zusätzlich die Gerinnung beeinflussen (Schouten et al., 2008).

Der Zeitpunkt der Normalisierung der Gerinnungsfunktionen sowie Mechanismen und deren Einflussfaktoren, sollten zukünftig weiter untersucht werden. Ein besseres Verständnis dieser Vorgänge, sowie derer Komponenten könnte zur Prognose, aber auch für Diagnose und Regulation hämostatischer, sowie mittelbar auch Immunologischer Dysbalancen, beitragen.

9.3.4 Korrelation zwischen Immunologie und Gerinnung

Die CD69 Expression stieg innerhalb der ersten 10 Tage nach Trauma sowohl auf CD4+ Tregs, wie auch auf Th17-Zellen signifikant an, gleichzeitig lag ein deutlicher, signifikanter Anstieg der Thrombozytenzahl vor. Wir fanden zwischen dem Anstieg der CD69 Expression und dem Anstieg der Thrombozyten einen signifikanten, mäßig starken positiven linearen Zusammenhang. Wir konnten damit erstmals im Menschen einen positiven Zusammenhang zwischen der Aktivierung CD4+ Tregs und Th17-Zellen, und der Expansion von Thrombozyten nachweisen und quantifizieren.

Auch hier gilt allerdings, dass die untersuchte Stichprobengröße mit 20 Patienten eher gering, und dass nach Abschluss der letzten Messung keine Normalisierung zu Ausgangswerten zu

beobachten war. Sinnvoll wäre daher, die Messungen über einen längeren Zeitraum durchzuführen, bis sich ein konstantes Niveau in Thrombozytenzahl und T-Zell Aktivierung einstellt. Außerdem könnten durch den Einschluss weiterer Patienten mittels Subgruppenanalysen zusätzliche Einflussfaktoren identifiziert und Zusammenhänge mit dem Patientenoutcome aufgedeckt werden.

Dass Thrombozyten mit Zellen des Immunsystems interagieren, und an verschiedenen Immunreaktionen beteiligt sind, ist bekannt. Sie sind ein Bestandteil von Entzündungsreaktionen und spielen für angeborene und erworbene Immunität eine wichtige Rolle (Elzey et al., 2005). Sie sind sowohl an Entzündungsprozessen, wie auch an Immunreaktionen maßgeblich beteiligt (Jenne et al., 2013). Thrombozyten fördern die Differenzierung von CD4+ T-Zellen, sowie deren Zytokinproduktion und -freisetzung, einschließlich der Zytokine, die für Th17-Zellen und CD4+ Tregs charakteristisch sind (Gerdes et al., 2011). Sie bilden Zell-Zell-Kontakte zu Lymphozyten aus, und können deren Aktivität stimulieren oder hemmen und unterstützen außerdem die transendotheliale Migration dieser Zellen (Klinger & Jelkmann, 2002). Es wurde gezeigt, dass Thrombozyten sowohl CD4+ Tregs, als auch Th17-Zellen direkt beeinflussen. Während sie die Zellantwort von CD4+ Tregs fördern, scheinen sie auf Th17-Zellen einen biphasischen Einfluss zu haben, nämlich erstmalig eine Verstärkung, gefolgt von einer Suppression (Zhu et al., 2014). Eine Modulation der Thrombozytenaktivierung könnte die Regulation der Immunaktivierung, und gleichzeitig die Pathogen-Clearance verbessern und die Gewebeschädigung in schweren Entzündungen mildern; da viele der beteiligten Mediatoren sehr spezifisch sind, könnte deren Regulation spezifischer wirken als eine klassische Breitspektrum-Immunsuppression (Jenne et al., 2013). Klinische Daten zeigen sogar, dass eine Thrombozytenaggregationshemmung mit einer verringerten Kurzzeit-Mortalität, niedrigerer Prävalenz akuter Lungenschäden, sowie verringerter Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Therapie einhergeht, ohne dabei das Blutungsrisiko signifikant zu erhöhen (Akinosoglou & Alexopoulos, 2014). Dies lässt den Schluss zu, dass anhand Thrombozytenzahl und -aktivierung frühzeitig immunologische Dysbalancen erkannt, und durch deren Modulation die Immunreaktionen beeinflusst, und somit neue Konzepte zur Therapie entwickelt werden könnten.

10 Schlussfolgerung

10.1 Bedeutung der Studie

In der vorliegenden Studie sollte im Menschen die Aktivierung von CD4+ Tregs und Th17-Zellen im posttraumatischen Setting, sowie deren Zusammenhang mit einer Änderung in der Thrombozytenzahl und -aktivierung untersucht werden. Dabei konnte erstmals ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der ansteigenden Aktivierung von CD4+ Tregs und Th17-Zellen mit einer Zunahme der Thrombozytenzahl gezeigt werden. Immer mehr Studien weisen auf die immunologische Bedeutung der Thrombozyten, und auf deren Interaktion mit Zellen des Immunsystems – unter anderem auch CD4+ Tregs und Th17-Zellen – hin. Diese sind insofern besonders von Bedeutung, als sie maßgeblich zur immunologischen Regulation nach Trauma beitragen. Dysbalancen können über SIRS und/oder CARS zu schweren Organschäden führen, und die Mortalität nach Trauma bedeutend beeinflussen. Diese Studie soll dazu beitragen, die Mechanismen der Interaktion dieser Zellen besser zu verstehen, und in Zukunft neue diagnostische und therapeutische Konzepte zu entwickeln, immunologische Dysbalancen nach Trauma früher erkennen und besser therapieren zu können.

10.2 Ausblick

Nachdem ein relevanter Zusammenhang zwischen der Aktivierung von CD4+ Tregs und Th17-Zellen mit der Expansion der Thrombozyten gezeigt werden konnte, stellt sich die Frage nach weiteren Mechanismen der Interaktion, sowie deren Effekt auf das klinische Outcome der Patienten. Weiterhin bleibt unklar, wie sich Thrombozyten und die untersuchten T-Zell Populationen nach dem Zeitraum von zehn Tagen nach Trauma verhalten. Durch den fortgeführten Patienteneinschluss in die Studie und die Durchführung von Subgruppenanalysen, sollen weitere Erkenntnisse gewonnen und validere Aussagen über die untersuchten Zusammenhänge getroffen werden. Auch die Untersuchung über einen längeren Zeitraum könnte sinnvoll sein, um herauszufinden, nach welcher Zeit und in welcher Form sich ein konstantes Niveau von Thrombozytenzahl und T-Zell Aktivierung einstellt. Darüber hinaus könnte der Einfluss einer Thrombozytenaggregationshemmung, sowie der Gabe von Blutprodukten untersucht werden.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben:

Meinem Doktorvater PD Dr. Marc Hanschen möchte ich einen besonderen Dank aussprechen für die enorme Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit, den regelmäßigen konstruktiven Austausch und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten mit der Möglichkeit, meine Forschungsergebnisse mit internationalem Fachpublikum zu diskutieren.

