

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Anästhesiologie

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Kochs)

**Auswirkungen der hyperbaren Sauerstofftherapie
auf die humanen Lymphozytensubpopulationen**

Ralph Detlef Pildner von Steinburg

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. M. Blobner
2. Univ.-Prof. Dr. E. Kochs

Die Dissertation wurde am 28.01.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.09.2014 angenommen.

Für meine liebe Eva
und unsere Jungs
Karl, Luis und Franz

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	7
1.1. Die Hyperbare Sauerstofftherapie (HBO)	7
1.1.1. Definition der HBO.....	7
1.1.2. Geschichtliche Entwicklung der HBO	7
1.1.3. Wirkungsmechanismen der HBO	9
1.1.3.1. Physikalische Grundlagen.....	9
Gesetz von Boyle und Mariotte	10
Gesetz von Dalton.....	11
Gesetz von Henry.....	11
1.1.3.2. Physiologische Grundlagen	11
1.1.3.3. Biochemische und zelluläre Grundlagen.....	13
1.1.4. Indikationen der HBO	14
1.1.4.1. Gasblasenerkrankungen	15
Dekompressionskrankheit	15
Luft- und Gasembolien	15
1.1.4.2. Kohlenmonoxidintoxikation	16
1.1.4.3. Gasbrand	17
1.1.4.4. Innenohrfunktionsstörungen (akuter Hörsturz und akutes Schalltrauma).....	17
1.1.5. Komplikationen der HBO	19
1.2. Das Immunsystem des Menschen	21
1.2.1. Prinzipien der angeborenen und erworbenen Immunität.....	21
1.2.2. CD-Nomenklatur.....	22
1.2.3. B-Lymphozyten.....	23
1.2.4. T-Lymphozyten.....	24
1.2.4.1. T-Helferzellen.....	24
1.2.4.2. Suppressor-/ zytotoxische T-Zellen.....	25
1.2.4.3. Aktivierungsmarker für T-Lymphozyten.....	25
1.2.5. Natürliche Killerzellen	26
2 ZIELSETZUNG	27

3	PROBANDEN, MATERIAL UND METHODEN.....	28
	3.1. Probanden.....	28
	3.2. Material.....	28
	3.2.1. Geräte	28
	3.2.2. Reagenzien	29
	3.2.3. Antikörper	29
	3.3. Methoden	30
	3.3.1. Durchführung der HBO	30
	3.3.2. Entnahme und Aufbereitung der Blutproben	31
	3.3.3. Färben und Fixieren der Zellen.....	32
	3.3.4. Durchflusszytometrie	34
	3.3.4.1. Allgemeines Funktionsprinzip	34
	3.3.4.2. Durchflusszytometrische Analyse	36
	3.3.4.3. Darstellung und Auswertung der Messergebnisse.....	36
	3.4. Statistische Auswertung.....	37
4	ERGEBNISSE.....	38
5	DISKUSSION	54
	5.1. Probandenkollektiv und Methoden.....	56
	5.2. Tierexperimentelle Studien.....	58
	5.3. Vergleichsstudien mit Menschen.....	60
	5.4. Eigene Ergebnisse	61
6	ZUSAMMENFASSUNG	65
7	LITERATURVERZEICHNIS	67
	DANKSAGUNG	77
	LEBENS LAUF	78

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Fläche
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ARDS	adult respiratory distress syndrom (Atemnotsyndrom des Erwachsenen)
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
C	Gasmenge
CD	cluster of differentiation
CO	Kohlenmonoxid
dl	Deziliter
ds	Doppelstrang
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECHM	European Conference on Hyperbaric Medicine
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
etc.	et cetera
EUBS	European Undersea and Baromedical Society
F	Gewichtskraft
Fa.	Firma
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenzmarker
FSC	forward light scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GTÜM e.V.	Deutsche Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin
Hb	Hämoglobin
HBO	Hyperbare Oxygenierung, hyperbare Sauerstofftherapie
HLA	human leucocyte antigen (humanes Leukozytenantigen)
HNO	Hals-Nasen-Ohren
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
k	Löslichkeitskoeffizient
K ₃	Trikaliumsalz
KPa	Kilopascal
m	Meter
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mW	Milliwatt
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCAM	neuronal cell adhesion molecule

NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
p	Druck
Pa	Pascal
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
p.o.	peroral
sek.	Sekunde
SSC	side light scatter (Seitwärtsstreulicht)
Th1 /-2	T-Helferzellen vom Typ 1 / - vom Typ 2
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
UHMS	Undersea and Hyperbaric Medical Society
UMS	Undersea Medical Society
V	Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1.1. Die Hyperbare Sauerstofftherapie (HBO)

1.1.1. Definition der HBO

Unter der hyperbaren Sauerstofftherapie (hyperbaren Oxygenierung = HBO) versteht man die Behandlung eines spontan atmenden oder beatmeten Patienten mit reinem Sauerstoff innerhalb einer Behandlungskammer bei Umgebungsdrücken über dem der Meereshöhe.

In der Regel werden Überdrücke von 1 bis 1,8 bar, entsprechend Gesamtdrücken von 2 bis 2,8 bar, angewendet. Die Behandlungsindikation legt die Druckhöhe fest. Die Anzahl und Dauer der einzelnen Sitzungen sowie die Zwischenintervalle werden ebenfalls durch die Behandlungsindikation bestimmt.

Die hyperbare Sauerstofftherapie ist heute eine nachgewiesenen erfolgreiche und etablierte Behandlungsmethode.

1.1.2. Geschichtliche Entwicklung der HBO

Die Verwendung von erhöhtem Umgebungsdruck zur Behandlung von Erkrankungen geht bis in das siebzehnte Jahrhundert zurück: Henshaw versuchte im Jahr 1662 verschiedene Krankheiten in einer mit Blasebälgen betriebenen Druckkammer zu behandeln (Henshaw, 1664). Nachdem es beim Bau der Brooklyn-Bridge 1873 in New York wiederholt zu Dekompressionsunfällen (Caisson-Krankheit) gekommen war, wurde die Idee der Überdruckbehandlung wieder aufgegriffen. Der französische Physiologe Paul Bert stellte fest, dass eingeatmete, verdichtete Luft im Blut in stärkerem Maße gelöst wird. Durch eine anschließende rasche Abnahme des Außendrucks geht der gelöste Stickstoff in einen gasförmigen Zustand über. Im Jahr 1875 konnte er beweisen, dass die bei der Dekompression entstehenden Gasbläschen aus Stickstoff bestehen. Somit forderte er den Einsatz von normobaren Sauerstoff zur Behandlung der Dekompressionskrankheit (Bert, 1878). Wenige Jahre später wurde bei Unfällen auf den Druckbaustellen des Hudson River-Tunnels zwischen New York und New Jersey unter Moir erstmals Überdruck in größerem Umfang bei Dekompressionsproblemen der Arbeiter angewendet. Durch langsames Dekomprimieren der Patienten in hyperbaren Behandlungseinheiten konnte eine deutliche Besserung der Symptome erzielt werden (Moir, 1896). Somit entstanden 1885 die ersten Dekompressionskammern in Amerika.

Der gezielte klinische Gebrauch von Sauerstoff unter hyperbaren Bedingungen begann Mitte des 20. Jahrhunderts. Churchill-Davidson und Mitarbeiter versuchten 1955 den Effekt ihrer Strahlentherapie bei Karzinompatienten durch hohe Sauerstoffpartialdrücke zu vergrößern (Churchill-Davidson et al., 1955). Ein Jahr später gelang es Prof. Boerema von der Universität Amsterdam die für den Herzstillstand zur Verfügung stehende Zeit bei Operationen am offenem Herzen durch hyperbaren Sauerstoff in einer Überdruckkammer zu verlängern (Boerema et al., 1956). Vier Jahre später konnte seine Arbeitsgruppe nachweisen, dass Leben ohne Erythrozyten durch Atmung von reinem Sauerstoff unter Überdruckbedingungen möglich ist. Darüber hinaus konnten sie tierexperimentell nachweisen, dass lebenswichtige Organfunktionen unter hyperbaren Sauerstoffbedingungen auch ohne Blut aufrechterhalten werden können (Boerema et al., 1960). Da der Einsatz von Herz-Lungen-Maschinen bis dahin nur in unzureichendem Maße möglich war, entstanden in den folgenden Jahren weitere Zentren mit Überdruckkammern. Zunächst war angestrebt, sie vor allem im Bereich der Herz- und Gefäßchirurgie einzusetzen (Kindwall, 1994). Brummelkamp und Boerema berichteten 1961 über den Einsatz von hyperbarer Oxygenierung bei der Behandlung von Gasbrandinfektionen (Brummelkamp et al., 1961). Im darauf folgenden Jahr wurde erstmals der Nutzen der HBO bei der Behandlung einer Kohlemonoxidvergiftung von Sharp und Smith in Glasgow beschrieben (Smith et al., 1962).

Mit Einführung der Herz-Lungen-Maschine und suffizienter Bypassstechniken in die tägliche klinische Praxis nahm das Interesse der Kardiochirurgie an der hyperbaren Sauerstofftherapie ab und andere Indikationen gewannen zunehmend an Bedeutung. In den siebziger Jahren wurde eine Vielzahl von Erkrankungen, weniger auf wissenschaftlicher als auf spekulativer Basis, mit hyperbarer Oxygenierung behandelt (Kindwall, 1994). Auf Grund dieser Entwicklung wurde 1976 in Bethesda / USA ein interdisziplinärer Fachausschuss für HBO, die Undersea Medical Society (UMS), gegründet. Als führende Fachgesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin legte die UMS Richtlinien für die Indikationen der hyperbaren Sauerstofftherapie fest (Undersea Medical Society, 1977). Die Liste der Indikationen wird seither durch das Komitee der UMS, heute die Undersea and Hyperbaric Medical Society (UHMS), alle drei Jahre überarbeitet (Undersea and Hyperbaric Medical Society, 1992).

In Deutschland wurden die ersten ernstzunehmenden Anwendungen nach Installation einer Druckkammer im Schiffsfahrtsmedizinischen Institut in Kiel-Kronshagen 1961 durchgeführt. Dort führte man vier Jahre später die erste erfolgreiche hyperbare Sauerstofftherapie nach dem Boerema-Schema bei Verdacht auf Gasgangrän der unteren Extremität durch. Zunächst stieg die Anzahl der Mehrpersonenkammern kontinuierlich an. Durch Todesfälle aufgrund menschlichen Versagens und unzulänglicher Technik kam es Mitte der siebziger Jahre zu einem empfindlichen Rückschlag. In der Folge wurde 1983 die Deutsche Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin (GTÜM e.V.) gegründet. Ziel der GTÜM war und ist es, tauchmedizinische Informationen zu sammeln, Studien zu sichten und anzuregen, daraus gesicherte Erkenntnisse abzuleiten und in Form von Empfehlungen zu veröffentlichen (Welslau et al., 1997). Dies geschieht in enger Kooperation mit anderen nationalen und internationalen Fachgesellschaften. Die Zahl der Überdruckeinheiten stieg in Deutschland erst ab 1989 wieder an. Da die HBO durch neue fundierte physiologische und klinische Erkenntnisse in verschiedenen medizinischen Bereichen anerkannt ist, sind derzeit ca. 25 Druckkammern in Betrieb. Dennoch hat die hyperbare Sauerstofftherapie bei uns, verglichen mit dem europäischen Ausland, einen geringeren Stellenwert. In Italien zum Beispiel, ist die HBO ein fakultativer Bestandteil der Weiterbildung zum Anästhesisten.

1.1.3. Wirkungsmechanismen der HBO

Die Wirkungen der hyperbaren Oxygenierung auf den menschlichen Organismus lassen sich auf physikalische, physiologische und biochemische Grundprinzipien zurückführen. Sie sind durch umfangreiche Studien hinreichend belegt.

1.1.3.1. Physikalische Grundlagen

Die hyperbare Sauerstofftherapie verwendet als physikalisches Hilfsmittel einen erhöhten Umgebungsdruck. Dieser wirkt bei einigen wenigen Indikationen, wie zum Beispiel der Dekompressionskrankheit oder der Gasembolie, auch als eigenständige therapeutische Komponente.

Druck (p) wird definiert als eine Gewichtskraft (F), die auf einer Fläche (A) lastet:

$$p = F / A.$$

Das internationale System der Einheiten (SI) gibt als Maßeinheit für den Druck Pascal (Pa) an. In der Praxis sind weitere Einheiten im Gebrauch, wie zum Beispiel bar oder mmHg (1 bar = 100 kPa, 1 mmHg = 133 kPa) (Tipler, 1994).

Die wichtigsten Auswirkungen des erhöhten Umgebungsdrucks lassen sich mit drei physikalischen Gesetzen beschreiben:

Gesetz von Boyle und Mariotte

Bei der Applikation von Überdruck kommt es zur mechanischen Kompression gasgefüllter flexibler Hohlräume. Bei gleichbleibender Temperatur ist dabei das Produkt aus Druck (p) und Volumen (V) konstant:

$$p \times V = \text{konst.}$$

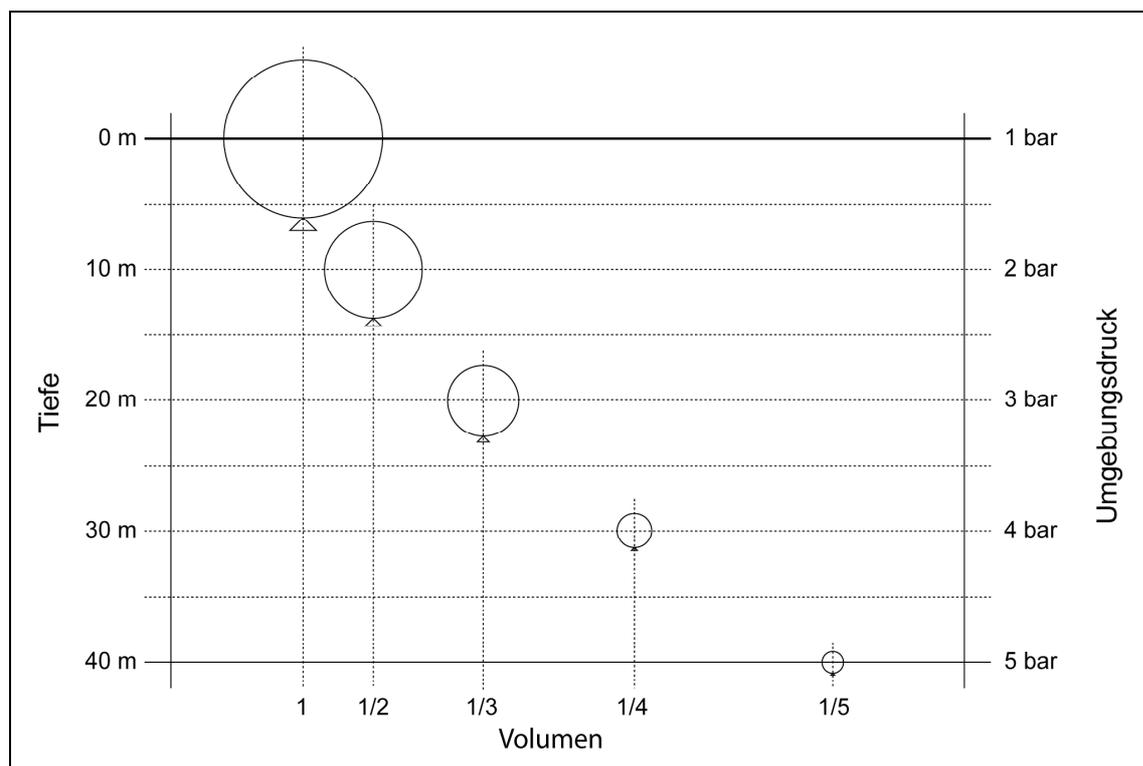


Abb.1: Veränderung der Größe einer Luftblase in Abhängigkeit von Druck bzw. Tauchtiefe in Wasser entsprechend dem Gesetz von Boyle und Mariotte (nach Jaeger et al., 2002).

Das Gasvolumen verhält sich umgekehrt proportional zum Druck. Das bedeutet, bei Erhöhung des Drucks verringert sich das Gasvolumen und bei Abnahme des Umgebungsdrucks nimmt das Volumen zu. Hiervon betroffen sind sowohl

anatomisch vorgegebene Hohlräume als auch Gasblasen im Gewebe oder Gefäßsystem (Scheid, 1994; Oriani et al., 1996).