Ich danke dem gesamten Team der Experimentellen Unfallchirurgie für die gute Zusammenarbeit, sowie die technische und organisatorische Unterstützung und den kollegialen Austausch auf fachlicher und persönlicher Ebene. Insbesondere danke ich Laura Heimann, Sandra Schneider, Fritz Seidl, Marina Unger, Anna Friesen und Friederike Hefele.

Ebenso danke ich meinen Freunden, Verwandten und Studienkollegen, die mich während der gesamten Zeit begleitet und unterstützt haben und das Studium zu einem ganz besonderen Lebensabschnitt gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder für ihre fortwährende Unterstützung, ihre unermüdliche Motivation und ihre vielen guten Ratschläge bei der Erstellung dieser Arbeit sowie während des gesamten Studiums. Ich bin euch unendlich dankbar.

12 Literaturverzeichnis

- Adamzik, M., Gorlinger, K., Peters, J., & Hartmann, M. (2012). Whole blood impedance aggregometry as a biomarker for the diagnosis and prognosis of severe sepsis. *Crit Care*, *16*(5), R204. doi:10.1186/cc11816
- Ahmad, S. S., Rawala-Sheikh, R., & Walsh, P. N. (1992). Components and assembly of the factor X activating complex. *Semin Thromb Hemost*, *18*(3), 311-323. doi:10.1055/s-2007-1002570
- Aird, W. C. (2003). The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*, *101*(10), 3765-3777. doi:10.1182/blood-2002-06-1887
- Akca, S., Haji-Michael, P., de Mendonca, A., Suter, P., Levi, M., & Vincent, J. L. (2002). Time course of platelet counts in critically ill patients. *Crit Care Med*, *30*(4), 753-756. doi:10.1097/00003246-200204000-00005
- Akinosoglou, K., & Alexopoulos, D. (2014). Use of antiplatelet agents in sepsis: a glimpse into the future. *Thromb Res*, *133*(2), 131-138. doi:10.1016/j.thromres.2013.07.002
- Allgemeiner Jahresbericht 2018, TraumaRegister DGU®. Abgerufen auf http://www.traumaregister-dgu.de/fileadmin/user_upload/traumaregister-dgu.de/docs/Downloads/TR-DGU-Jahresbericht_2018.pdf
- Almqvist, P., Kuenzig, M., & Schwartz, S. I. (1983). Effect of naloxone on endotoxin-induced pulmonary platelet sequestration. *Acta Chir Scand*, *149*(1), 23-26. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6340398>
- Arbones, M. L., Ord, D. C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D. J., & Tedder, T. F. (1994). Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity*, *1*(4), 247-260. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7534203>
- Baker, S. P., O'Neill, B., Haddon, W., Jr., & Long, W. B. (1974). The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J Trauma*, *14*(3), 187-196. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4814394>
- Bateman, R. M., Sharpe, M. D., & Ellis, C. G. (2003). Bench-to bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care*, *7*(5), 359-373. doi:10.1186/cc2353
- Baue, A. E., Durham, R., & Faist, E. (1998). Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock*, *10*(2), 79-89. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721973>
- Beijer, L., Botting, J., Crook, P., Oyekan, A. O., Page, C. P., & Rylander, R. (1987). The involvement of platelet activating factor in endotoxin-induced pulmonary platelet recruitment in the guinea-pig. *Br J Pharmacol*, *92*(4), 803-808. doi:10.1111/j.1476-5381.1987.tb11384.x
- Bemelmans, M. H., Gouma, D. J., & Buurman, W. A. (1993). Influence of nephrectomy on tumor necrosis factor clearance in a murine model. *J Immunol*, *150*(5), 2007-2017.
- Bergmann, C. B., Hefele, F., Unger, M., Huber-Wagner, S., Biberthaler, P., van Griensven, M., & Hanschen, M. (2016). Platelets modulate the immune response following trauma by interaction with CD4+ T regulatory cells in a mouse model. *Immunol Res*, *64*(2), 508-517. doi:10.1007/s12026-015-8726-1

- Bland, J. M., & Altman, D. G. (1995). Calculating correlation coefficients with repeated observations: Part 1--Correlation within subjects. *BMJ*, *310*(6977), 446. doi:10.1136/bmj.310.6977.446
- Bock, M., Bergmann, C. B., Jung, S., Kalbitz, M., Relja, B., Huber-Wagner, S., Biberthaler, P., van Griensven, M., & Hanschen, M. (2018). The posttraumatic activation of CD4+ T regulatory cells is modulated by TNFR2- and TLR4-dependent pathways, but not by IL-10. *Cell Immunol*, *331*, 137-145. doi:10.1016/j.cellimm.2018.06.009
- Boilard, E., Nigrovic, P. A., Larabee, K., Watts, G. F., Coblyn, J. S., Weinblatt, M. E., Massarotti, E. M., Remold-O'Donnell, E., Farndale, R. W., Ware, J., & Lee, D. M. (2010). Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*, *327*(5965), 580-583. doi:10.1126/science.1181928
- Bone, R. C. (1996a). 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*(8), 680-687. doi:10.7326/0003-4819-125-8-199610150-00009
- Bone, R. C. (1996b). Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*, *24*(7), 1125-1128. doi:10.1097/00003246-199607000-00010
- Bouchard, B. A., Mann, K. G., & Butenas, S. (2010). No evidence for tissue factor on platelets. *Blood*, *116*(5), 854-855. doi:10.1182/blood-2010-05-285627
- Brown, L. M., Call, M. S., Margaret Knudson, M., Cohen, M. J., Trauma Outcomes, G., Holcomb, J. B., Wade, C. E., Brasel, K. J., Vercruyssen, G., MacLeod, J., Dutton, R. P., Hess, J. R., Duchesne, J. C., McSwain, N. E., Muskat, P., Johannigam, J., Cryer, H. M., Tillou, A., Pittet, J. F., De Moya, M. A., Schreiber, M. A., Tieu, B., Brundage, S., Napolitano, L. M., Brunsvold, M., Beilman, G., Peitzman, A. B., Zenait, M. S., Sperry, J., Alarcon, L., Croce, M. A., Minei, J. P., Kozar, R., Gonzalez, E. A., Stewart, R. M., Cohn, S. M., Mickalek, J. E., Bulger, E. M., Cotton, B. A., Nunez, T. C., Ivatury, R., Meredith, J. W., Miller, P., Pomper, G. J., & Marin, B. (2011). A normal platelet count may not be enough: the impact of admission platelet count on mortality and transfusion in severely injured trauma patients. *J Trauma*, *71*(2 Suppl 3), S337-342. doi:10.1097/TA.0b013e318227f67c
- Brucklacher-Waldert, V., Steinbach, K., Lioznov, M., Kolster, M., Holscher, C., & Tolosa, E. (2009). Phenotypical characterization of human Th17 cells unambiguously identified by surface IL-17A expression. *J Immunol*, *183*(9), 5494-5501. doi:10.4049/jimmunol.0901000
- Butt, I., & Shrestha, B. M. (2008). Two-hit hypothesis and multiple organ dysfunction syndrome. *JNMA J Nepal Med Assoc*, *47*(170), 82-85. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18709037>
- Cap, A., & Hunt, B. J. (2015). The pathogenesis of traumatic coagulopathy. *Anaesthesia*, *70* Suppl 1, 96-101, e132-104. doi:10.1111/anae.12914
- Cauwenberghs, S., van Pampus, E., Curvers, J., Akkerman, J. W., & Heemskerk, J. W. (2007). Hemostatic and signaling functions of transfused platelets. *Transfus Med Rev*, *21*(4), 287-294. doi:10.1016/j.tmr.2007.05.004
- Chen, X., & Oppenheim, J. J. (2011). The phenotypic and functional consequences of tumour necrosis factor receptor type 2 expression on CD4(+) FoxP3(+) regulatory T cells. *Immunology*, *133*(4), 426-433. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03460.x
- Cibrian, D., & Sanchez-Madrid, F. (2017). CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*, *47*(6), 946-953. doi:10.1002/eji.201646837

- Claridge, J. A., Leukhardt, W. H., Golob, J. F., McCoy, A. M., & Malangoni, M. A. (2010). Moving beyond traditional measurement of mortality after injury: evaluation of risks for late death. *J Am Coll Surg*, *210*(5), 788-794, 794-786. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2009.12.035
- Collighan, N., Giannoudis, P. V., Kourgeraki, O., Perry, S. L., Guillou, P. J., & Bellamy, M. C. (2004). Interleukin 13 and inflammatory markers in human sepsis. *Br J Surg*, *91*(6), 762-768. doi:10.1002/bjs.4521
- Cortes, J. R., Sanchez-Diaz, R., Bovolenta, E. R., Barreiro, O., Lasarte, S., Matesanz-Marin, A., Toribio, M. L., Sanchez-Madrid, F., & Martin, P. (2014). Maintenance of immune tolerance by Foxp3+ regulatory T cells requires CD69 expression. *J Autoimmun*, *55*, 51-62. doi:10.1016/j.jaut.2014.05.007
- Cossarizza, A., Chang, H. D., Radbruch, A., Akdis, M., Andra, I., Annunziato, F., Bacher, P., Barnaba, V., Battistini, L., Bauer, W. M., Baumgart, S., Becher, B., Beisker, W., Berek, C., Blanco, A., Borsellino, G., Boulais, P. E., Brinkman, R. R., Buscher, M., Busch, D. H., Bushnell, T. P., Cao, X., Cavani, A., Chattopadhyay, P. K., Cheng, Q., Chow, S., Clerici, M., Cooke, A., Cosma, A., Cosmi, L., Cumano, A., Dang, V. D., Davies, D., De Biasi, S., Del Zotto, G., Della Bella, S., Dellabona, P., Deniz, G., Dessing, M., Diefenbach, A., Di Santo, J., Dieli, F., Dolf, A., Donnenberg, V. S., Dorner, T., Ehrhardt, G. R. A., Endl, E., Engel, P., Engelhardt, B., Esser, C., Everts, B., Dreher, A., Falk, C. S., Fehniger, T. A., Filby, A., Fillatreau, S., Follo, M., Forster, I., Foster, J., Foulds, G. A., Frenette, P. S., Galbraith, D., Garbi, N., Garcia-Godoy, M. D., Geginat, J., Ghoreschi, K., Gibellini, L., Goettlinger, C., Goodyear, C. S., Gori, A., Grogan, J., Gross, M., Grutzkau, A., Grummitt, D., Hahn, J., Hammer, Q., Hauser, A. E., Haviland, D. L., Hedley, D., Herrera, G., Herrmann, M., Hiepe, F., Holland, T., Hombrink, P., Houston, J. P., Hoyer, B. F., Huang, B., Hunter, C. A., Iannone, A., Jack, H. M., Javega, B., Jonjic, S., Juelke, K., Jung, S., Kaiser, T., Kalina, T., Keller, B., Khan, S., Kienhofer, D., Kroneis, T., Kunkel, D., Kurts, C., Kvistborg, P., Lannigan, J., Lantz, O., Larbi, A., LeibundGut-Landmann, S., Leipold, M. D., Levings, M. K., Litwin, V., Liu, Y., Lohoff, M., Lombardi, G., Lopez, L., Lovett-Racke, A., Lubberts, E., Ludewig, B., Lugli, E., Maecker, H. T., Martrus, G., Matarese, G., Maueroder, C., McGrath, M., McInnes, I., Mei, H. E., Melchers, F., Melzer, S., Mielenz, D., Mills, K., Mirrer, D., Mjosberg, J., Moore, J., Moran, B., Moretta, A., Moretta, L., Mosmann, T. R., Muller, S., Muller, W., Munz, C., Multhoff, G., Munoz, L. E., Murphy, K. M., Nakayama, T., Nasi, M., Neudorfl, C., Nolan, J., Nourshargh, S., O'Connor, J. E., Ouyang, W., Oxenius, A., Palankar, R., Panse, I., Peterson, P., Peth, C., Petriz, J., Philips, D., Pickl, W., Piconese, S., Pinti, M., Pockley, A. G., Podolska, M. J., Pucillo, C., Quataert, S. A., Radstake, T., Rajwa, B., Rebhahn, J. A., Recktenwald, D., Remmerswaal, E. B. M., Rezvani, K., Rico, L. G., Robinson, J. P., Romagnani, C., Rubartelli, A., Ruckert, B., Ruland, J., Sakaguchi, S., Sala-de-Oyanguren, F., Samstag, Y., Sanderson, S., Sawitzki, B., Scheffold, A., Schiemann, M., Schildberg, F., Schimisky, E., Schmid, S. A., Schmitt, S., Schober, K., Schuler, T., Schulz, A. R., Schumacher, T., Scotta, C., Shankey, T. V., Shemer, A., Simon, A. K., Spidlen, J., Stall, A. M., Stark, R., Stehle, C., Stein, M., Steinmetz, T., Stockinger, H., Takahama, Y., Tarnok, A., Tian, Z., Toldi, G., Tornack, J., Traggiai, E., Trotter, J., Ulrich, H., van der Braber, M., van Lier, R. A. W., Veldhoen, M., Vento-Asturias, S., Vieira, P., Voehringer, D., Volk, H. D., von Volkman, K., Waisman, A., Walker, R., Ward, M. D., Warnatz, K., Warth, S., Watson, J. V., Watzl, C., Wegener, L., Wiedemann, A., Wienands, J., Willimsky, G., Wing, J., Wurst, P., Yu, L., Yue, A., Zhang, Q., Zhao, Y., Ziegler, S., & Zimmermann, J. (2017). Guidelines for the use of flow

- cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol*, 47(10), 1584-1797. doi:10.1002/eji.201646632
- Cowan, D. H., Bowman, L. S., Fratianne, R. B., & Ahmed, F. (1976). Platelet aggregation as a sign of septicemia in thermal injury. A prospective study. *JAMA*, 235(12), 1230-1234.
- Cox, G. (1996). IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol*, 271(4 Pt 1), L566-571. doi:10.1152/ajplung.1996.271.4.L566
- Dasgupta, A., Mahapatra, M., & Saxena, R. (2013). Flow cytometric immunophenotyping of regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: comparative assessment of various markers and use of novel antibody panel with CD127 as alternative to transcription factor FoxP3. *Leuk Lymphoma*, 54(4), 778-789. doi:10.3109/10428194.2012.730614
- Davenport, R. (2013). Pathogenesis of acute traumatic coagulopathy. *Transfusion*, 53 Suppl 1, 23S-27S. doi:10.1111/trf.12032
- Davenport, R. A., & Brohi, K. (2009). Coagulopathy in trauma patients: importance of thrombocyte function? *Curr Opin Anaesthesiol*, 22(2), 261-266. doi:10.1097/ACO.0b013e328325a6d9
- de Stoppelaar, S. F., van 't Veer, C., & van der Poll, T. (2014). The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost*, 112(4), 666-677. doi:10.1160/TH14-02-0126
- Deknuydt, F., Bioley, G., Valmori, D., & Ayyoub, M. (2009). IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells. *Clin Immunol*, 131(2), 298-307. doi:10.1016/j.clim.2008.12.008
- Demetriades, D., Kimbrell, B., Salim, A., Velmahos, G., Rhee, P., Preston, C., Gruzinski, G., & Chan, L. (2005). Trauma deaths in a mature urban trauma system: is "trimodal" distribution a valid concept? *J Am Coll Surg*, 201(3), 343-348. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2005.05.003
- Deutsch, V. R., & Tomer, A. (2006). Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol*, 134(5), 453-466. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06215.x
- Dong, C. (2011). Genetic controls of Th17 cell differentiation and plasticity. *Exp Mol Med*, 43(1), 1-6. doi:10.3858/emm.2011.43.1.007
- Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Merrill-Skoloff, G., Furie, B., & Furie, B. C. (2006). Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood*, 107(10), 3902-3906. doi:10.1182/blood-2005-09-3687
- Elzey, B. D., Sprague, D. L., & Ratliff, T. L. (2005). The emerging role of platelets in adaptive immunity. *Cell Immunol*, 238(1), 1-9. doi:10.1016/j.cellimm.2005.12.005
- Elzey, B. D., Tian, J., Jensen, R. J., Swanson, A. K., Lees, J. R., Lentz, S. R., Stein, C. S., Nieswandt, B., Wang, Y., Davidson, B. L., & Ratliff, T. L. (2003). Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity*, 19(1), 9-19. doi:10.1016/s1074-7613(03)00177-8
- Engelman, D. T., Gabram, S. G., Allen, L., Ens, G. E., & Jacobs, L. M. (1996). Hypercoagulability following multiple trauma. *World J Surg*, 20(1), 5-10. doi:10.1007/s002689900001
- Ertel, W., Keel, M., Steckholzer, U., Ungethum, U., & Trentz, O. (1996). Interleukin-10 attenuates the release of proinflammatory cytokines but depresses splenocyte functions in murine endotoxemia. *Arch Surg*, 131(1), 51-56. doi:10.1001/archsurg.1996.01430130053009
- Esmon, C. T. (2005). The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol*, 131(4), 417-430. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05753.x
- Esparza, E. M., & Arch, R. H. (2006). Signaling triggered by glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene: regulation at the interface between

- regulatory T cells and immune effector cells. *Front Biosci*, 11, 1448-1465. doi:10.2741/1895
- FlowCAP - Flow Cytometry: Critical Assessment of Population Identification Methods. Abgerufen auf <http://flowcap.flowsite.org/>
- Fohse, L., Suffner, J., Suhre, K., Wahl, B., Lindner, C., Lee, C. W., Schmitz, S., Haas, J. D., Lamprecht, S., Koenecke, C., Bleich, A., Hammerling, G. J., Malissen, B., Suerbaum, S., Forster, R., & Prinz, I. (2011). High TCR diversity ensures optimal function and homeostasis of Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 41(11), 3101-3113. doi:10.1002/eji.201141986
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4(4), 330-336. doi:10.1038/ni904
- Fu, S., Yopp, A. C., Mao, X., Chen, D., Zhang, N., Chen, D., Mao, M., Ding, Y., & Bromberg, J. S. (2004). CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *Am J Transplant*, 4(1), 65-78. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14678036>
- Gaertner, F., & Massberg, S. (2016). Blood coagulation in immunothrombosis-At the frontline of intravascular immunity. *Semin Immunol*, 28(6), 561-569. doi:10.1016/j.smim.2016.10.010
- Garcia-Avello, A., Lorente, J. A., Cesar-Perez, J., Garcia-Frade, L. J., Alvarado, R., Arevalo, J. M., Navarro, J. L., & Esteban, A. (1998). Degree of hypercoagulability and hyperfibrinolysis is related to organ failure and prognosis after burn trauma. *Thromb Res*, 89(2), 59-64. doi:10.1016/s0049-3848(97)00291-0
- Gebhard, F., Pfetsch, H., Steinbach, G., Strecker, W., Kinzl, L., & Bruckner, U. B. (2000). Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? *Arch Surg*, 135(3), 291-295. doi:10.1001/archsurg.135.3.291
- Gerdes, N., Zhu, L., Ersoy, M., Hermansson, A., Hjemdahl, P., Hu, H., Hansson, G. K., & Li, N. (2011). Platelets regulate CD4(+) T-cell differentiation via multiple chemokines in humans. *Thromb Haemost*, 106(2), 353-362. doi:10.1160/TH11-01-0020
- Gonzalez-Amaro, R., Cortes, J. R., Sanchez-Madrid, F., & Martin, P. (2013). Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med*, 19(10), 625-632. doi:10.1016/j.molmed.2013.07.006
- Grailer, J. J., Kodera, M., & Steeber, D. A. (2009). L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. *J Dermatol Sci*, 56(3), 141-147. doi:10.1016/j.jdermsci.2009.10.001
- Grell, M., Zimmermann, G., Hulser, D., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (1994). TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. *J Immunol*, 153(5), 1963-1972.
- Gunst, M., Ghaemmaghami, V., Gruszecki, A., Urban, J., Frankel, H., & Shafi, S. (2010). Changing epidemiology of trauma deaths leads to a bimodal distribution. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 23(4), 349-354. doi:10.1080/08998280.2010.11928649
- Guo, J., Tao, W., Tang, D., & Zhang, J. (2017). Th17/regulatory T cell imbalance in sepsis patients with multiple organ dysfunction syndrome: attenuated by high-volume hemofiltration. *Int J Artif Organs*, 40(11), 607-614. doi:10.5301/ijao.5000625
- Hampton, T. (2018). Platelets' Role in Adaptive Immunity May Contribute to Sepsis and Shock. *JAMA*, 319(13), 1311-1312. doi:10.1001/jama.2017.12859