Gesetz von Dalton

Der Gesamtdruck eines Gasgemisches setzt sich aus der Summe der Partialdrücke seiner Komponenten zusammen:

$$P_{\text{ges.}} = p_1 + p_2 + p_3 + \dots$$

Unter hyperbaren Bedingungen steigt der Sauerstoffpartialdruck (p_{O_2}) in der Inspirationsluft bereits bei Luftatmung proportional zur Gesamtdruckerhöhung. Bei Atmung von reinem Sauerstoff steigt der p_{O_2} entsprechend zur Gesamtdruckerhöhung an und entspricht in diesem Fall dem einwirkendem Umgebungsdruck (Scheid, 1994; Oriani G. et al., 1996).

Gesetz von Henry

Bei konstanter Temperatur ist die in einer Flüssigkeit gelöste Menge eines Gases (C) direkt abhängig vom Partialdruck des betreffenden Gases (p) und vom Löslichkeitskoeffizienten des Gases in der betreffenden Flüssigkeit (k):

$$C_x = k_x \times p_x$$

Das bedeutet, dass unter normalem Umgebungsdruck von jedem in der Atemluft vorhandenen Gas eine dem Gaspartialdruck entsprechende Menge im Blut sowie in den Körpergeweben gelöst vorhanden ist. Begibt sich ein Mensch in eine Wassertiefe, die einer Partialdruckverdoppelung entspricht, so verdoppelt sich auch die im Blut und in den Geweben gelöste Gasmenge (Flook, 1987).

1.1.3.2. Physiologische Grundlagen

Der Sauerstofftransport im Blut erfolgt unter Normalbedingungen überwiegend durch die chemische Bindung von Sauerstoff an das Hämoglobin der Erythrozyten. Die grundlegende Wirkung der HBO besteht in einer massiven Erhöhung der physikalisch gelösten Sauerstoffmenge im Blutplasma und konsekutiv auch in den Körpergeweben. Während der hämoglobingebundene Sauerstofftransport bei einer Sättigung von 98% unter Normalbedingungen nur geringfügig zu verbessern ist, kann die physikalisch im Plasma gelöste Sauerstoffmenge proportional zum Umgebungsdruck und dem Sauerstoffanteil im Atemgas gesteigert werden (Oriani et al. 1996).

Unter Normalbedingungen, d. h. bei Atmung von Luft (mit 21 % Sauerstoffanteil) und einem atmosphärischen Umgebungsdruck (= 760 mmHg), beträgt der arterielle Sauerstoffpartialdruck ungefähr 100 mmHg. Bei Atmung von 100 % Sauerstoff und einem atmosphärischen Umgebungsdruck kann der Sauerstoffpartialdruck in der Alveole maximal 713 mmHg betragen. Durch eine Erhöhung des Umgebungsdruckes lässt sich der Sauerstoffpartialdruck weiter steigern. So kann der Sauerstoffpartialdruck bei Atmung von 100% Sauerstoff und einem Umgebungsdruck von 3 bar, entsprechend etwa 20 Metern Meerwassertiefe, maximal 2233 mmHg betragen (Bock et al., 1994).

Entsprechend der Hüfner-Zahl bindet ein Gramm Hämoglobin unter Standardbedingungen *in vivo* maximal 1,34 ml Sauerstoff. Bei einem Hämoglobin von 15 g/dl beträgt folglich die gebundene Sauerstoffmenge 20 ml/dl Blut. Die unter diesen Bedingungen physikalisch im Plasma gelöste Sauerstoffmenge beträgt 0,3 ml/dl, errechnet aus dem Produkt aus Sauerstoffpartialdruck und Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff im Blut (0,003). Die Zunahme der physikalisch gelösten Sauerstoffmenge verhält sich linear zum Anstieg des alveolaren Sauerstoffpartialdrucks während der HBO.

Erhöht man den arteriellen Sauerstoffpartialdruck auf 2000 mmHg, entspricht die Menge von physikalisch gelöstem Sauerstoff 6 ml/dl Blut (Tibbles and Edelsberg, 1996). Dies entspricht der Menge Sauerstoff, welche der Körper üblicherweise verbraucht. Somit kann bei einer normalen Sauerstoffausschöpfung des Organismus der Sauerstoffbedarf ohne Hämoglobin aus der physikalisch gelösten Fraktion gedeckt werden (Tibbles and Edelsberg, 1996). Die Diffusionsstrecke für Sauerstoff im Kapillarbereich vergrößert sich von normalerweise 64 μm auf 247 μm (Krogh-Erlang-Modell) (Bosan and Walley, 2001). Dieser Effekt wird bei der hyperbaren Oxygenierung genutzt, um unter normobaren Bedingungen unzureichend oxygeniertes Gewebe ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen. Boerema stellte bereits 1960 tierexperimentell fest, dass in der hyperbaren Sauerstofftherapie der Gesamtbedarf des Organismus an Sauerstoff mit dem in Plasma gelösten Sauerstoff gedeckt werden kann. Somit ist bei normaler Sauerstoffausschöpfung des Körpers ein Leben ohne Erythrozyten in einer Druckkammer unter reiner Sauerstoffatmung möglich („life without blood“) (Boerema et al., 1960).

Der erhöhte arterielle Sauerstoffpartialdruck löst im Rahmen der metabolischen Autoregulation eine arterioläre Vasokonstriktion aus und bewirkt damit den Anstieg des präkapillären Widerstandes. Durch die daraus resultierende Abnahme des hydrostatischen Drucks nimmt der effektive kapilläre Filtrationsdruck ab und das Filtrations-/ Reabsorptionsverhältnis verschiebt sich zu Gunsten der Reabsorption. Hierdurch lässt sich der antiödematöse Effekt der HBO begründen (Nylander et al., 1985; Moon, 1994).

1.1.3.3. Biochemische und zelluläre Grundlagen

Erhöhte Sauerstoffpartialdrücke um 400 mmHg wirken auf einige Bakterien bakterizid, wie z. B. auf *Clostridium perfringens* beim Gasbrand (Mader, 1987). Darüber hinaus wird die Produktion des von diesen Erregern gebildeten α -Toxins durch die HBO gehemmt (Hill and Osterhout, 1972). Gegenüber anderen Keimen, wie z. B. *Escherichia coli*, Staphylokokken- und Pseudomonaden-Stämmen, wirkt der erhöhte Sauerstoffgehalt im Blut bakteriostatisch. Die Wirkung der hyperbaren Oxygenierung auf anaerobe Mikroorganismen erklärt sich durch die vermehrte Bildung von freien Sauerstoffradikalen und dem Fehlen radikalabbauender Enzyme wie der Superoxiddismutase, Katalase und Peroxidase (Mader et al., 1980; Park et al., 1991). Zusätzlich ist hyperbarer Sauerstoff in der Lage, die Wirkung von Antibiotika auf Mikroorganismen zu verstärken (Knighton et al., 1984).

Bei einer Gewebhypoxie mit Sauerstoffpartialdrücken unter 40 mmHg wird die Proliferation von Fibroblasten und der Aufbau einer Kollagenmatrix als Grundlage für die Angiogenese verhindert. Auch die meisten an der Wundheilung beteiligten Zelltypen benötigen ein Mindestmaß an Sauerstoff für die Aufrechterhaltung ihres Zellstoffwechsels, für die Proliferation sowie für die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Durch eine zeitweilige Anhebung des Gewebesauerstoffpartialdrucks auf Werte von über 50 mmHg wird die Zellteilung von Fibroblasten mit der sekundären Einsprossung von Kapillaren initiiert. Die Aminosäure Prolin wird nämlich sauerstoffabhängig im Kollagenmolekül hydroxiliert. Dieser Syntheseschritt wird als limitierend für die extrazelluläre Kollagenablage angesehen (Nemiroff, 1988; Nemiroff and Rybak, 1988). Sauerstoff ist darüber hinaus für die Quervernetzung und damit für die Endfestigkeit des Ersatzgewebes essentiell, da er als Substrat für die zuständige Lysin-Hydroxylase dient (Siddiqui et

al., 1996). Zudem ließ sich nachweisen, dass mit hyperbarem Sauerstoff eine dosisabhängige Stimulation der Fibroblastenproliferation möglich ist (Brismar et al., 1997). Tierexperimentell wurde eine raschere Einheilung von autogenen Knochentransplantaten beschrieben (Sawai et al., 1996).

Phagozytierende Leukozyten gehören zur wichtigen ersten Abwehrlinie gegen die Besiedelung und Invasion von Wunden mit Mikroorganismen. Die Fähigkeit zur Phagozytose ist dabei abhängig von einem Mindestsauerstoffpartialdruck. Die Leukozyten besitzen ein NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat)-gekoppeltes Oxygenase-Enzym, welches durch die Phagozytose aktiviert wird. Dieses Enzym ist bei der Produktion einer Reihe von bakteriziden Oxidantien und Sauerstoffradikalen, die zur Infektabwehr beitragen, erforderlich. Eine lokale Hypoxie kann somit die Leukozytenaktivität beeinträchtigen und die Infektanfälligkeit erhöhen (Mandell, 1974; Allen et al., 1997). Mader et al. zeigten, dass durch hyperbare Oxygenierung die Phagozytoseleistung von Leukozyten, die aus infiziertem Knochen kultiviert wurden, gesteigert werden konnte (Mader et al., 1980).

1.1.4. Indikationen der HBO

Basierend auf umfassenden physiologischen Erkenntnissen und klinischen Erfahrungen wurde eine Reihe von Indikationen zur hyperbaren Sauerstoffbehandlung festgelegt. Die Liste der Indikationen zur hyperbaren Oxygenierung ist international nicht einheitlich. Als allgemein anerkannt gilt im Besonderen die in dreijährigem Abstand von der UHMS aktualisierte Aufstellung. Darin aufgenommen werden Krankheitsbilder, bei denen die hyperbare Sauerstofftherapie einen nachgewiesenen therapeutischen Nutzen bringt oder sich auf eine gesicherte theoretische Grundlage stützt. Dabei werden von der UHMS als Evidenzkriterien neben nachgewiesenen physiologischen Grundlagen prospektive klinische Studien, tierexperimentelle Studien, *in vivo* oder *in vitro* Studien zur Effektivität und auch extensive klinische Erfahrungen renommierter hyperbarer Therapiezentren akzeptiert.

Zu den allgemein anerkannten Indikationen der hyperbaren Oxygenierung gehören die Dekompressionskrankheit, die schwere arterielle Gasembolie, die akute Kohlenmonoxidintoxikation und die clostridiale Myonekrose bzw. Gasbrand (Mielke et

al., 1996). Zusätzlich wurden von den medizinischen Fachgesellschaften, nämlich der UHMS in den USA, der European Conference on Hyperbaric Medicine (ECHM), der europäischen Fachgesellschaft (European Undersea & Baromedical Society = EUBS) sowie der Deutschen Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin (GTÜM e.V.) weitere Indikationen erarbeitet. Die ECHM und die GTÜM empfehlen die Durchführung einer hyperbaren Sauerstoffbehandlung unter anderem auch bei akuten hypoxischen cochleären Funktionsstörungen wie dem akuten Hörsturz und dem Schalltrauma (European Undersea Conference on Hyperbaric Medicine, 2004).

1.1.4.1. Gasblasenerkrankungen

Unter den Gasblasenerkrankungen werden die Dekompressionskrankheit sowie die Luft- und Gasembolie zusammengefasst.

Dekompressionskrankheit

Bei der Dekompressionskrankheit entstehen durch zu rasche Drucksenkung, z. B. beim Auftauchen im Rahmen von Tauchgängen, Mikrogasblasen im Blut und im Gewebe. Die Atemgase werden entsprechend ihrem Partialdruck und ihrem Löslichkeitskoeffizienten (Gesetz von Henry) physikalisch bis zur Sättigung im Blut und in den Geweben gelöst. Bei Druckminderung werden insbesondere Stickstoffmoleküle aus der physikalischen Lösung freigesetzt. So kommt es vor allem in Zellen mit hohem Lipidanteil zur Bildung von Inertgasbläschen. Die intrazellulären Bläschen führen direkt zum Zelluntergang. Durch die Destruktion von Fettgewebe kann es zu embolischen Ereignissen kommen. Die interstitielle Bläschenbildung führt zu einer Verschlechterung der nutritiven Versorgung des Gewebes. Die intravasale Bildung von Gasblasen kann Embolien und bei Verlegung der Endstrombahn ischämische Infarkte verursachen (Bühlmann, 1993).

Luft- und Gasembolien

Die Gasembolie ist die Verlegung der arteriellen Strombahn durch intravasale Gasblasen. Luft kann nach einem Barotrauma der Lunge in die pulmonale Strombahn oder iatrogen im Rahmen von Interventionen oder Eingriffen in das arterielle Gefäßsystem gelangen. Hierfür besteht bei herz-, gefäß-, thorax- und neurochirurgischen Eingriffen sowie bei Transplantationen innerer Organe ein erhöhtes Risiko.

Die HBO ist die einzige kausale Therapie bei Gasblasenerkrankungen. Durch die hyperbare Sauerstofftherapie wird eine Abnahme der Bläschengröße erzielt sowie eine Neubildung von Bläschen unterbunden. Die Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes führt zu einer besseren Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff bzw. der minderperfundierten Gefäßbezirke und zu einer Erhöhung des Diffusionsgradienten für Stickstoff. Der hohe Sauerstoffanteil löst eine Vasokonstriktion aus und führt damit zur Reduktion von Ödemen. Im Verlauf kommt es zur Rückbildung der Symptomatik. Häufig sind Wiederholungsbehandlungen bis zur vollständigen Beschwerdefreiheit erforderlich (Rivera, 1964; Peirce, 1980). Das Behandlungsschema richtet sich nach Symptomatik und Menge des embolisierten Gases (Kol et al., 1993).

1.1.4.2. Kohlenmonoxidintoxikation

Die akute Kohlenmonoxidvergiftung entsteht durch akzidentelle oder suizidale Inhalation im Rahmen von unvollständigen Verbrennungsvorgängen. Sie ist in Europa und Nordamerika die häufigste Vergiftungsursache. Inhaliertes Kohlenmonoxid verdrängt auf Grund seiner 200- bis 300fachen Affinität zu Hämoglobin den Sauerstoff aus seiner Bindung. Somit reduziert sich die Fähigkeit des Hämoglobins Sauerstoff zu transportieren. Daraus ergibt sich die Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobins und in der Folge eine progrediente zelluläre Hypoxie. Am sensibelsten reagieren ZNS und Myokard (Inagaki et al., 1997; Williams et al., 1992). Das Ausmaß des daraus resultierenden Schadens wird durch die Kohlenmonoxidkonzentration der Atemluft, die Expositionsdauer und die Intensität der Atmung bestimmt.

Die Wirkungsweise der HBO basiert auf sofortige Sicherstellung der Gewebsoxygenierung über den im Plasma gelösten Sauerstoff. Durch eine reduzierte Halbwertszeit des CO-Hb wird die Abgabe des Kohlenmonoxids aus dem Blut beschleunigt. Die Abbaugeschwindigkeit des Kohlenmonoxids steht in einem linearen Verhältnis zum Sauerstoffpartialdruck der zugeführten Atemluft. Somit wird die Halbwertszeit von CO von 320 Minuten bei Raumluft auf 23 Minuten bei 3 bar HBO reduziert (Meyers and Thom, 1994). Die Diffusionsgeschwindigkeit und die Diffusionsstrecke des Sauerstoffs nehmen zu. Die intrazelluläre Bindung von CO-Molekülen an die Cytochrom-C-Oxydase, die für den Sauerstofftransport innerhalb

der Zelle verantwortlich ist, wird antagonisiert. Darüber hinaus führt die HBO zu einer Vasokonstriktion und wirkt somit rückbildend auf ein begleitendes Hirnödem (Jiang and Tyssebotn, 1997).

1.1.4.3. Gasbrand

Gasbrand ist eine myonekrotische anaerobe Weichteilinfektion mit gasbildenden Clostridien, deren Exotoxine zu einer ausgedehnten Gewebeerstörung und zu einem septischen Multiorganversagen führen. Auf Grund des fulminanten Verlaufs mit einer Mortalität von 100% bei ausbleibender Therapie ist bereits bei vorliegendem Verdacht ein sofortiger Beginn der vielschichtigen Behandlung erforderlich.

Die hyperbare Oxygenierung wirkt auf die anaeroben Bakterien bakterizid. Die erhöhten Sauerstoffpartialdrücke im Gewebe hemmen zudem die Exotoxinproduktion. Dies ist insbesondere beim vom Clostridium perfringens gebildete α -Toxin, das für die systemische Manifestation verantwortlich ist, nachzuweisen (Van Unnik, 1965; Kaye, 1967; Demello und Hitchcock, 1973). Die hyperbare Sauerstofftherapie wird additiv zu einer frühen und aggressiven chirurgischen Wundversorgung, einer hochdosierten Antibiotikatherapie und einer intensivmedizinischen Betreuung eingesetzt. Sie führt bei rechtzeitiger Anwendung zu einer signifikanten Reduktion von Morbidität und Mortalität (Hart und Lamb, 1983). Bakker und Kox wiesen bei 409 Fällen von Gasbrandinfektionen nach, dass durch die frühe Anwendung der HBO, in Kombination mit Wundversorgung und Antibiotika, die Amputationsrate und die Mortalität signifikant gesenkt werden konnten (1988).

1.1.4.4. Innenohrfunktionsstörungen (akuter Hörsturz und akutes Schalltrauma)

Der Hörsturz ist eine ohne erkennbare Ursache plötzlich auftretende, meist einseitige Schallempfindungsstörung. Parallel können Ohrgeräusche, ein Druckgefühl im Ohr, Schwindel und Doppeltonhören (Diplakusis) auftreten. Als Ursache für einen Hörsturz kommt eine große Zahl pathogener Faktoren wie z.B. Durchblutungsstörungen, virale Infektionen, ein vaskulärer endolymphatischer Hydrops, medikamentöse Schädigungen, Stress, etc. in Frage (Morgenstern, 1994).

Unter einem akuten Schalltrauma versteht man die Schädigung des Hörorgans durch Schall. Je nach Lärmquelle und ihren Auswirkungen auf das Gehör unterscheidet

man zwischen Explosionstrauma, Knalltrauma und dem akuten Lärmschaden. Allen gemeinsam ist, dass eine kurzzeitige Lärm- und Druckbelastung das Hörorgan verletzt, indem unter anderem die Sinneszellen im Innenohr direkt geschädigt werden und begleitend Ohrgeräusche (Tinnitus) auftreten (Kellerhals, 1972).

Nach Beck reagieren die Stria vascularis und die Zellen des cortischen Organs auf die unterschiedlichen Noxen in immer gleicher Weise. Ein Ödem führt zum Verschluss der funktionellen Endgefäße und blockiert die Mikrozirkulation. Der daraus resultierende Sauerstoffmangel in der Hörschnecke führt zu einem Erliegen des Funktionsstoffwechsels, woraus letztlich der Hörverlust resultiert (Beck, 1984; Yamane et al., 1991). Histologisch werden Veränderungen der Mitochondrien und des Zytoskeletts, eine Ablösung der Haarzellen von der Tektorialmembran (Tonndorf, 1980) und / oder eine Schwellung sowie morphologische Strukturveränderung der Nervenfasern beobachtet (Pilgramm, 1984). Diese Vorgänge scheinen auch für die Entstehung des den Hörverlust begleitenden Tinnitus verantwortlich zu sein.

Die genannten Innenohrfunktionsstörungen beruhen in den meisten Fällen auf einer zu geringen Versorgung der Hörsinneszellen mit Sauerstoff (Lamm et al., 1995). Somit ergibt sich als primäres Behandlungsziel eine Verbesserung von Durchblutung und Stoffwechsel des Innenohres, um dadurch das Sauerstoffangebot für die Sinneszellen zu normalisieren. Klinisch bedeutet dies eine Wiederherstellung des Hörvermögens, eine Beseitigung der Ohrgeräusche, sowie eine Normalisierung der vestibulären Funktion, sofern gleichzeitig Schwindel vorhanden ist.

Die hyperbare Sauerstofftherapie wird dabei in der Regel nach erfolgloser Infusionsbehandlung eingesetzt. Dies Vorgehen entspricht den Vorgaben der Deutschen Gesellschaft für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie sowie den meisten prospektiven und retrospektiven Publikationen (AWMF und Deutsche Gesellschaft für HNO-Krankheit, 1996; Ganzer, 1998). Patienten, die mit konservativen Verfahren (z.B. Infusionstherapie mit Rheologika, Vasodilatativa Lidocain bzw. Glukokortikoide i.v./p.o.) erfolglos vorbehandelt wurden, profitieren in 80% bei Hörstörungen und in 85% bei Tinnitus von der hyperbaren Sauerstoffbehandlung, falls der Therapiebeginn bis zur sechsten Woche erfolgt. Bei einem späteren Therapiebeginn, jedoch noch vor Ablauf von drei Monaten, ist mit

einem Hörerfolg bei 38% der Patienten und mit einer Tinnitusreduktion in 51% zu rechnen. Bei Therapiebeginn mit HBO nach mehr als 3 Monaten kann nicht mit einem Hörgewinn gerechnet werden, der Tinnitus bessert sich jedoch noch bei einem Drittel der Patienten (Lamm et al., 1998).

1.1.5. Komplikationen der HBO

Bei der hyperbaren Sauerstofftherapie können Komplikationen sowohl durch den erhöhten Umgebungsdruck, als auch durch den erhöhten Sauerstoffgehalt im Blut auftreten. Schwerwiegende Komplikationen, wie folgenträchtige Barotraumata oder toxische Sauerstoffwirkungen, stellen im Routinebetrieb eine Rarität dar. In Studien mit großen Patientenkollektiven wurden keine Folgeschäden nachgewiesen. Zudem reduziert ein standardisiertes Voruntersuchungsprogramm das individuelle Risiko auftretender Nebenwirkungen (Plafki et al., 2000).

Im Rahmen des ansteigenden Umgebungsdruckes ist bis zum Erreichen des Behandlungsdruckes ein regelmäßiger Druckausgleich zur Belüftung des Mittelohres, z. B. durch Kau- oder Schluckbewegungen, erforderlich. Ansonsten kann ein schmerzhaftes Druckgefühl im Ohrbereich entstehen. Druckausgleichprobleme können insbesondere bei Erkältungen, Heuschnupfen oder behinderter Nasenatmung auftreten. Zur Behebung der Symptomatik kann die Behandlung abgebrochen und nach wenigen Tagen Pause fortgesetzt werden. Der Patientenanteil, der im Therapieverlauf Druckausgleichprobleme angibt, erscheint mit über 17% zunächst hoch. Da es sich dabei jedoch in den meisten Fällen um einmalige Ereignisse handelt, kommen diese bezogen auf die Überdruckexpositionen in nur 1,9% der Fälle vor (Plafki et al., 2000). Wird der Druckaufbau trotz auftretender Beschwerden fortgesetzt, kann es zum manifesten Barotrauma kommen. Das Barotrauma des Mittelohres ist mit 3,8% die häufigste Komplikation und reicht von Reizungserscheinungen des Trommelfells, Mittelohrerguss bis zur Trommelfellruptur.

Druckausgleichprobleme können auch im Bereich der Nasennebenhöhlen auftreten und äußern sich in ziehenden Schmerzen im Bereich der Stirn und des Oberkiefers. Sie sind in der Regel harmlos und mit abschwellenden Nasentropfen gut behandelbar.

Die aktuellen Hypothesen zu den Ursachen toxischer Sauerstoffeffekte beruhen im Wesentlichen auf den Wirkungen entstehender freier Sauerstoffradikale. Diese führen zur Zerstörung von Sulfhydrylbindungen in organischen Molekülen, zur Peroxidation von Lipiden in Zellmembranen und zur Blockierung der Synthese von Neurotransmittern wie GABA (Gamma-Aminobuttersäure), Dopamin, Decarboxylase oder Glutathiondecarboxylase (Wood, 1980; Mialon et al., 1995; Camporesi, 1996). Die üblichen HBO-Behandlungsprofile sind so angelegt, dass Sauerstoffunverträglichkeiten sehr selten vorkommen.

Zeichen der Sauerstofftoxizität auf das ZNS treten plötzlich und oft ohne jegliche Vorwarnung auf. Unwohlsein, Übelkeit, Kribbelparästhesien an Fingern und im Gesicht, Seh- und Hörstörungen können generalisierten Krampfanfällen vorausgehen, sind aber nicht obligatorisch (Kindwall, 1995). Die Krämpfe werden großen Studien zufolge mit einem Risiko von 1:10.000 bis 1:20.000 Behandlungen beobachtet. Nach Unterbrechung der 100%igen Sauerstoffatmung kommt es innerhalb von Minuten zu einem spontanen und vollständigen Sistieren der Symptome. Spätfolgen, wie Defizite der ZNS-Funktion oder EEG-Veränderungen, werden nach hyperoxischen Krampfanfällen nicht beobachtet (Welslau and Almeling, 1996).

Die Schädigung der Lunge tritt langsam und nach längerfristiger Exposition, d.h. nach mehrstündiger Einzelsitzung oder mehrwöchigen HBO-Wiederholungen, mit erhöhten Sauerstoffpartialdrücken auf. Eine tracheobronchiale Irritation mit Husten und brennende thorakale Schmerzen können Frühindikatoren einer Lungenschädigung sein. Darauf folgt ein Abfall der Vitalkapazität und der Compliance in der Lungenfunktion. Dies kann im Extremfall in ein akutes Lungenversagen (adult respiratory distress syndrom = ARDS) münden. Lungenkomplikationen wurden bisher nur als äußerst seltene Einzelfälle beschrieben. Bei Patienten mit deutlich eingeschränkter Lungenfunktion sollte die Therapie kritisch abgewogen werden (Marroni et al., 1996; Mueller et al., 1998).

Bei Patienten, die zu Klaustrophobie neigen, treten in der Druckkammer gelegentlich Beklemmungsgefühle auf. In manchen Fällen ist eine Problemlösung durch Kommunikation über die Gegensprechanlage, Einschleusung eines weiteren Helfers

oder Applikation eines leichten Beruhigungsmittels möglich. Daraus resultierende Therapieabbrüche finden sich etwa in gleicher Häufigkeit wie bei den Patienten mit Druckausgleichproblemen.

Die Auswirkungen der hyperbaren Sauerstofftherapie auf die Immunabwehr werden kontrovers diskutiert. Immunologische Nebenwirkungen im Sinne einer erhöhten Infektanfälligkeit oder Beeinflussung chronisch entzündlicher Erkrankungen sind bislang nicht nachgewiesen worden.

1.2. Das Immunsystem des Menschen

Die körpereigene Immunabwehr ist ein hochdifferenziertes System, das aus Organen, Zellen und Eiweißkörpern besteht und dem Organismus einen spezifischen Schutz gegen körperfremde Substanzen und Krankheitserreger bietet. Entscheidend dabei ist, dass das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen differenzieren kann, so dass normalerweise keine immunologische Reaktion gegen die eigenen gesunden Strukturen erfolgt. Diese Fähigkeit wird als immunologische Selbsttoleranz bezeichnet. Nur das komplexe Zusammenwirken der beteiligten Komponenten ermöglicht, dass Immunabwehr und Selbsttoleranz im Gleichgewicht bleiben. Falls dennoch gesunde körpereigene Strukturen vom Immunsystem angegriffen werden, können daraus Autoimmunerkrankungen resultieren. Andererseits kann eine zu große Toleranz, beispielsweise gegenüber krankhaften körpereigenen Zellen, ein Tumorwachstum nach sich ziehen (Staines et al., 1999).

1.2.1. Prinzipien der angeborenen und erworbenen Immunität

Das Immunsystem besteht aus einer angeborenen und einer erworbenen Immunabwehr. Die angeborene bzw. unspezifische Immunreaktion ist der erworbenen bzw. spezifischen Immunantwort vorgeschaltet. Die beiden Immunreaktionen agieren jedoch nicht unabhängig voneinander, sondern sind eng miteinander verzahnt (Kaufmann, 2008).

Das angeborene Immunsystem reagiert sehr schnell und dämmt die Erregerzahl ein. In der Regel ist es jedoch für eine vollständige Eliminierung des pathologischen Keims zu schwach. Parallel steuert es den Ablauf der erworbenen Immunität. Sehr

früh nach Infektion entscheidet sich, welcher Arm der erworbenen Immunität aktiviert wird. Die angeborene Immunität, als erste Abwehrlinie, wird von verschiedenen Zellen und Faktoren getragen. Zahlreiche Zellen und Faktoren des angeborenen Immunsystems werden von der erworbenen Immunität als Effektoren genutzt. Die wichtigsten Zellen der angeborenen Immunantwort sind Granulozyten, Phagozyten und natürliche Killerzellen. Zu den humoralen Trägern zählen das Komplementsystem und die Akutphaseproteine (Abbas et al., 1996; Fearon and Locksley, 1996).

Das entscheidende Merkmal der erworbenen Immunabwehr ist die vollständige Elimination des Erregers durch eine für das auslösende Antigen spezifische Immunantwort. Unterstützend kann dabei ihr immunologisches Gedächtnis wirken, indem ein bestimmter Mikroorganismus bei erneuter Begegnung wiedererkannt wird und dadurch die Reaktion schneller und effektiver abläuft. Wesentliche Bestandteile des spezifischen Abwehrsystems sind als zelluläre Faktoren die B- und T-Lymphozyten sowie die Antigenpräsentierenden Zellen (APZ). Die B-Zellen reifen im Knochenmark und vermitteln die humorale Immunabwehr. Sie erkennen Antigene und synthetisieren als Plasmazellen die dazu passenden spezifischen Antikörper. Die T-Zellen reifen im Thymus und werden aufgrund zweier Oberflächenstrukturen in CD4+ und CD8+ T-Zellen unterteilt. CD4+ Zellen, auch T-Helferzellen genannt, unterstützen Makrophagen und B-Zellen in ihrer Funktion. Die CD8+ Zellen bzw. Suppressor-/ zytotoxischen T-Zellen spielen bei der Bekämpfung virusinfizierter Zellen eine wichtige Rolle (Janeway et al., 1997; Georgi und Bierbach, 2007).

1.2.2. CD-Nomenklatur

Alle Zellen des Immunsystems stammen von pluripotenten CD34+ Stammzellen im Knochenmark ab. Sie können entsprechend ihrer Differenzierung in lymphatische und myelomonozytäre Zellreihen unterschieden werden. Aus der lymphatischen Zellreihe gehen T- und B-Zellen sowie eine dritte Population von Lymphozyten, die natürlichen Killerzellen, hervor. Monozyten, polymorphkernige Granulozyten, Mastzellen und vermutlich auch dendritische Zellen sind myelomonozytären Ursprungs (Janeway et al., 1997). Lymphatische und myelomonozytäre Zellen des Immunsystems können heute über Oberflächenantigene unterschieden werden. Einige dieser Membranstrukturen sind spezifisch für Zellen einer bestimmten Linie,

während die Expression anderer je nach Aktivierungs- oder Differenzierungsgrad wechselt. Nach einer internationalen Absprache mit einheitlicher Nomenklatur wird ein Oberflächenmolekül, das eine bestimmte Zelllinie oder ein Differenzierungsstadium mit bekannter Struktur aufweist und das mit einer bestimmten Gruppe (cluster) monoklonaler Antikörper reagiert, als Mitglied eines cluster of differentiation (CD) bezeichnet. Alle Oberflächenantigene der Leukozyten mit definierter Struktur erhalten daher eine CD-Bezeichnung. Die Oberflächenmoleküle lassen sich mit fluoreszierenden Antikörpern darstellen und durchflusszytometrisch analysieren. Durch diese Technik können die Zellen nach Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität unterschieden werden. Durch den Bestand einer Palette von charakteristischer Oberflächenmoleküle, können die unterschiedlichen Zellen des Immunsystems differenziert werden (Kaufmann, 2008).