- Hanschen, M., Tajima, G., O'Leary, F., Ikeda, K., & Lederer, J. A. (2011). Injury induces early activation of T-cell receptor signaling pathways in CD4+ regulatory T cells. *Shock*, 35(3), 252-257. doi:10.1097/SHK.0b013e3181f489c5
- Harker, L. A., Roskos, L. K., Marzec, U. M., Carter, R. A., Cherry, J. K., Sundell, B., Cheung, E. N., Terry, D., & Sheridan, W. (2000). Effects of megakaryocyte growth and development factor on platelet production, platelet life span, and platelet function in healthy human volunteers. *Blood*, 95(8), 2514-2522. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753829>
- Hartert, H. (1948). Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klinische Wochenschrift*, 26, 577-583.
- Hefele, F., Ditsch, A., Krysiak, N., Caldwell, C. C., Biberthaler, P., van Griensven, M., Huber-Wagner, S., & Hanschen, M. (2019). Trauma Induces Interleukin-17A Expression on Th17 Cells and CD4+ Regulatory T Cells as Well as Platelet Dysfunction. *Front Immunol*, 10, 2389. doi:10.3389/fimmu.2019.02389
- Herold, G. (2017). *Innere Medizin*.
- Heuer, J. G., Zhang, T., Zhao, J., Ding, C., Cramer, M., Justen, K. L., Vonderfecht, S. L., & Na, S. (2005). Adoptive transfer of in vitro-stimulated CD4+CD25+ regulatory T cells increases bacterial clearance and improves survival in polymicrobial sepsis. *J Immunol*, 174(11), 7141-7146. doi:10.4049/jimmunol.174.11.7141
- Hildebrand, F., Pape, H. C., & Krettek, C. (2005). [The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction]. *Unfallchirurg*, 108(10), 793-794, 796-803. doi:10.1007/s00113-005-1005-1
- Hoepli, R. E., Wu, D., Cook, L., & Levings, M. K. (2015). The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome. *Front Immunol*, 6, 61. doi:10.3389/fimmu.2015.00061
- Hoover, L., Bochicchio, G. V., Napolitano, L. M., Joshi, M., Bochicchio, K., Meyer, W., & Scalea, T. M. (2006). Systemic inflammatory response syndrome and nosocomial infection in trauma. *J Trauma*, 61(2), 310-316; discussion 316-317. doi:10.1097/01.ta.0000229052.75460.c2
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609), 1057-1061. doi:10.1126/science.1079490
- Hotchkiss, R. S., Monneret, G., & Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 13(12), 862-874. doi:10.1038/nri3552
- Howard, M., Muchamuel, T., Andrade, S., & Menon, S. (1993). Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med*, 177(4), 1205-1208. doi:10.1084/jem.177.4.1205
- Itoh, H., Cicala, C., Douglas, G. J., & Page, C. P. (1996). Platelet accumulation induced by bacterial endotoxin in rats. *Thromb Res*, 83(6), 405-419. doi:10.1016/0049-3848(96)00151-x
- Jacobsen, F. W., Dubois, C. M., Rusten, L. S., Veiby, O. P., & Jacobsen, S. E. (1995). Inhibition of stem cell factor-induced proliferation of primitive murine hematopoietic progenitor cells signaled through the 75-kilodalton tumor necrosis factor receptor. Regulation of c-kit and p53 expression. *J Immunol*, 154(8), 3732-3741.
- Jacoby, R. C., Owings, J. T., Holmes, J., Battistella, F. D., Gosselin, R. C., & Paglieroni, T. G. (2001). Platelet activation and function after trauma. *J Trauma*, 51(4), 639-647. doi:10.1097/00005373-200110000-00003

- Jain, N. C. (1975). A scanning electron microscopic study of platelets of certain animal species. *Thromb Diath Haemorrh*, 33(3), 501-507. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1154309>
- Jenne, C. N., Urrutia, R., & Kubes, P. (2013). Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol*, 35(3), 254-261. doi:10.1111/ijlh.12084
- Jin, W., & Dong, C. (2013). IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect*, 2(9), e60. doi:10.1038/emi.2013.58
- Jones, C. I., Barrett, N. E., Moraes, L. A., Gibbins, J. M., & Jackson, D. E. (2012). Endogenous inhibitory mechanisms and the regulation of platelet function. *Methods Mol Biol*, 788, 341-366. doi:10.1007/978-1-61779-307-3_23
- Katz, J. N., Kolappa, K. P., & Becker, R. C. (2011). Beyond thrombosis: the versatile platelet in critical illness. *Chest*, 139(3), 658-668. doi:10.1378/chest.10-1971
- Kaushansky, K. (2005). The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest*, 115(12), 3339-3347. doi:10.1172/JCI26674
- Keel, M., & Trentz, O. (2005). Pathophysiology of polytrauma. *Injury*, 36(6), 691-709. doi:10.1016/j.injury.2004.12.037
- Kerrigan, S. W., & Cox, D. (2010). Platelet-bacterial interactions. *Cell Mol Life Sci*, 67(4), 513-523. doi:10.1007/s00018-009-0207-z
- Klinger, M. H., & Jelkmann, W. (2002). Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res*, 22(9), 913-922. doi:10.1089/10799900260286623
- Kohm, A. P., Williams, J. S., & Miller, S. D. (2004). Cutting edge: ligation of the glucocorticoid-induced TNF receptor enhances autoreactive CD4+ T cell activation and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 172(8), 4686-4690. doi:10.4049/jimmunol.172.8.4686
- Kurec, A. (2014). Flow cytometry: principles and practices. *MLO Med Lab Obs*, 46(5), 28, 30-21. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24902379>
- Kutcher, M. E., Redick, B. J., McCreery, R. C., Crane, I. M., Greenberg, M. D., Cachola, L. M., Nelson, M. F., & Cohen, M. J. (2012). Characterization of platelet dysfunction after trauma. *J Trauma Acute Care Surg*, 73(1), 13-19. doi:10.1097/TA.0b013e318256deab
- Lang, T., & von Depka, M. (2006). [Possibilities and limitations of thrombelastometry/-graphy]. *Hamostaseologie*, 26(3 Suppl 1), S20-29. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16953288>
- Lansink, K. W., Gunning, A. C., & Leenen, L. P. (2013). Cause of death and time of death distribution of trauma patients in a Level I trauma centre in the Netherlands. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 39(4), 375-383. doi:10.1007/s00068-013-0278-2
- Lathrop, S. K., Santacruz, N. A., Pham, D., Luo, J., & Hsieh, C. S. (2008). Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population. *J Exp Med*, 205(13), 3105-3117. doi:10.1084/jem.20081359
- Lenz, A., Franklin, G. A., & Cheadle, W. G. (2007). Systemic inflammation after trauma. *Injury*, 38(12), 1336-1345. doi:10.1016/j.injury.2007.10.003
- Letourneau, S., Krieg, C., Pantaleo, G., & Boyman, O. (2009). IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol*, 123(4), 758-762. doi:10.1016/j.jaci.2009.02.011
- Levi, M., van der Poll, T., & Buller, H. R. (2004). Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*, 109(22), 2698-2704. doi:10.1161/01.CIR.0000131660.51520.9A