1.2.3. B-Lymphozyten

Etwa 15% der Lymphozyten im peripheren Blut sind B-Zellen. Sie nutzen zur Antigenerkennung oberflächenständige Antikörper. Bei den benutzten Oberflächen-Immunglobulinen (Ig) handelt es sich um IgM- und IgD-Rezeptoren. Auf Antigenkontakt hin entstehen aus ruhenden B-Lymphozyten Plasmazellen, die spezifische Antikörper einer Klasse sezernieren (Rajewsky, 1996; McHeyzer-Williams et al., 2003). Die Immunglobulinklassen werden unterschieden in IgM, IgG, IgA, IgE und IgD. Makrophagen und Granulozyten tragen Rezeptoren für das Fc-Stück einiger IgG-Unterklassen (Fc γ R). Die Bindung dieser IgG an Mikroben unterstützt die Keimaufnahme und anschließende Abtötung durch diese Phagozyten. Dieser Vorgang wird als Opsonierung bezeichnet. Eosinophile und Mastzellen exprimieren einen Rezeptor für das Fc-Stück der IgE-Antikörper (Fc ϵ R). Durch das Beladen mit IgE werden Helminthen von diesen Effektorzellen erkannt und angegriffen (Yazdanbakhsh et al., 2002). Nicht opsonierende IgG-Subklassen wirken in erster Linie als neutralisierende Antikörper, d.h. sie neutralisieren die Toxizität mikrobieller Produkte oder interferieren mit der Anheftung von Erregern (Viren) an Wirtszellen. In den Schleimhäuten findet man hauptsächlich IgA-Antikörper, die dort wesentliche Abwehrfunktionen übernehmen, in dem sie die Erregeradhäsion an das Schleimhautepithel unterbinden (Fujihashi et al., 2005). Alle B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche das Antigen CD19. Monoklonale Antikörper gegen CD19 werden daher als B-Zell-Marker verwendet (Staines et al., 1999).

1.2.4. T-Lymphozyten

Normalerweise machen die T-Lymphozyten ca. 70% der zirkulierenden Gesamtlymphozyten aus. Vier wichtige Grundfunktionen werden von den T-Zellen bzw. den T-Zellsubpopulationen vermittelt. Die T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1) produzieren Zytokine, welche professionelle Phagozyten und zytolytische T-Zellen aktivieren. Die T-Helferzellen vom Typ 2 (Th2) produzieren Zytokine, welche humorale Abwehrmechanismen aktivieren. Die zytotoxischen T-Lymphozyten sind zytolytisch, d.h. sie zerstören die Wirtszelle durch direkten Zellkontakt. Regulatorische T-Zellen produzieren Zytokine, welche die Immunantwort unterdrücken (Ehlers und Hölscher, 2004).

T-Lymphozyten benutzen zur Antigenerkennung einen T-Zell-Rezeptor (TZR), der mit dem für die Signaltransduktion verantwortlichen CD3-Komplex assoziiert ist. Der TZR/CD3-Molekülkomplex stellt das charakteristische Merkmal aller T-Lymphozyten dar. T-Lymphozyten erkennen Erregerantigene nicht direkt, sondern sind für einen Komplex spezifisch, der aus einer körpereigenen Referenzstruktur plus Peptid des Erregers besteht. Als körpereigene Referenzstruktur dienen Produkte des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (major histocompatibility complex = MHC) (Krogsgaard and Davis, 2005). Für die Antigenpräsentation sind zwei MHC-Klassen verantwortlich, die MHC-Klasse II und die MHC-Klasse I. T-Lymphozyten exprimieren entweder das CD4- oder das CD8-Molekül. Erstgenanntes Molekül zeigt Spezifität für das MHC-Klasse-II-Molekül und zweitgenanntes für das MHC-Klasse-I-Molekül (Yewdell et al., 2003; Watts, 2004).

1.2.4.1. T-Helferzellen

Unter dem Begriff T-Helferzellen werden die T-Zellen zusammengefasst, die anderen Zellen des Immunsystems bei der Ausübung ihrer besonderen Funktion zu Hilfe kommen. Sie unterstützen die Fähigkeit von Makrophagen zur Antigenpräsentation, die Differenzierung von Vorläuferzellen in zytolytische T-Zellen und die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten in antikörperbildende Plasmazellen. Sie repräsentieren somit eine Lymphozytensubpopulation mit immunregulatorischen Aufgaben. Ihr charakteristisches Merkmal ist der CD4-Rezeptor, der zur Kontaktaufnahme und interzellulären Adhäsion mit antigenpräsentierenden Zellen

dient. Der CD4-Rezeptor bindet an Proteine des MHC Klasse II. Die MHC-Restriktion bedeutet, dass die T-Helferzellen nur von APZs aktiviert werden können, die den MHC der Klasse II tragen (Granucci et al., 2005; Kapsenberg, 2005). Als APZs dienen Makrophagen, B-Zellen und insbesondere auch dendritische Zellen. Da CD4+ Zellen sämtliche Reaktionen über die Sekretion von Zytokinen steuern, ist die Beschränkung auf eine Gruppe von APZs nötig, um ein Ausufern der Immunreaktion zu steuern. Hauptaufgabe der Th1 ist die Aktivierung der zellulären Immunität. Sie beeinflussen aber auch die humorale Immunität, und zwar insbesondere gegen Mikroorganismen, die durch Phagozyten abgetötet werden. Th2 stellen die wesentlichen Vermittler des erworbenen Schutzes gegen Helminthen dar. Die humorale Immunantwort gegen Toxine und Helminthen unterliegt fast ausschließlich der Kontrolle durch Th2 (Abbas et al., 1996; Romagni, 2005).

1.2.4.2. Suppressor-/ zytotoxische T-Zellen

Suppressor-/ zytolytische T-Zellen wirken regulierend auf die Immunantwort. Sie drosseln die Proliferation und Aktivität der T-Helferzellen und hemmen die Antikörperproduktion der Plasmazellen. Neben ihrer immunsupprimierenden Wirkung sind die MHC-I-restringierten CD8+ Zellen zur Zytolyse fähig. Die Suppressor-/ zytolytischen T-Lymphozyten enthalten zahlreiche Granula, in denen Perforine und Granulozyme gespeichert werden. Diese werden während der Erkennung der Zielzelle freigesetzt und führen aktiv zum Zelltod durch Nekrose. Zudem können die zytotoxischen T-Zellen über Oberflächenrezeptoren der Zielzelle ein intrazelluläres System von Proteasen und Nukleasen aktivieren, das zur DNA-Fragmentation und damit zum Tod der Zielzelle durch Apoptose führt. Da MHC-I-Moleküle auf fast allen Wirtszellen exprimiert werden, stellen CD8+ Zellen eine breit wirksame Abwehrwaffe dar. Da Viren die unterschiedlichsten Zielzellen befallen können, sind zytolytische T-Lymphozyten vom CD8-Phänotyp für die Virusabwehr prädestiniert (Nagata and Golstein, 1995; Podack, 2005).

1.2.4.3. Aktivierungsmarker für T-Lymphozyten

Die Proliferation ruhender reifer T-Zellen wird über die Interaktion des Antigen-MHC-Komplexes mit dem TZR eingeleitet, wodurch die Expression von Interleukin 2 (IL2) und dem IL2-Rezeptor auf der Zelloberfläche induziert wird. Über den IL2-Rezeptor wird das Ausmaß der T-Zell vermittelten Immunantwort reguliert. Die Expression des

Rezeptors wird durch Umweltantigene initial stimuliert. Die klonale Expansion der T-Zellen hängt von der Ausdehnung, dem Tempo und der Dauer der IL2-Rezeptor Expression ab (Smith, 1988). Es gibt verschiedene Zelloberflächenproteine auf T-Zellen, die IL2 binden. Eines davon ist IL2R α (= CD25), ein Polypeptid, das auf T-Zellaktivierung hin exprimiert wird. Das Ausmaß der Expression von CD25 dient als Maß für die T-Zellaktivierung (Taniguchi and Minami, 1993, Staines et al., 1999).

Als weiterer Aktivierungsmarker für T-Zellen dient HLA-DR. Menschliche T-Zellen exprimieren nach Aktivierung über bislang unbekannte Mechanismen HLA-Moleküle der Klasse II. Monozyten exprimieren auch in ruhendem Zustand HLA-DR. Ist die Expression des HLA-DR-Moleküls auf der Zelloberfläche der Monozyten vermindert, so geht dies *in vitro* mit einer reduzierten Reagibilität der Zellen gegen bakterielle Lipopolysaccharide einher. Bei erniedrigter HLA-DR-Expression besteht also eine erhöhte Infektionsgefahr. Eine Reduktion der HLA-DR-Expression findet sich unter anderem bei Sepsis, Polytrauma oder iatrogenen Immunsuppression (Sack et al., 2000).

1.2.5. Natürliche Killerzellen

Die dritte große Lymphozytengruppe sind die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Sie machen ca. 15% der Lymphozyten im peripheren Blut aus. Sie sind reich an Granula, in denen die typischen Moleküle zytolytischer Zellen gespeichert sind. Daher sind sie zur Zielzell-Lyse befähigt, wie zum Beispiel im Rahmen der Virusabwehr durch das Abtöten der virusinfizierten Wirtszelle (Kärre and Zerrahn, 2005). Des Weiteren tragen sie wesentlich zur Lyse von Tumorzellen sowie zur Transplantatabstoßung bei. Phänotypisch handelt es sich bei NK-Zellen um CD3 negative CD56+CD16+ Zellen. Sie tragen also keine für B- und T-Lymphozyten spezifische Oberflächenmoleküle. Die Mehrheit der reifen NK-Zellen exprimiert CD56, eine Isoform des neuralen Zelladhäsionsmolekül (NCAM), sowie CD16 (=Fc γ RIII), einen Rezeptor niedriger Affinität für die Fc-Fraktion von IgG. Dieser dient NK-Zellen zur Erkennung von antikörperbeladenen Zielzellen. NK-Zellen besitzen also die Fähigkeit der antikörperabhängigen und antikörperunabhängigen Zytotoxizität (Barao and Ascensao, 1998)

2 ZIELSETZUNG

Die hyperbare Sauerstofftherapie ist eine zwingend indizierte Behandlungsmethode bestimmter Erkrankungen, die, bei ihrem verzögerten Einsatz, einen fulminanten Verlauf bis hin zu einem letalen Ausgang nehmen können. Auch bei einigen weniger schwerwiegenden Krankheiten ist ein therapeutischer Effekt der hyperbaren Oxygenierung als additives Verfahren nachgewiesen worden.

Die Auswirkungen der hyperbaren Sauerstofftherapie auf den Organismus sind vielfach erforscht und die Wirkungszusammenhänge zu einem großen Teil erfasst worden. In Bezug auf den Einfluss der HBO auf die zelluläre Immunabwehr wurden zwar eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, eine Klärung konnte jedoch bislang nicht erzielt werden.

Das Ziel dieser Studie ist, quantitative und funktionelle Auswirkungen der hyperbaren Sauerstofftherapie auf die Lymphozytensubpopulationen im Blut immunologisch gesunder Probanden mittels Durchflusszytometrie zu analysieren.

3 PROBANDEN, MATERIAL UND METHODEN

3.1. Probanden

Die Untersuchung wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt. Die Probanden wurden gemäß den dort festgelegten Bestimmungen aufgeklärt und gaben ihr freiwilliges Einverständnis zur Teilnahme. Es wurden 31 Probanden im Alter von 30 bis 54 Jahren (Durchschnittsalter 42 Jahre), davon 11 Frauen und 20 Männer, in die Studie aufgenommen. Dabei handelte es sich um Patienten mit akutem Hörsturz oder Schalltrauma, die sich in der Druckkammer der Arbeitsgruppe Hyperbarmedizin der Technischen Universität München einer hyperbaren Sauerstofftherapie unterzogen.

Als Einschlusskriterien zur Aufnahme der Probanden in die Studie galten:

- Durchführung der HBO nach beschriebenem Therapieprotokoll
- Mindestalter von 18 Jahren
- Schriftliche Einwilligung

Als Ausschlusskriterien galten:

- Kontraindikationen gegen eine HBO-Therapie
- Vorliegen einer chronischen oder akuten Infektion bis zu vier Wochen vor Untersuchung
- Vorliegen einer Autoimmunerkrankung oder Immunschwäche
- Einnahme immunalternierender Medikamenten (Antibiotika, Steroide, etc.)

3.2. Material

3.2.1. Geräte

- Mehrpersonenkammer Haux-Medstar 2000, Fa. Haux-Life-Support, Karlsbad-Ittersbach.
- Durchflusszytometer FACS Scan mit CONSORT™ 30-Computersystem, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg
- Simultest IMK Plus-Software, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg
- Zentrifuge Rotina 48R, Fa. Hettich, Tuttlingen
- Vortexer, Fa. Janke & Kunkel, Staufen

- Hämatologieautomat F800, Fa. Sysmex, Norderstedt
- Pipette Reference (variabel), Eppendorf, Hamburg
- Blutabnahmeröhrchen VACUTAINER® K₃ EDTA (lila Verschlusskappe), Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg
- Einmal-Teströhrchen 12 x 75 mm aus Polystyrol mit Verschlusskappe, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg

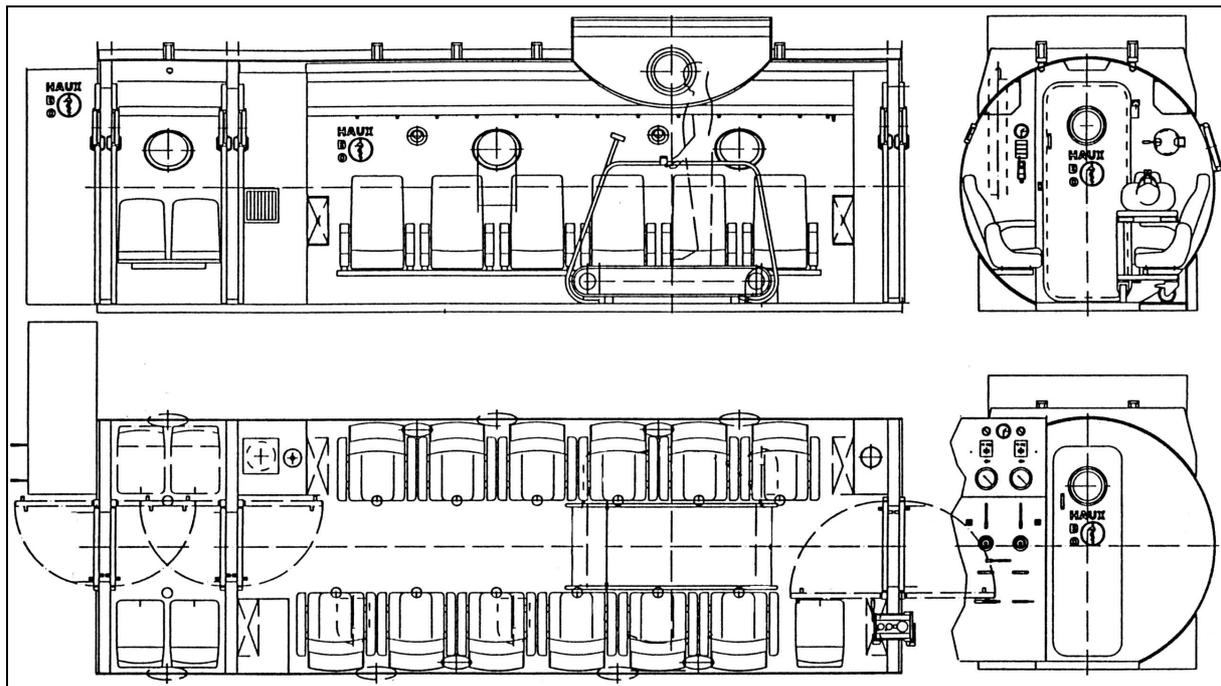


Abb. 2: Technische Zeichnung einer Mehrpersonenkammer (mit freundlicher Genehmigung der Fa. Haux-Life-Support, Karlsbad-Ittersbach)

3.2.2. Reagenzien

- FACS Lysing Solution 10fach-Konzentrat mit < 50% Diethylenglykol und < 15% Formaldehyd, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg
- Phosphatgepufferte Saline (PBS), pH 7,2, Fa. Biochrom, Berlin
- Phosphatgepufferte Saline (PBS) mit 0,1% Natriumazid, pH 7,2, Fa. Biochrom, Berlin
- Paraformaldehyd (1%) 1g in 100 ml PBS mit 0,1% Natriumazid gelöst, pH 7,4, Fa. Merck, Darmstadt

3.2.3. Antikörper

- CD3 FITC, Klon SK7, IgG_{1κ}, Becton-Dickinson

- CD4 FITC, Klon SK3, IgG_{1K}, Becton-Dickinson
- CD8 PE, Klon SK1, IgG_{1K}, Becton-Dickinson
- CD14 PE, Klon MΦP9, IgG_{2bK}, Becton-Dickinson
- CD16 PE, Klon B73.1, IgG_{1K}, Becton-Dickinson
- CD19 PE, Klon 4G7, IgG_{1K}, Becton-Dickinson
- CD 25 PE, Klon 2A3, IgG_{1K}, Becton-Dickinson
- CD45 FTIC, Klon 2D1, IgG_{1K}, Becton-Dickinson
- CD56 PE, Klon MY31, IgG_{1K}, Becton-Dickinson
- HLA-DR PE, Klon L243, IgG_{2aK}, Becton-Dickinson
- FITC, Klon X40, IgG₁, Becton-Dickinson
- PE, Klon X39, IgG_{2a}, Becton-Dickinson

3.3. Methoden

3.3.1. Durchführung der HBO

Als Voraussetzung für eine hyperbare Sauerstofftherapie wurde bei jedem Probanden eine Tauchtauglichkeitsuntersuchung, angelehnt an die berufsgenossenschaftliche Untersuchung G31 für Überdruck, durchgeführt. Diese beinhaltet eine umfassende Anamnese, die Erstellung eines Audiogramms sowie eine kardiale und pulmonale Untersuchung, inklusive einer Lungenfunktionsprüfung. Vor Beginn jeder Behandlung wurden die Probanden nach ihrem aktuellen Befinden und subjektiven Veränderungen des Hörvermögens befragt. Es wurde die Lungenfunktion mittels Flowspirometer kontrolliert und eine Otoskopie durchgeführt. Probanden mit einer akuten Erkältung und deshalb zu erwartenden Problemen beim Druckausgleich wurde zur Prophylaxe eines Mittelohrtraumas ein abschwellendes Nasenspray verabreicht. Probanden mit Beklemmungszuständen im Rahmen der Druckkammerbehandlung wurden mit einem niedrig dosierten Benzodiazepin leicht sediert. Die Therapie wurde in einer Mehrpersonenkammer in Anwesenheit einer entsprechend ausgebildeten Begleitperson durchgeführt. In der Druckkammer wurden die Probanden mittels EKG und Blutdruckmessung überwacht. Die Sauerstoffapplikation erfolgte über eine Gesichtsmaske, die über ein Schlauchsystem mit der Druckkammer verbunden war.

Die Probanden wurden über zehn Tage täglich einmal behandelt. Die

Behandlungsdauer betrug jeweils 110 Minuten und war in drei Phasen aufgeteilt. Die Probanden inhalierten währenddessen durchgehend 100%igen Sauerstoff über eine Atemmaske. Auf Unterbrechung durch Raumluftpausen wurde zu Gunsten eines konstant hohen Sauerstoffpartialdrucks und der damit verbundenen Behandlungseffizienz verzichtet. In der initialen Kompressionsphase wurde der Umgebungsdruck in der Kammer über 20 Minuten stetig gesteigert. Dabei mussten die Probanden auf einen regelmäßigen Druckausgleich im Mittelohr durch Schlucken oder Valsalvamanöver achten. Konnte kein adäquater Druckausgleich herbeigeführt werden, musste die Behandlung abgebrochen werden, um eine Schädigung des Mittelohrs zu verhindern. Bei anhaltenden Druckausgleichsproblemen bestand die Möglichkeit, ein Trommelfellröhrchen als Druckausgleichshilfe über den Zeitraum der HBO einzubringen. Mit Erreichen des avisierten Gesamtdruckes von 2,5 bar begann die Isopressionsphase. Der Druck blieb über 70 Minuten konstant. Abschließend folgte die Dekompressionsphase mit der kontinuierlichen Druckreduktion bis zum Erreichen des natürlichen Umgebungsdrucks von 1 bar über 20 Minuten. Im Anschluss fand eine Kontrolluntersuchung, bestehend aus Otoskopie und Tympanometrie statt.

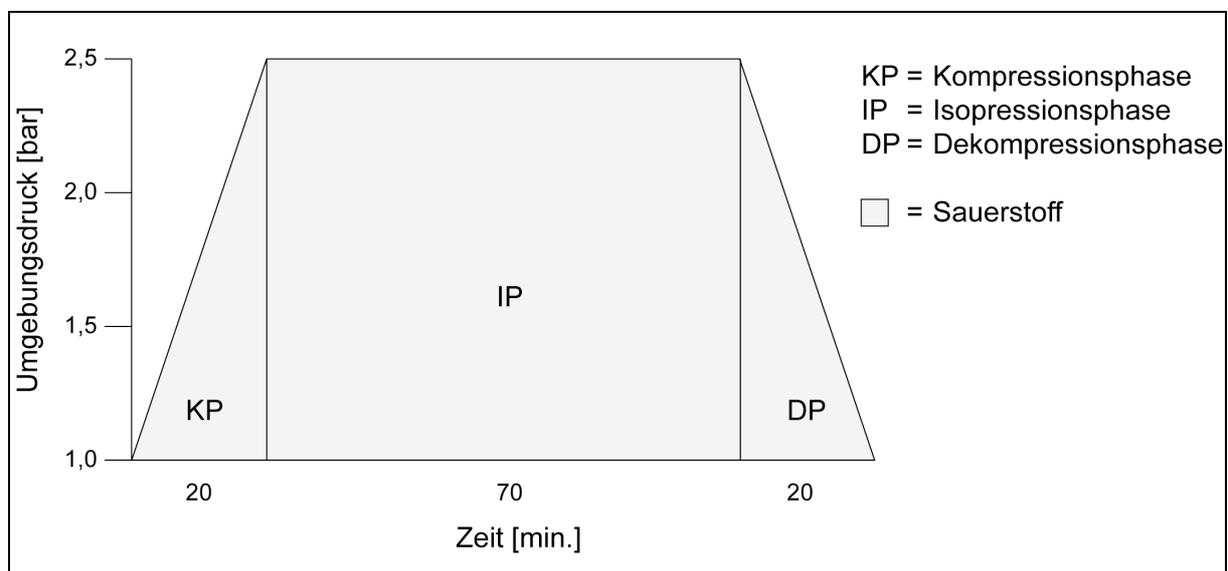


Abb. 3: Behandlungsschema

3.3.2. Entnahme und Aufbereitung der Blutproben

Unmittelbar vor der ersten und nach der zehnten HBO-Therapie wurde den Probanden mittels Punktion einer peripheren Vene 4,0 ml Vollblut in sterilen K₃ EDTA

VACUTAINER® Blutabnahmeröhrchen abgenommen und anschließend verarbeitet. Vor der Färbung wurde aus der Vollblutprobe die Leukozytenzahl sowie ein Differentialblutbild mittels eines Hämatologieautomats der Firma Sysmex bestimmt. Der zulässige Bereich für die Leukozytenkonzentration lag zwischen $3,5 \times 10^3$ und $9,8 \times 10^3$ Leukozyten/ μl . Proben mit einer Leukozytenzahl größer als $9,8 \times 10^3$ Leukozyten/ μl wurden mit einfach konzentrierter phosphatgepufferter Saline (PBS), die 0,1% Natriumazid enthielt, verdünnt.

3.3.3. Färben und Fixieren der Zellen

Zur Gewährleistung optimaler Ergebnisse wurden die Blutproben innerhalb von sechs Stunden nach der Entnahme gefärbt. Jeweils 20 μl der Antikörperkombinationen wurden in 12 x 75mm-Röhrchen pipettiert (Tab. 1).

Tabelle 1: Antikörperansätze

Probe	AK-Kombination	Fluoreszenz	Isotyp
A	Anti-CD45 Anti-CD14	FITC PE	IgG _{1k} IgG _{2bk1}
B		FITC PE	IgG ₁ IgG _{2a}
C	Anti-CD3 Anti-CD19	FITC PE	IgG _{1k} IgG _{1k}
D	Anti- CD4 Anti-CD8	FITC PE	IgG _{1k} IgG _{1k}
E	Anti-CD3 Anti-HLA-DR	FITC PE	IgG _{1k} IgG _{2ak}
F	Anti-CD3 Anti-CD16 + Anti-CD56	FITC PE	IgG _{1k} IgG _{1k}
G	Anti-CD3 Anti-CD 25	FITC PE	IgG _{1k} IgG _{1k}

Probe A wurde benötigt zur Bestimmung des Lymphozytenakquisitionsfensters und Probe B zum Setzen von Fluoreszenzmarkern um die negative Population und zum Nachweis von nicht-antigenspezifischer Antikörperbindung.

Anschließend wurden vorsichtig 100 µl der gut gemischten Vollblutprobe auf den Boden der Röhrchen pipettiert, bei niedriger Geschwindigkeit drei Sekunden lang gründlich auf dem Vortexmischer gemischt und 15 bis 30 Minuten bei Zimmertemperatur (20 bis 25°C) Licht geschützt inkubiert.

Es wurde 10fache FACS Lysing Solution mit Wasser von Reagenzgüte, das Zimmertemperatur hatte, im Verhältnis 1:10 auf eine einfache Lyselösung verdünnt. Jeweils 2 ml der einfachen Lyselösung wurde in jedes Röhrchen pipettiert und unmittelbar nach Zugabe bei niedriger Geschwindigkeit drei Sekunden lang auf dem Vortexmischer gemischt. Es folgte eine 10- bis maximal 12minütige Inkubation bei Zimmertemperatur im Dunkeln. Die Zellen durften nicht über einen längeren Zeitraum den Lysereagenzien ausgesetzt werden, da dies zu einer Zerstörung der Leukozyten hätte führen können.

Die Röhrchen wurden sofort nach der Inkubation bei 300 x g über fünf Minuten bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und ca. 50 µl Restflüssigkeit im Röhrchen zurückbehalten, um ein Aufwirbeln des Zellsediments zu vermeiden.

Zum Resuspendieren des Zellsediments in der Restflüssigkeit wurde erneut bei niedriger Geschwindigkeit gründlich auf dem Vortexmischer gemischt. Anschließend wurden in jedes Röhrchen 2 ml PBS mit 0,1% Natriumazid pipettiert, bei niedriger Geschwindigkeit drei Sekunden lang auf dem Vortexmischer gemischt und mit 200 x g über fünf Minuten bei Zimmertemperatur zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt und ca. 50 µl Restflüssigkeit im Röhrchen zurückbehalten. Um das Zellsediment in der Restflüssigkeit zu resuspendieren, wurde erneut bei niedriger Geschwindigkeit gründlich auf dem Vortexmischer gemischt. Anschließend wurden in jedes Röhrchen 0,5 ml 1% Paraformaldehyd pipettiert und bei niedriger Geschwindigkeit drei Sekunden lang gründlich auf dem Vortexmischer gemischt.

Nun konnten die Zellen im Durchflusszytometer analysiert werden. Die Röhrchen wurden mit einem Stopfen verschlossen und im Dunkeln bei 2 bis 8°C bis zur

Analyse im Durchflusszytometer gelagert. Die fixierten Zellen wurden innerhalb von 24 Stunden nach der Blutentnahme analysiert. Zur Reduktion von Zellaggregaten wurden die Zellen vor der Analyse im Durchflusszytometer gründlich auf dem Vortexmischer gemischt.

3.3.4. Durchflusszytometrie

3.3.4.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie mittels eines fluorescence-activated cell sorter (FACS) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand von Oberflächenantigenen zu unterscheiden und zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ein bestimmtes Oberflächenantigen markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzelnen nacheinander durch einen Laser geführt. Auf diese Weise lassen sich beispielsweise Lymphozytensubpopulationen einer Blutprobe in kurzer Zeit bestimmen (Kleine und Freund, 1996).

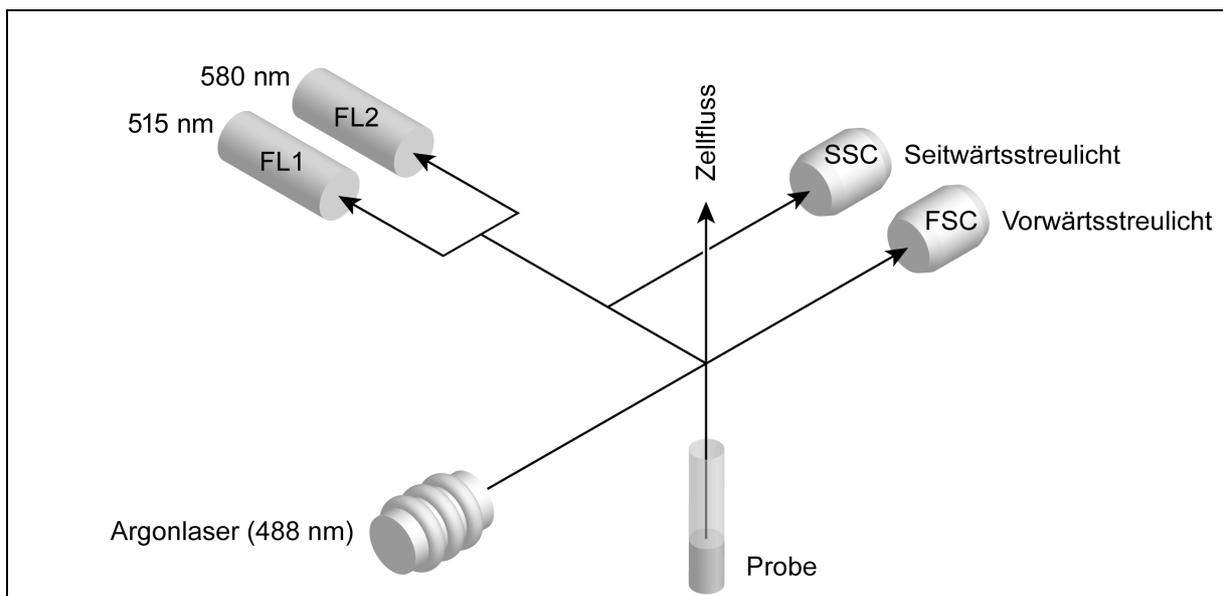


Abb. 4: Vereinfachtes Schema eines Durchflusszytometers (nach Rothe, 2007)

Das Durchflusszytometer besteht aus den drei Komponenten: Dem Flüssigkeitssystem, dem optischen System und der Signalverarbeitung (Abb. 4). Mittels Überdruck wird die zu untersuchende Zellsuspension durch eine Stahlkapillare in das Zentrum einer Messküvette transportiert, wo sie von einer Mantelflüssigkeit erfasst und beschleunigt wird. Dieser als hydrodynamische Fokussierung bezeichnete Vorgang gewährleistet, dass die Zellen einzeln

nacheinander den Analysepunkt passieren.

Als optische Signale werden die Fluoreszenz und die Lichtstreuung der Partikel gemessen (Loken and Lanier, 1984). Lichtquelle ist ein Argonlaser, dessen Emissionsspektrum im Absorptionsbereich verschiedener kommerziell erhältlicher Fluoreszenzfarbstoffe liegt. Zur Durchflusszytometrie verwendet man die Emissionslinie bei 488 nm und entsprechende Fluorochrome, die bei dieser Wellenlänge angeregt werden. Die absorbierte Lichtenergie hebt die Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Beim Rücksprung auf das Grundniveau kommt es zur Fluoreszenz, d.h. zur Emission eines Photons (Raffael et al., 1994).

Neben der Fluoreszenz wird als weiterer Parameter das Streulicht gemessen. Abhängig von verschiedenen physikalischen Zelleigenschaften wird das Licht, das auf die Zelle trifft, unterschiedlich stark gestreut. Das Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC) wird entlang der Achse des Laserstrahls in einem Winkelbereich von 0-10° gemessen und charakterisiert die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (side light scatter, SSC) wird rechtwinkelig zum Laserstrahl gemessen und korreliert mit dem Gehalt der Zellgranula in den Zellen. So lassen sich die wichtigsten Leukozytengruppen voneinander unterscheiden (Rothe, 2007).

Das emittierte Licht wird von einer Sammeloptik aufgefangen, von Filtern nach Wellenlängenbereichen aufgetrennt und zu unterschiedlichen Detektoren gelenkt. Hier werden die Lichtimpulse aufgefangen, optoelektrisch verstärkt und an die Datenverarbeitung weitergeleitet. Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überschneiden. Diese Überschneidung wird durch die einstellbare Farbkompensation am Durchflusszytometer korrigiert. Hierzu werden bei jedem Versuch Kontrollproben, die jeweils nur einen bindenden Antikörper gekoppelt an ein Fluorochrom enthalten, verwendet. Strahlt ein bestimmtes Fluorochrom in andere Kanäle hinein, kann dieser Anteil von dem jeweiligen Fluoreszenzsignal über einen elektrischen Mechanismus abgezogen werden (Stewart, 2000).