- Levrat, A., Gros, A., Rugeri, L., Inaba, K., Floccard, B., Negrier, C., & David, J. S. (2008). Evaluation of rotation thrombelastography for the diagnosis of hyperfibrinolysis in trauma patients. *Br J Anaesth*, *100*(6), 792-797. doi:10.1093/bja/aen083
- Leytin, V., Shakoor, S., Mody, M., Allen, D., Garvey, B., & Freedman, J. (2002). Sepsis- and endotoxemia-generated cytokines do not trigger activation of human platelets. *Crit Care Med*, *30*(12), 2771-2773. doi:10.1097/00003246-200212000-00025
- Lievens, D., Zernecke, A., Seijkens, T., Soehnlein, O., Beckers, L., Munnix, I. C., Wijnands, E., Goossens, P., van Kruchten, R., Thevissen, L., Boon, L., Flavell, R. A., Noelle, R. J., Gerdes, N., Biessen, E. A., Daemen, M. J., Heemskerk, J. W., Weber, C., & Lutgens, E. (2010). Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood*, *116*(20), 4317-4327. doi:10.1182/blood-2010-01-261206
- Liu, C. Y., Battaglia, M., Lee, S. H., Sun, Q. H., Aster, R. H., & Visentin, G. P. (2005). Platelet factor 4 differentially modulates CD4+CD25+ (regulatory) versus CD4+CD25- (nonregulatory) T cells. *J Immunol*, *174*(5), 2680-2686. doi:10.4049/jimmunol.174.5.2680
- Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, D. M., Ziegler, S. F., & Bluestone, J. A. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*, *203*(7), 1701-1711. doi:10.1084/jem.20060772
- Lundahl, T. H., Petersson, J., Fagerberg, I. H., Berg, S., & Lindahl, T. L. (1998). Impaired platelet function correlates with multi-organ dysfunction. A study of patients with sepsis. *Platelets*, *9*(3-4), 223-225. doi:10.1080/09537109876735
- MacKenzie, E. J. (2000). Epidemiology of injuries: current trends and future challenges. *Epidemiol Rev*, *22*(1), 112-119. doi:10.1093/oxfordjournals.epirev.a018006
- MacLeod, J. B., Lynn, M., McKenney, M. G., Cohn, S. M., & Murtha, M. (2003). Early coagulopathy predicts mortality in trauma. *J Trauma*, *55*(1), 39-44. doi:10.1097/01.TA.0000075338.21177.EF
- MacNeil, I. A., Suda, T., Moore, K. W., Mosmann, T. R., & Zlotnik, A. (1990). IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *J Immunol*, *145*(12), 4167-4173. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2124236>
- Maegele, M., Lefering, R., Yucel, N., Tjardes, T., Rixen, D., Paffrath, T., Simanski, C., Neugebauer, E., Bouillon, B., & Society, A. G. P. o. t. G. T. (2007). Early coagulopathy in multiple injury: an analysis from the German Trauma Registry on 8724 patients. *Injury*, *38*(3), 298-304. doi:10.1016/j.injury.2006.10.003
- Marcus, A. J., Broekman, M. J., Drosopoulos, J. H., Olson, K. E., Islam, N., Pinsky, D. J., & Levi, R. (2005). Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Semin Thromb Hemost*, *31*(2), 234-246. doi:10.1055/s-2005-869528
- Martin, P., Gomez, M., Lamana, A., Matesanz Marin, A., Cortes, J. R., Ramirez-Huesca, M., Barreiro, O., Lopez-Romero, P., Gutierrez-Vazquez, C., de la Fuente, H., Cruz-Adalia, A., & Sanchez-Madrid, F. (2010). The leukocyte activation antigen CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, *126*(2), 355-365, 365 e351-353. doi:10.1016/j.jaci.2010.05.010
- Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X. O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N. P., Overwijk, W. W., & Dong, C. (2009). T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*, *31*(5), 787-798. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.014

- Marzio, R., Mael, J., & Betz-Corradin, S. (1999). CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, *21*(3), 565-582. doi:10.3109/08923979909007126
- Meislin, H., Criss, E. A., Judkins, D., Berger, R., Conroy, C., Parks, B., Spaite, D. W., & Valenzuela, T. D. (1997). Fatal trauma: the modal distribution of time to death is a function of patient demographics and regional resources. *J Trauma*, *43*(3), 433-440. doi:10.1097/00005373-199709000-00008
- Mestas, J., & Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, *172*(5), 2731-2738. doi:10.4049/jimmunol.172.5.2731
- Midura, E. F., Kuethe, J. W., Rice, T. C., Veile, R., England, L. G., Friend, L. A., Caldwell, C. C., & Goodman, M. D. (2016). Impact of Platelets and Platelet-Derived Microparticles on Hypercoagulability Following Burn Injury. *Shock*, *45*(1), 82-87. doi:10.1097/SHK.0000000000000460
- Moore, F. A., Sauaia, A., Moore, E. E., Haenel, J. B., Burch, J. M., & Lezotte, D. C. (1996). Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J Trauma*, *40*(4), 501-510; discussion 510-502. doi:10.1097/00005373-199604000-00001
- Movat, H. Z., Weiser, W. J., Glynn, M. F., & Mustard, J. F. (1965). Platelet phagocytosis and aggregation. *J Cell Biol*, *27*(3), 531-543. doi:10.1083/jcb.27.3.531
- Murphy, T. J., Ni Choileain, N., Zang, Y., Mannick, J. A., & Lederer, J. A. (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells control innate immune reactivity after injury. *J Immunol*, *174*(5), 2957-2963. doi:10.4049/jimmunol.174.5.2957
- Neunaber, C., Zeckey, C., Andruszkow, H., Frink, M., Mommsen, P., Krettek, C., & Hildebrand, F. (2011). Immunomodulation in polytrauma and polymicrobial sepsis - where do we stand? *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, *5*(1), 17-25. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21158733>
- Ng, M. S. Y., Tung, J. P., & Fraser, J. F. (2018). Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now? *Transfus Med Rev*. doi:10.1016/j.tmr.2018.04.001
- Ni Choileain, N., MacConmara, M., Zang, Y., Murphy, T. J., Mannick, J. A., & Lederer, J. A. (2006). Enhanced regulatory T cell activity is an element of the host response to injury. *J Immunol*, *176*(1), 225-236. doi:10.4049/jimmunol.176.1.225
- Noack, M., & Miossec, P. (2014). Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev*, *13*(6), 668-677. doi:10.1016/j.autrev.2013.12.004
- Nocentini, G., Giunchi, L., Ronchetti, S., Krausz, L. T., Bartoli, A., Moraca, R., Migliorati, G., & Riccardi, C. (1997). A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(12), 6216-6221. doi:10.1073/pnas.94.12.6216
- Oberholzer, A., Oberholzer, C., & Moldawer, L. L. (2002). Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med*, *30*(1 Supp), S58-S63. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839946>
- Osterud, B., & Flaegstad, T. (1983). Increased tissue thromboplastin activity in monocytes of patients with meningococcal infection: related to an unfavourable prognosis. *Thromb Haemost*, *49*(1), 5-7. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6845273>
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, *327*(6122), 524-526. doi:10.1038/327524a0

- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., & Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 6(11), 1133-1141. doi:10.1038/ni1261
- Paulus, J. M. (1975). Platelet size in man. *Blood*, 46(3), 321-336. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1097000>
- Probst, C., Zelle, B. A., Sittaro, N. A., Lohse, R., Krettek, C., & Pape, H. C. (2009). Late death after multiple severe trauma: when does it occur and what are the causes? *J Trauma*, 66(4), 1212-1217. doi:10.1097/TA.0b013e318197b97c
- Risso, A., Smilovich, D., Capra, M. C., Baldissarro, I., Yan, G., Bargellesi, A., & Cosulich, M. E. (1991). CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. *J Immunol*, 146(12), 4105-4114. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710239>
- Roederer, M. (2001). Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry*, 45(3), 194-205. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11746088>
- Ronchetti, S., Zollo, O., Bruscoli, S., Agostini, M., Bianchini, R., Nocentini, G., Ayroldi, E., & Riccardi, C. (2004). GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol*, 34(3), 613-622. doi:10.1002/eji.200324804
- Rugeri, L., Levrat, A., David, J. S., Delecroix, E., Floccard, B., Gros, A., Allaouchiche, B., & Negrier, C. (2007). Diagnosis of early coagulation abnormalities in trauma patients by rotation thrombelastography. *J Thromb Haemost*, 5(2), 289-295. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02319.x
- Russwurm, S., Vickers, J., Meier-Hellmann, A., Spangenberg, P., Bredle, D., Reinhart, K., & Losche, W. (2002). Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock*, 17(4), 263-268. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11954824>
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155(3), 1151-1164. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636184>
- Sancho, D., Gomez, M., & Sanchez-Madrid, F. (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol*, 26(3), 136-140. doi:10.1016/j.it.2004.12.006
- Sancho, D., Gomez, M., Viedma, F., Esplugues, E., Gordon-Alonso, M., Garcia-Lopez, M. A., de la Fuente, H., Martinez, A. C., Lauzurica, P., & Sanchez-Madrid, F. (2003). CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis. *J Clin Invest*, 112(6), 872-882. doi:10.1172/JCI19112
- Santee, S. M., & Owen-Schaub, L. B. (1996). Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. *J Biol Chem*, 271(35), 21151-21159. doi:10.1074/jbc.271.35.21151
- Schmidt, R. F., Lang, Florian, Heckmann, Manfred. (2011). *Physiologie des Menschen* (Vol. 31): Springer Medizin Verlag.

- Schochl, H., Frietsch, T., Pavelka, M., & Jambor, C. (2009). Hyperfibrinolysis after major trauma: differential diagnosis of lysis patterns and prognostic value of thrombelastometry. *J Trauma*, *67*(1), 125-131. doi:10.1097/TA.0b013e31818b2483
- Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M., & van der Poll, T. (2008). Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*, *83*(3), 536-545. doi:10.1189/jlb.0607373
- Schreiber, M. A., Differding, J., Thorborg, P., Mayberry, J. C., & Mullins, R. J. (2005). Hypercoagulability is most prevalent early after injury and in female patients. *J Trauma*, *58*(3), 475-480; discussion 480-471. doi:10.1097/01.ta.0000153938.77777.26
- Schubert, L. A., Jeffery, E., Zhang, Y., Ramsdell, F., & Ziegler, S. F. (2001). Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem*, *276*(40), 37672-37679. doi:10.1074/jbc.M104521200
- Scumpia, P. O., Delano, M. J., Kelly, K. M., O'Malley, K. A., Efron, P. A., McAuliffe, P. F., Brusko, T., Ungaro, R., Barker, T., Wynn, J. L., Atkinson, M. A., Reeves, W. H., Salzler, M. J., & Moldawer, L. L. (2006). Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. *J Immunol*, *177*(11), 7943-7949. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7943
- Selby, R., Geerts, W., Ofosu, F. A., Craven, S., Dewar, L., Phillips, A., & Szalai, J. P. (2009). Hypercoagulability after trauma: hemostatic changes and relationship to venous thromboembolism. *Thromb Res*, *124*(3), 281-287. doi:10.1016/j.thromres.2008.10.002
- Semple, J. W., Italiano, J. E., Jr., & Freedman, J. (2011). Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*, *11*(4), 264-274. doi:10.1038/nri2956
- Serrano Hernandez, A. (2009). [Helper (TH1, TH2, TH17) and regulatory cells (Treg, TH3, NKT) in rheumatoid arthritis]. *Reumatol Clin*, *5 Suppl 1*, 1-5. doi:10.1016/j.reuma.2008.11.012
- Shapiro, H. M. (2003). *Practical flow cytometry* (Vol. 4): Wiley-Liss.
- Shevach, E. M., & Stephens, G. L. (2006). The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat Rev Immunol*, *6*(8), 613-618. doi:10.1038/nri1867
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., & Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*, *3*(2), 135-142. doi:10.1038/ni759
- Shiow, L. R., Rosen, D. B., Brdickova, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L. L., Cyster, J. G., & Matloubian, M. (2006). CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*, *440*(7083), 540-544. doi:10.1038/nature04606
- Sobrinho, J., & Shafi, S. (2013). Timing and causes of death after injuries. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, *26*(2), 120-123. doi:10.1080/08998280.2013.11928934
- Sollazzo, D., Trabanelli, S., Curti, A., Vianelli, N., Lemoli, R. M., & Catani, L. (2011). Circulating CD4+CD161+CD196+ Th17 cells are not increased in immune thrombocytopenia. *Haematologica*, *96*(4), 632-634. doi:10.3324/haematol.2010.038638
- Solomon, C., Traintinger, S., Ziegler, B., Hanke, A., Rahe-Meyer, N., Voelckel, W., & Schochl, H. (2011). Platelet function following trauma. A multiple electrode aggregometry study. *Thromb Haemost*, *106*(2), 322-330. doi:10.1160/TH11-03-0175
- Steinhauser, M. L., Hogaboam, C. M., Kunkel, S. L., Lukacs, N. W., Strieter, R. M., & Standiford, T. J. (1999). IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol*, *162*(1), 392-399. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886412>