3.3.4.2. Durchflusszytometrische Analyse

Vorliegende Untersuchung erfolgte in einem Durchflusszytometer FACS Scan. Für die Anregung der Fluorochrome Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) wurde ein Argonlaser, Spectraphysics Ca. USA 300mW/ 488nm, verwendet. Die Emissionsspektren der Fluorochrome wurden bei 515nm (FITC) bzw. bei 580nm (PE) aufgenommen. Die Daten für geradliniges Streulicht, für gelbgrüne Fluoreszenz (FITC) und für orangerote Fluoreszenz (PE), wurden über einen Listmodus mit Hilfe der Simultest IMK Plus-Software in einem dem Durchflusszytometer angeschlossenen CONSORT™ 30-Computersystem gespeichert und ausgewertet. Durch die Software wurde automatisch die Erfassung von mindestens 2000 Lymphozyten innerhalb des Lymphozytenfensters gewährleistet.

Vor der Bestimmung der Oberflächenantigene wurde durch die Messung mit anti-CD45 FITC und anti-CD14 PE (Probe A) ein bestmögliches Lymphozytenfenster (Lymphozyten-Gate) ermittelt. Dabei wurden 98% oder mehr der normalen, reifen (nichtblastischen) Lymphozyten in der Probe erfasst und Zelltrümmer, Monozyten und Granulozyten weitgehend ausgegrenzt. Enthielt das Fenster jedoch 3% oder mehr Monozyten, wurde das Streulichtfenster mittels Software so begrenzt, dass mindestens 95% oder mehr in der Probe enthaltene Lymphozyten erfasst wurden.

Die Analyse der Fluoreszenzintensitätsmarker (Probe B) diente der Negativkontrolle. Die Software legte im vorher gesetzten Lymphozytenanalysefenster die Fluoreszenz-1- (FL1) und Fluoreszenz-2- (FL2) Marker fest. Diese Marker definierten die Grenzen zwischen negativen und positiven gefärbten Ereignissen. Zudem ließ sich dadurch eine zu hohe Anzahl an nicht-antigenspezifischen Antikörperbindungen demarkieren.

3.3.4.3. Darstellung und Auswertung der Messergebnisse

Messergebnisse für einzelne Parameter können in einem Histogramm mit Häufigkeit über Intensität abgebildet werden. Für die Darstellung von Parameterkombinationen, wie in der vorliegenden Arbeit, eignet sich das Punkthistogramm (dot plot). Aus diesen Diagrammen lassen sich Bereiche elektronisch auswählen (gating). Dadurch können die Eigenschaften einzelner Partikelmengen, wie z. B. der Lymphozytensubpopulationen, gezielt untersucht werden. Mit Hilfe der gängigen Software können statistische Aussagen, wie prozentuale Verteilung der

Populationen, mittlere Signalintensität, absolute und lokale Maxima der Fluoreszenz getroffen werden (Raffael et al., 1994).

Durch logarithmische Auftragung der Parameter Zellgröße (FSC) gegen Granularität (SSC) wurden die Leukozytenpopulationen in einer dot plot-Darstellung dargestellt. Unter Verwendung des Analysefensters und der Fluoreszenzmarker wurden die Daten der beschriebenen Antikörperkombinationen erfasst und analysiert (Tab. 1). Mittels der Software wurden die einzelnen Lymphozytensubpopulationen als prozentuale Lymphozytenanteile berechnet. Die absoluten Zellzahlen wurden anhand der Leukozytenzahl und den prozentualen Lymphozytenanteilen ermittelt. Dafür wurde vor der durchflusszytometrischen Untersuchung ein Differentialblutbild der jeweiligen Patientenvollblutprobe mit einem Hämatologieautomat erstellt und in den an das FACS Scan angeschlossenen Rechner eingegeben.

3.4. Statistische Auswertung

Die gemessenen Daten wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 4.0 von Windows der Firma Microsoft[®] mittels eines Computers der Firma Siemens übertragen. Die anschließende statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS[®] Version 16. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben, als verbundenem verteilungsfreien Test, ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde mit 5% ($p < 0,05$) festgelegt und durch Markierung mit * in den Graphiken angezeigt.

Die grafischen Darstellungen erfolgten über Boxplots, die den Median als durchgezogene Linie in der Box, die Quartile und die Extremwerte anzeigten. Die Box stellte den Interquartilbereich mit 50% der Werte dar. Die von der Box ausgehenden Linien führten bis zur 5. und 95. Perzentile. Die maximalen Werte wurden ober- und unterhalb der Linie jeweils als Einzelpunkte ausgegeben. Bei nachgewiesener Signifikanz erfolgte die zusätzliche Darstellung der Ergebnisse mittels Streudiagramm.

4 ERGEBNISSE

Bei 31 Probanden wurde vor der ersten und nach der zehnten hyperbaren Sauerstofftherapie venöses Blut aus einer peripheren Vene abgenommen und durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei erfolgte die Immunphänotypisierung der Lymphozyten mittels monoklonaler Antikörper gegen die entsprechenden Subpopulationen.

Die Geschlechterverteilung der 31 Probanden bestand in 11 Frauen und 20 Männern. Das durchschnittliche Alter lag bei 42 ± 12 Jahren (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es wurde untersucht, ob es nach Durchführung der hyperbaren Sauerstofftherapie zu einer Veränderung der Messgrößen kam.

Nach der zehntägigen Behandlung der Probanden stellte sich in der durchflusszytometrischen Analyse der Blutproben ein Abfall der Gesamtlymphozytenzahl heraus. Die absolute Zellzahl nahm signifikant ab, ohne dass sich der prozentuale Anteil an den Leukozyten signifikant änderte (Abb. 5, 6, 7).

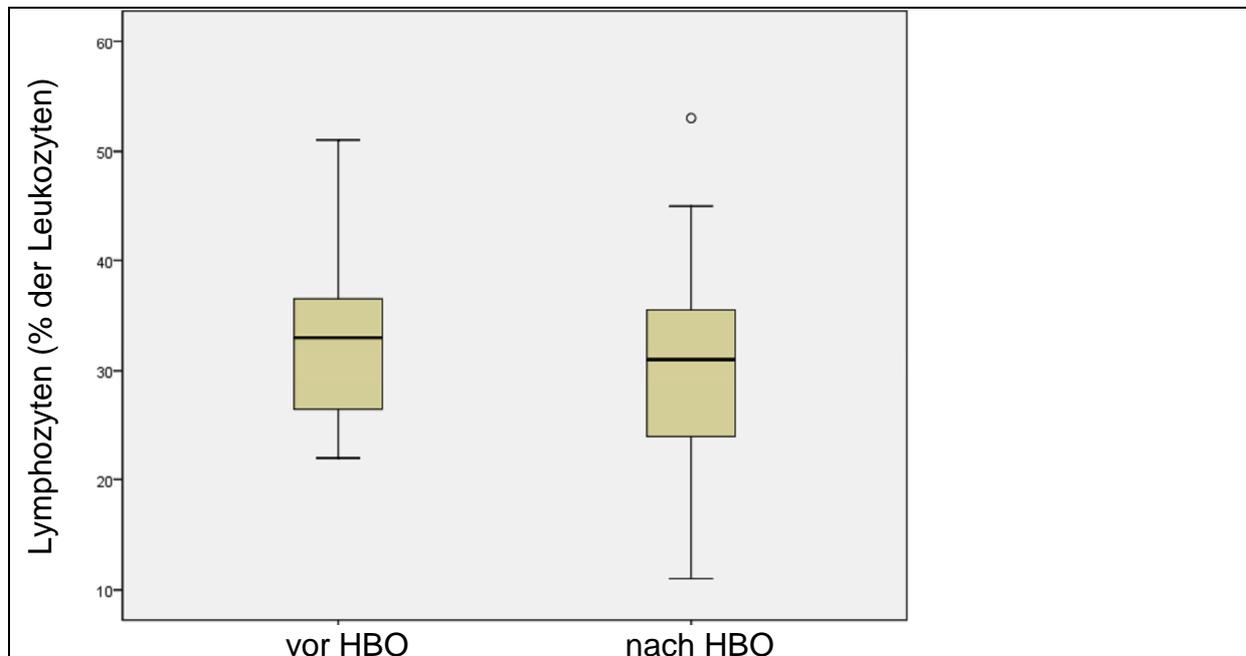


Abb. 5: Anteil der Gesamtlymphozyten an den Leukozyten

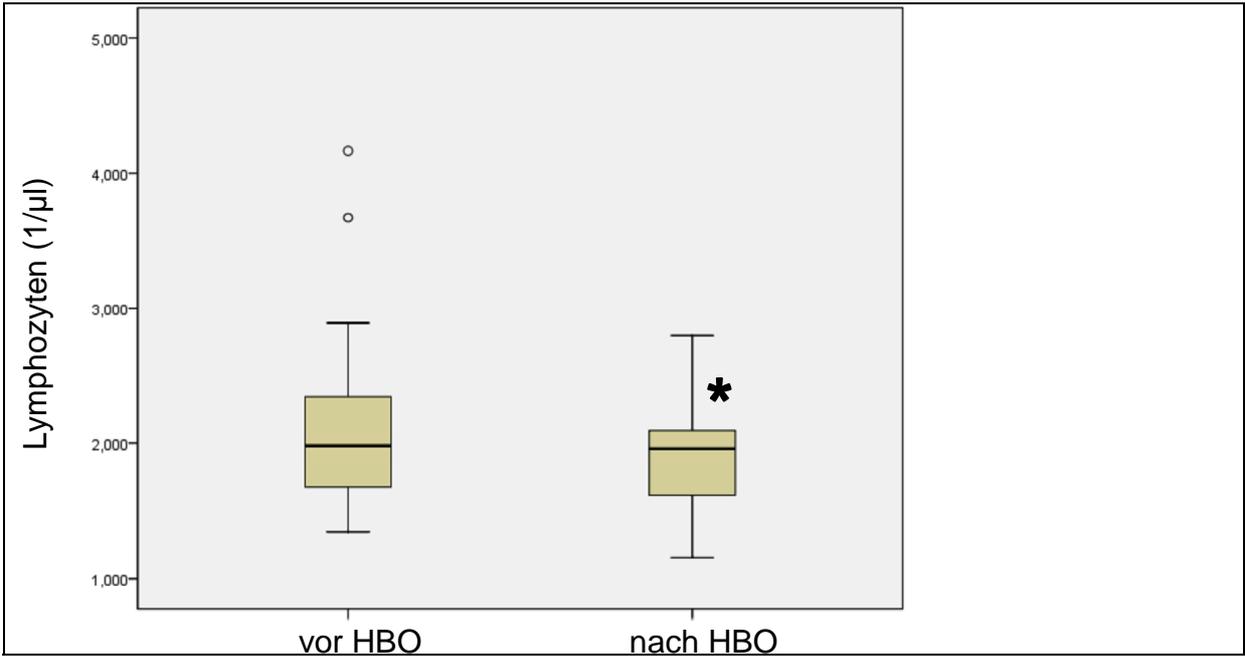


Abb. 6: Anzahl der Gesamtlymphozyten (*p=0,029)

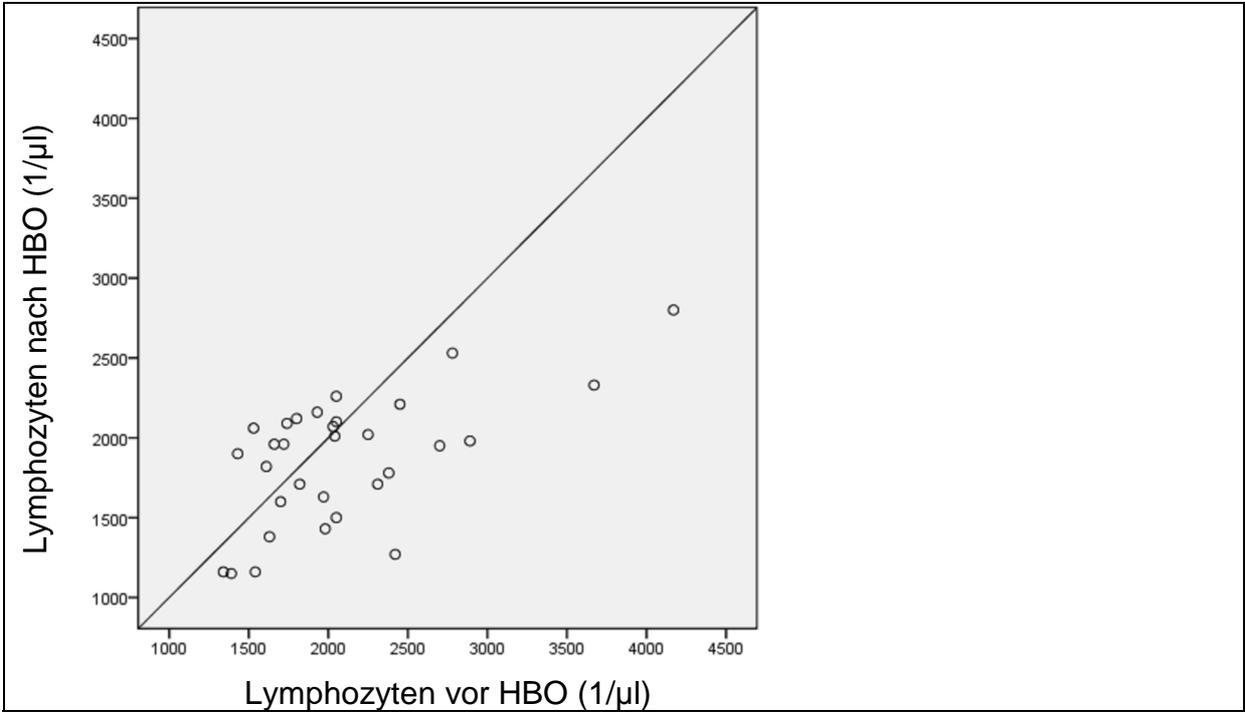


Abb. 7: Streudiagramm der Gesamtlymphozytenzahl

Innerhalb der Lymphozytensubpopulationen kam es zu einer Verschiebung mit Abnahme der natürlichen Killerzellen zu Gunsten der B- und T-Lymphozyten. Die NK-Zellen fielen signifikant ab, sowohl prozentual als auch absolut (Abb. 8, 9, 10, 11).

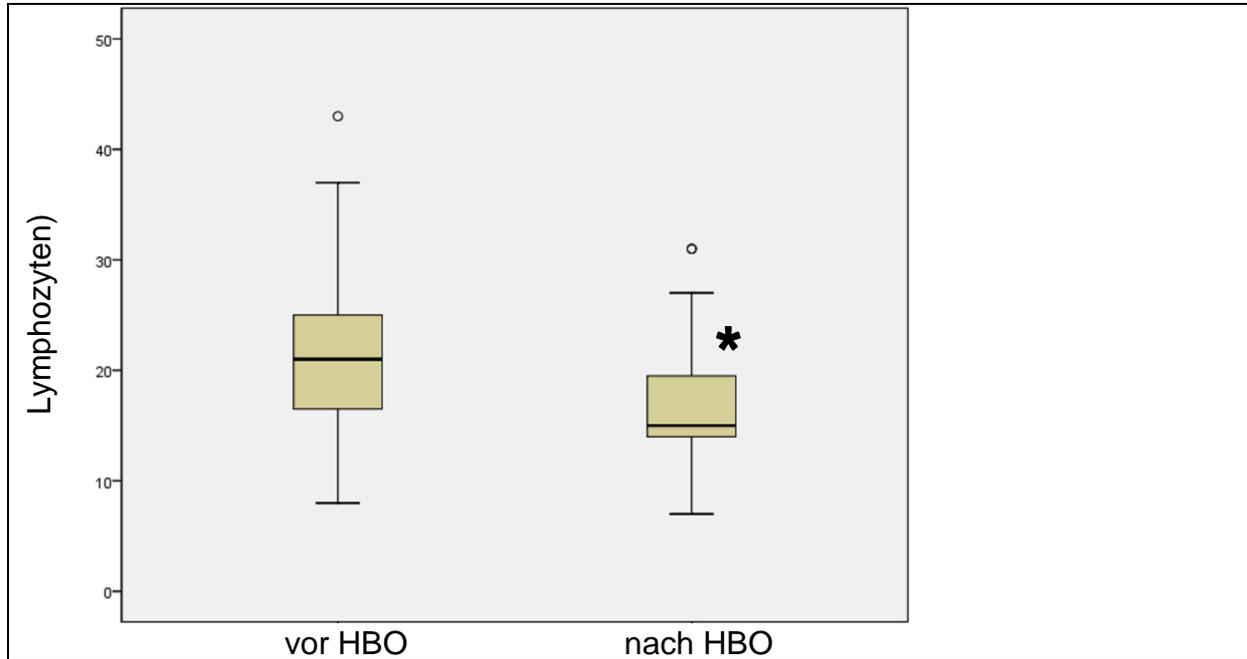


Abb. 8: Anteil der NK-Zellen an den Lymphozyten (*p=0,00004)

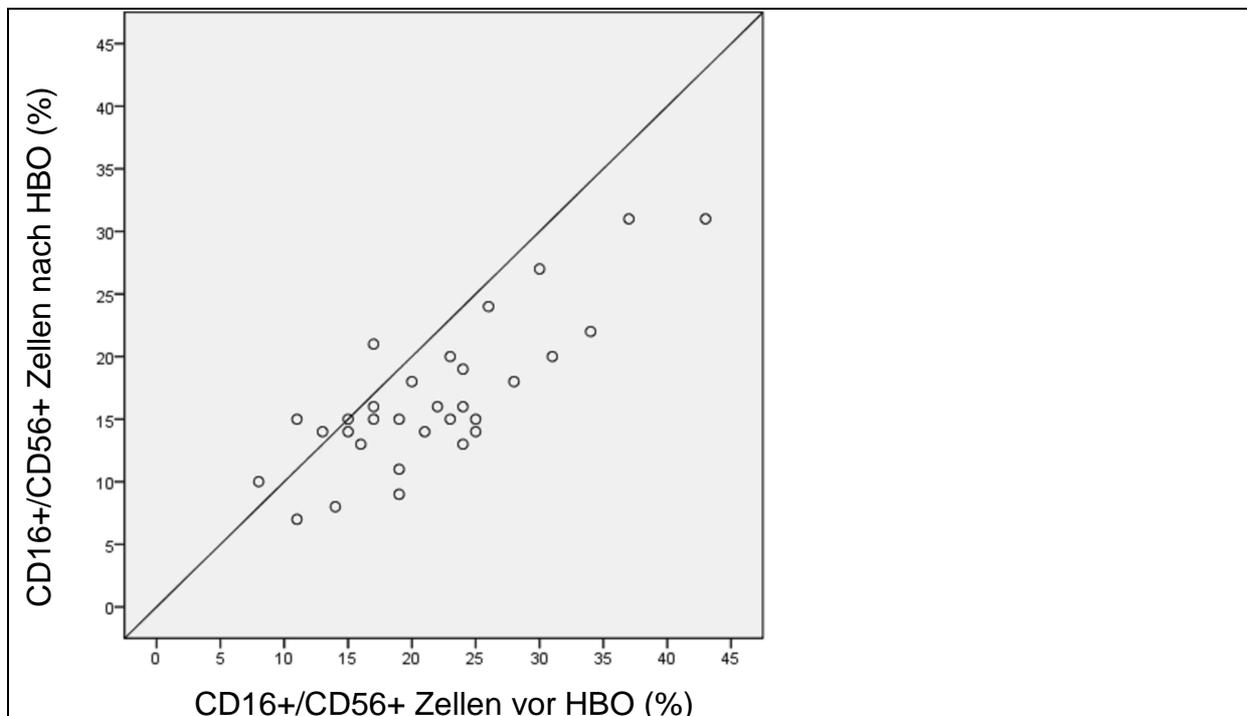


Abb. 9: Streudiagramm der NK-Zellen prozentual an den Lymphozyten

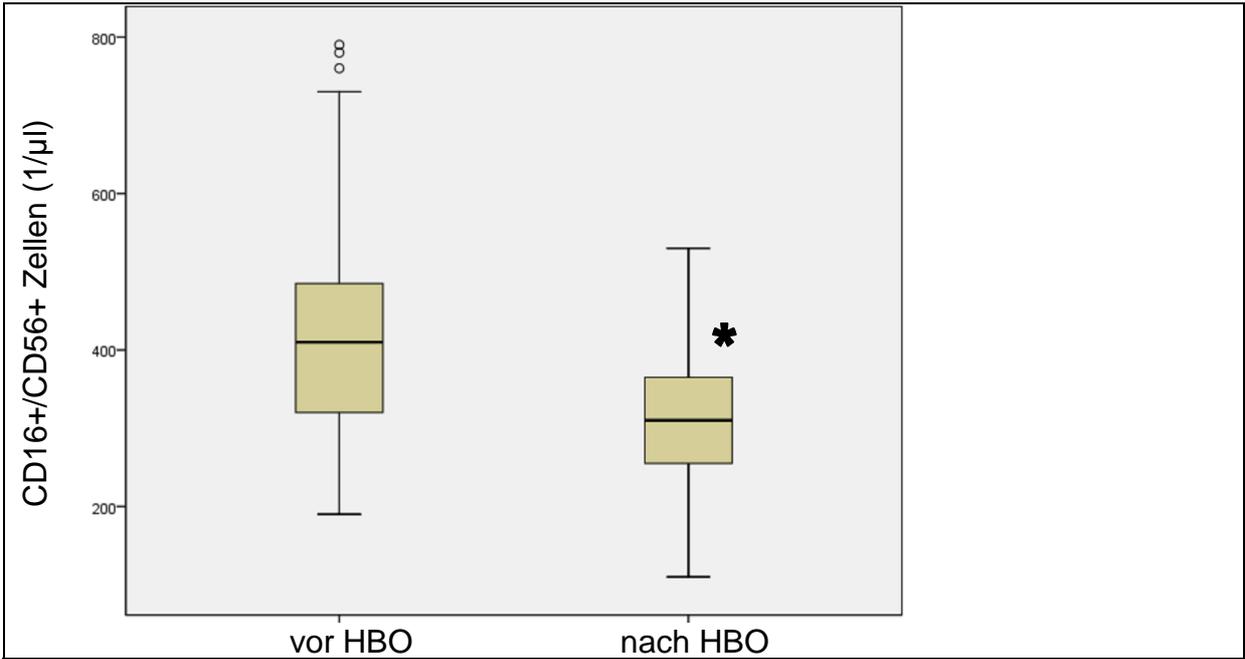


Abb. 10: Anzahl der NK-Zellen (*p=0,00001)

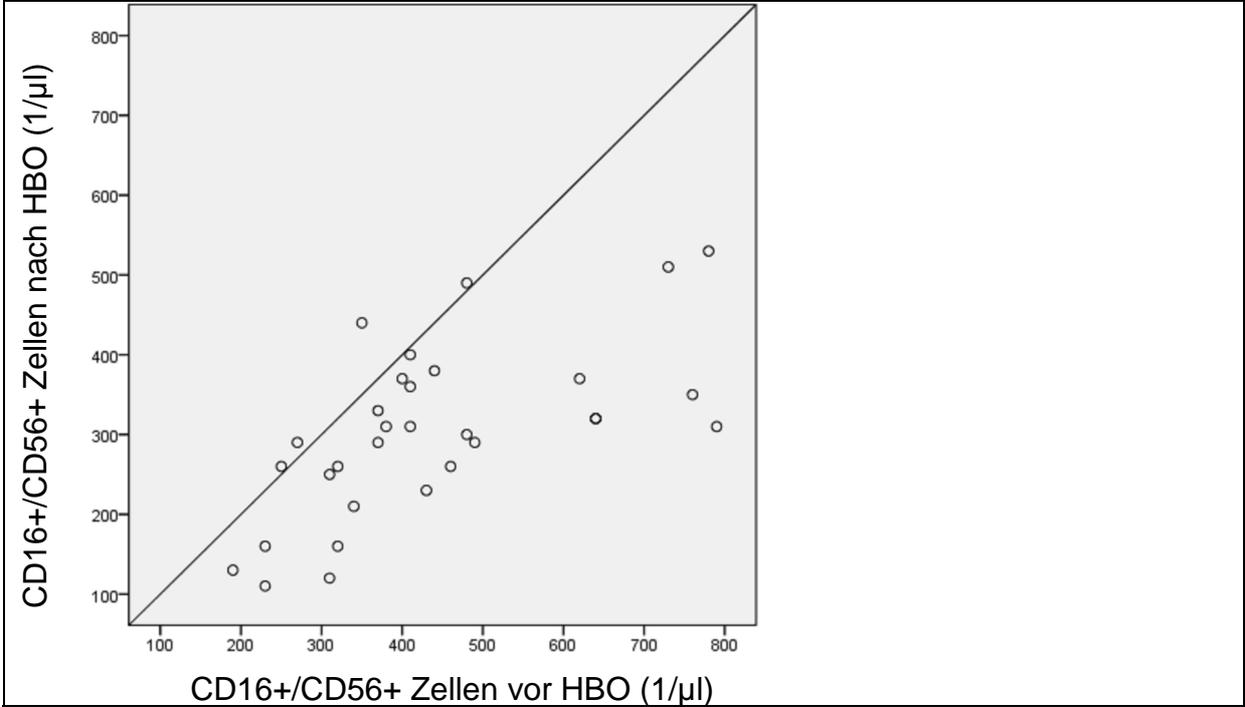


Abb. 11: Streuungsdiagramm der NK-Zellen

Die B- und T-Zellen zeigten eine signifikante Zunahme prozentual an den Gesamtlymphozyten (Abb. 12, 13, 15, 16). Bezüglich ihrer absoluten Zellzahlen kam es zu keinen signifikanten Veränderungen durch die HBO (Abb. 14, 17).

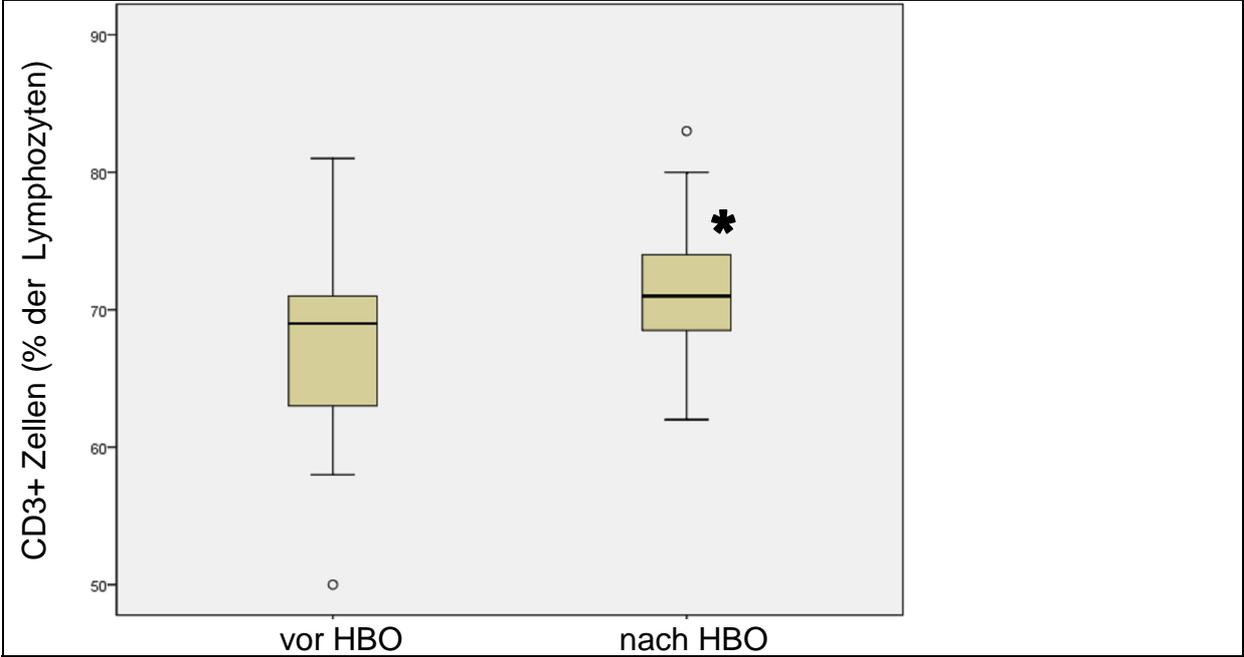


Abb. 12: Anteil der totalen T-Zellen an den Lymphozyten (*p=0,001)