- Stoecklein, V. M., Osuka, A., & Lederer, J. A. (2012). Trauma equals danger--damage control by the immune system. *J Leukoc Biol*, *92*(3), 539-551. doi:10.1189/jlb.0212072
- Stokes, K. Y., & Granger, D. N. (2012). Platelets: a critical link between inflammation and microvascular dysfunction. *J Physiol*, *590*(5), 1023-1034. doi:10.1113/jphysiol.2011.225417
- Tartaglia, L. A., Goeddel, D. V., Reynolds, C., Figari, I. S., Weber, R. F., Fendly, B. M., & Palladino, M. A., Jr. (1993). Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol*, *151*(9), 4637-4641. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8409424>
- Tartaglia, L. A., Weber, R. F., Figari, I. S., Reynolds, C., Palladino, M. A., Jr., & Goeddel, D. V. (1991). The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(20), 9292-9296. doi:10.1073/pnas.88.20.9292
- Taylor, P. A., Panoskaltis-Mortari, A., Swedin, J. M., Lucas, P. J., Gress, R. E., Levine, B. L., June, C. H., Serody, J. S., & Blazar, B. R. (2004). L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood*, *104*(12), 3804-3812. doi:10.1182/blood-2004-05-1850
- Testi, R., D'Ambrosio, D., De Maria, R., & Santoni, A. (1994). The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today*, *15*(10), 479-483. doi:10.1016/0167-5699(94)90193-7
- Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M. B., Dinarello, C. A., & Mier, J. W. (1994). Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*, *83*(1), 113-118. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8274730>
- TraumaRegister DGU®. Abgerufen auf <http://www.traumaregister-dgu.de/index.php?id=142>
- Triplett, T. A., Curti, B. D., Bonafede, P. R., Miller, W. L., Walker, E. B., & Weinberg, A. D. (2012). Defining a functionally distinct subset of human memory CD4+ T cells that are CD25POS and FOXP3NEG. *Eur J Immunol*, *42*(7), 1893-1905. doi:10.1002/eji.201242444
- Trunkey, D. D. (1983). Trauma. *Scientific American*, *249*(2), 28-35. Abgerufen auf <http://www.jstor.org/stable/24968962>
- Trunkey, D. D. (1983). Trauma. Accidental and intentional injuries account for more years of life lost in the U.S. than cancer and heart disease. Among the prescribed remedies are improved preventive efforts, speedier surgery and further research. *Sci Am*, *249*(2), 28-35. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6623052>
- Valencia, X., Stephens, G., Goldbach-Mansky, R., Wilson, M., Shevach, E. M., & Lipsky, P. E. (2006). TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood*, *108*(1), 253-261. doi:10.1182/blood-2005-11-4567
- van Griensven, M., Krettek, C., & Pape, H.-C. (2003). Immune reactions after trauma. *European Journal of Trauma*, *29*(4), 181-192.
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Vercammen, D., Van de Craen, M., Grooten, J., Loetscher, H., Brockhaus, M., Lesslauer, W., & Fiers, W. (1992). Functional characterization of the human tumor necrosis factor receptor p75 in a transfected rat/mouse T cell hybridoma. *J Exp Med*, *176*(4), 1015-1024. doi:10.1084/jem.176.4.1015
- Veigas, P. V., Callum, J., Rizoli, S., Nascimento, B., & da Luz, L. T. (2016). A systematic review on the rotational thrombelastometry (ROTEM(R)) values for the diagnosis of coagulopathy, prediction and guidance of blood transfusion and prediction of mortality in trauma patients. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, *24*(1), 114. doi:10.1186/s13049-016-0308-2

- Venet, F., Chung, C. S., Monneret, G., Huang, X., Horner, B., Garber, M., & Ayala, A. (2008). Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol*, *83*(3), 523-535. doi:10.1189/jlb.0607371
- Venturi, G. M., Conway, R. M., Steeber, D. A., & Tedder, T. F. (2007). CD25+CD4+ regulatory T cell migration requires L-selectin expression: L-selectin transcriptional regulation balances constitutive receptor turnover. *J Immunol*, *178*(1), 291-300. doi:10.4049/jimmunol.178.1.291
- Vieira-de-Abreu, A., Campbell, R. A., Weyrich, A. S., & Zimmerman, G. A. (2012). Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol*, *34*(1), 5-30. doi:10.1007/s00281-011-0286-4
- Vincent, J. L., Yagushi, A., & Pradier, O. (2002). Platelet function in sepsis. *Crit Care Med*, *30*(5 Suppl), S313-317. doi:10.1097/00003246-200205001-00022
- Walker, L. S., Chodos, A., Eggena, M., Dooms, H., & Abbas, A. K. (2003). Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med*, *198*(2), 249-258. doi:10.1084/jem.20030315
- Walsh, D. S., Siritongtaworn, P., Pattanapanyasat, K., Thavichaigarn, P., Kongcharoen, P., Jiarakul, N., Tongtawe, P., Yongvanitchit, K., Komoltri, C., Dheeradhada, C., Pearce, F. C., Wiesmann, W. P., & Webster, H. K. (2000). Lymphocyte activation after non-thermal trauma. *Br J Surg*, *87*(2), 223-230. doi:10.1046/j.1365-2168.2000.01341.x
- Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2007). Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature*, *445*(7129), 766-770. doi:10.1038/nature05479
- Ward, N. S., Casserly, B., & Ayala, A. (2008). The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med*, *29*(4), 617-625, viii. doi:10.1016/j.ccm.2008.06.010
- Wedepohl, S., Beceren-Braun, F., Riese, S., Buscher, K., Enders, S., Bernhard, G., Kilian, K., Blanchard, V., Dervedde, J., & Tauber, R. (2012). L-selectin--a dynamic regulator of leukocyte migration. *Eur J Cell Biol*, *91*(4), 257-264. doi:10.1016/j.ejcb.2011.02.007
- Weyrich, A. S., & Zimmerman, G. A. (2004). Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol*, *25*(9), 489-495. doi:10.1016/j.it.2004.07.003
- WHO. (2014). *Injuries and Violence: The facts 2014*. Abgerufen auf https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/149798/9789241508018_eng.pdf?sequence=1
- Wick, M., Ekkernkamp, A., & Muhr, G. (1997). [The epidemiology of multiple trauma]. *Chirurg*, *68*(11), 1053-1058. Abgerufen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9518193>
- Wilson, D., Cooke, E. A., McNally, M. A., Wilson, H. K., Yeates, A., & Mollan, R. A. B. (2001). Changes in coagulability as measured by thrombelastography following surgery for proximal femoral fracture. *Injury*, *32*(10), 765-770. doi:10.1016/S0020-1383(01)00139-5
- Wisnoski, N., Chung, C. S., Chen, Y., Huang, X., & Ayala, A. (2007). The contribution of CD4+ CD25+ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis. *Shock*, *27*(3), 251-257. doi:10.1097/01.shk.0000239780.33398.e4
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X. F., & Achong, M. K. (1998). IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*, *101*(2), 311-320. doi:10.1172/JCI1368
- Yaguchi, A., Lobo, F. L., Vincent, J. L., & Pradier, O. (2004). Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost*, *2*(12), 2096-2102. doi:10.1111/j.1538-7836.2004.01009.x

- Zhang, H., Kong, H., Zeng, X., Guo, L., Sun, X., & He, S. (2014). Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *J Transl Med*, *12*, 125. doi:10.1186/1479-5876-12-125
- Zhao, D. M., Thornton, A. M., DiPaolo, R. J., & Shevach, E. M. (2006). Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*, *107*(10), 3925-3932. doi:10.1182/blood-2005-11-4502
- Zhu, L., Huang, Z., Stalesen, R., Hansson, G. K., & Li, N. (2014). Platelets provoke distinct dynamics of immune responses by differentially regulating CD4⁺ T-cell proliferation. *J Thromb Haemost*, *12*(7), 1156-1165. doi:10.1111/jth.12612
- Ziegler, S. F., Ramsdell, F., & Alderson, M. R. (1994). The activation antigen CD69. *Stem Cells*, *12*(5), 456-465. doi:10.1002/stem.5530120502