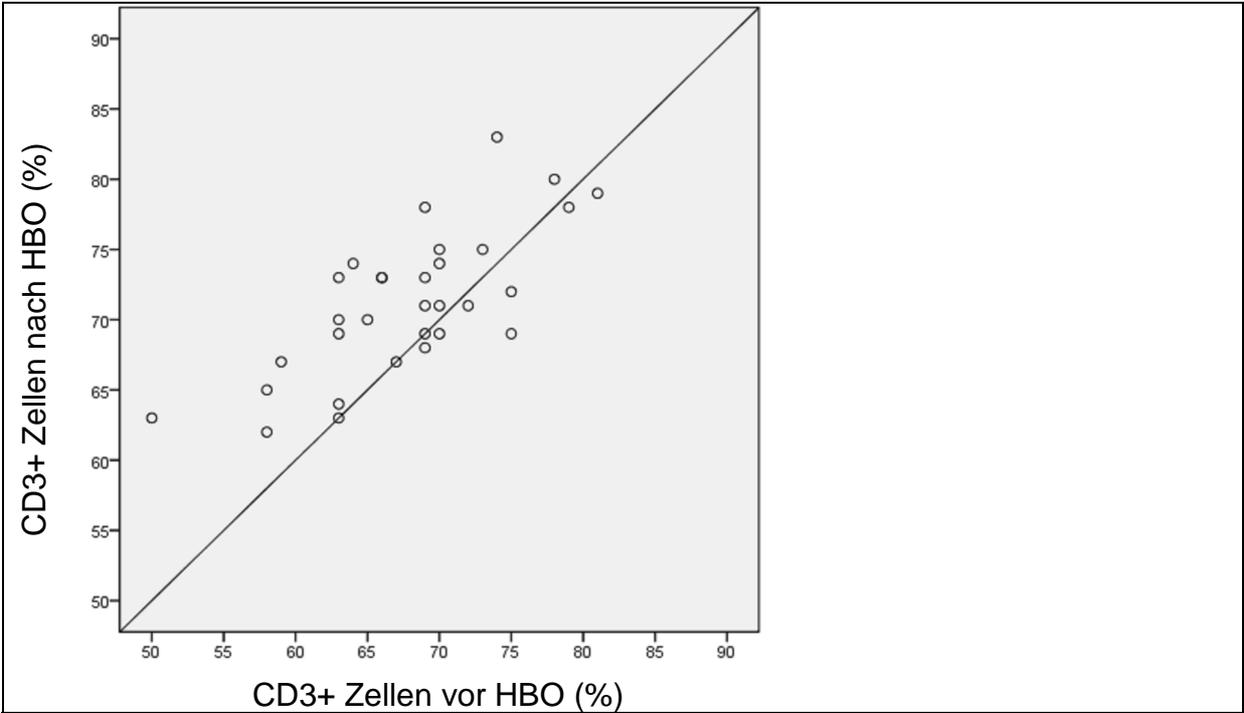


Abb. 13: Streudiagramm der totalen T-Zellen prozentual an den Lymphozyten

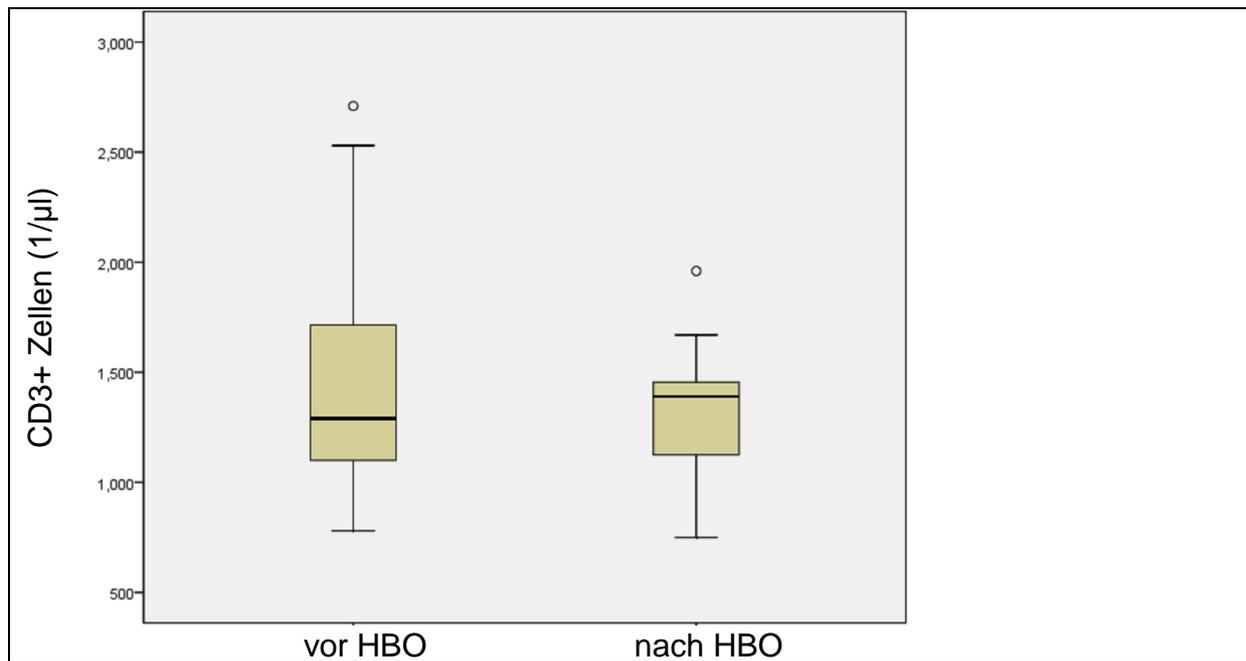


Abb. 14: Anzahl der totalen T-Lymphozyten

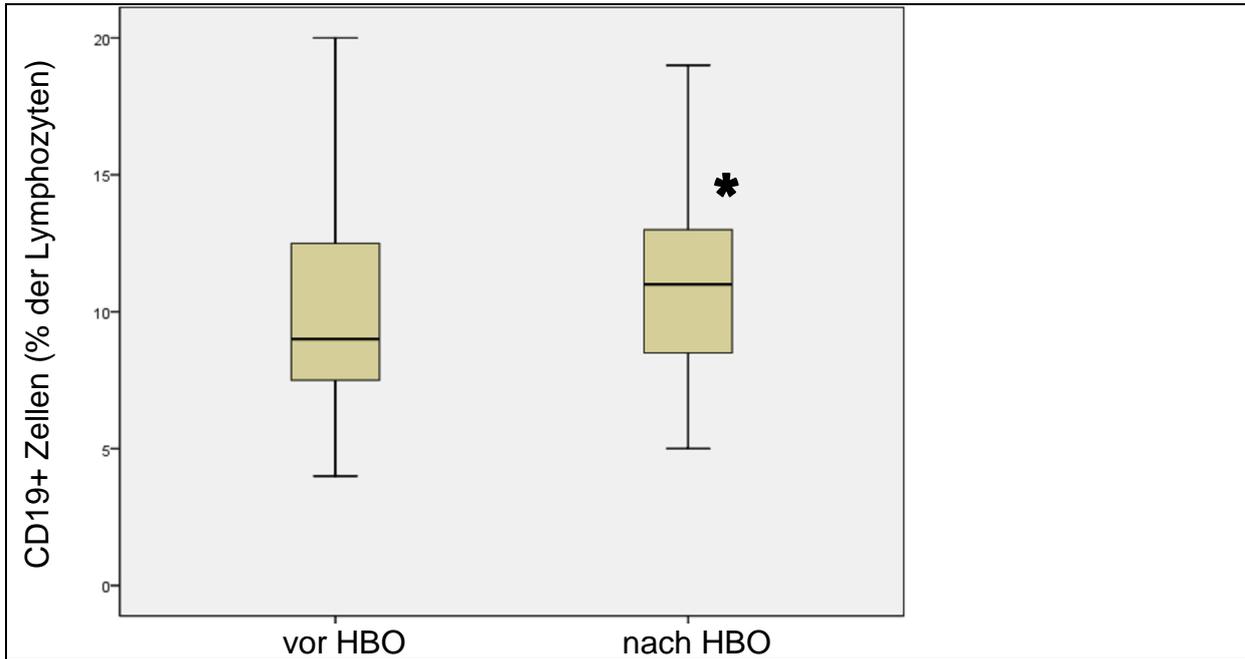


Abb. 15: Anteil der B-Zellen an den Lymphozyten (*p=0,013)

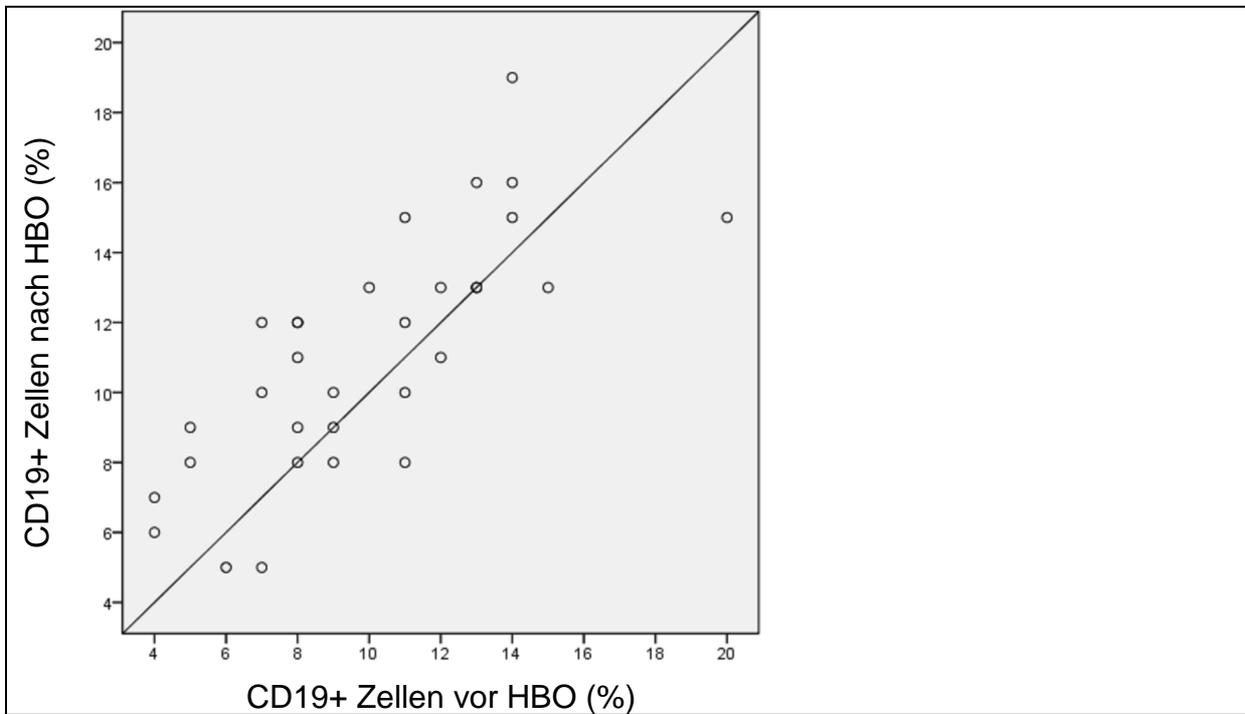


Abb. 16: Streudiagramm der B-Zellen prozentual an den Lymphozyten

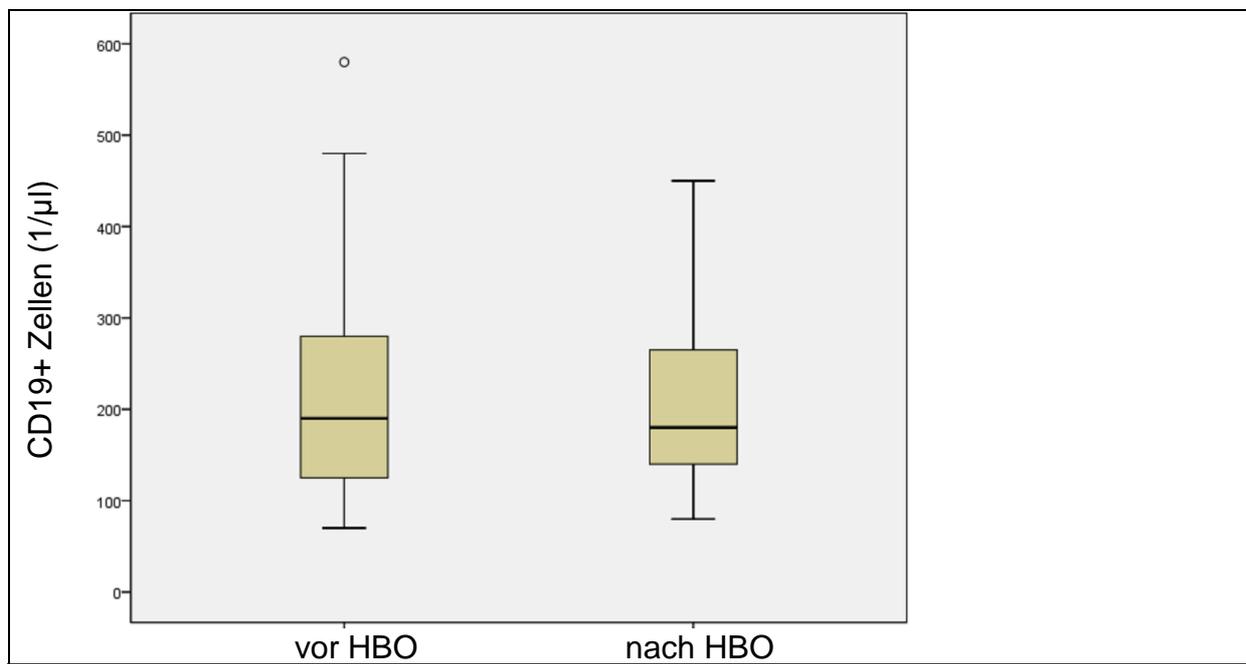


Abb. 17: Anzahl der B-Lymphozyten

Das Verhältnis von T-Helferzellen zu zytotoxischen- / Suppressorzellen verschob sich während der HBO signifikant in Richtung T-Helferzellen (Abb. 18, 19).

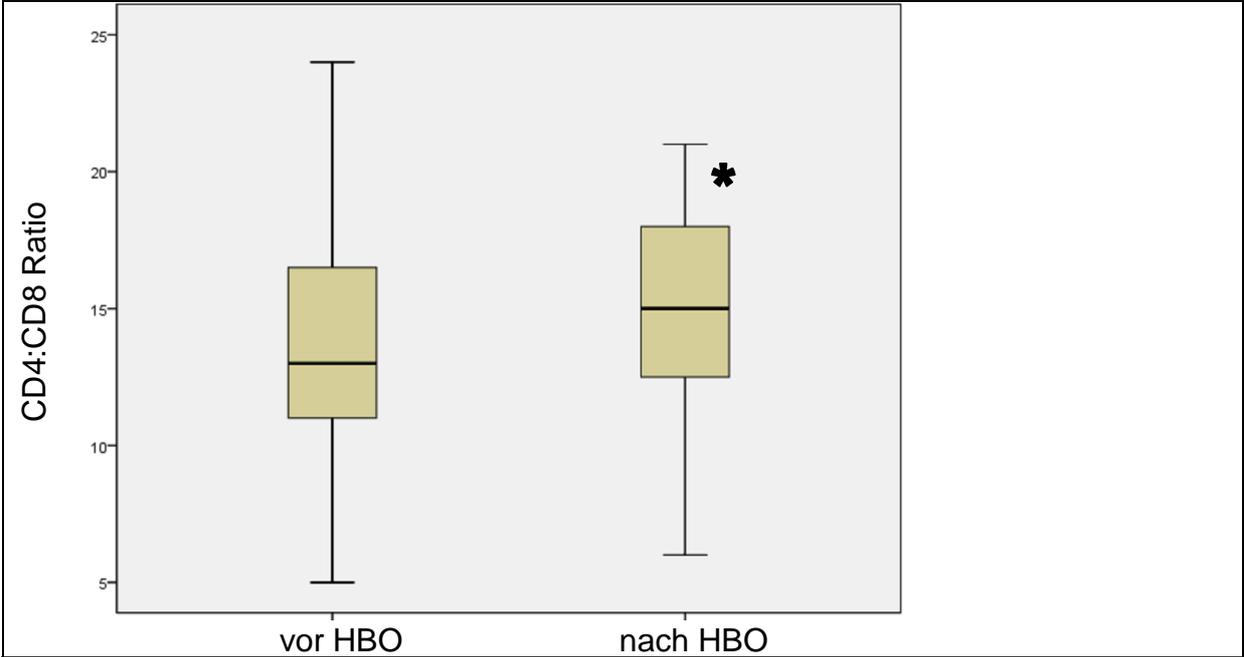


Abb. 18: Verhältnis T-Helferzellen zu Suppressor-/ zytotoxische T-Zellen (*p=0,001)

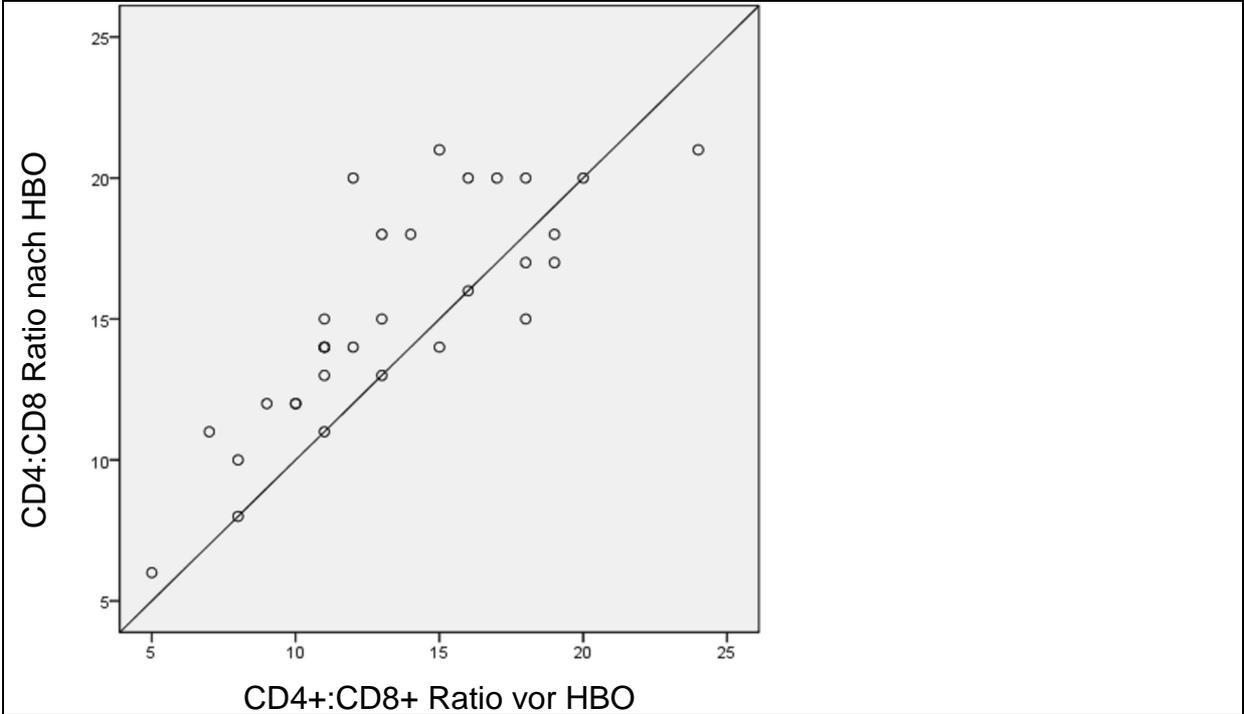


Abb. 19: Verhältnis T-Helferzellen zu Suppressor-/ zytotoxische T-Zellen als Streudiagramm

Es fiel ein signifikanter Abfall der Suppressor-/ zytotoxischen T-Zellzahl auf, die sich auch in einer signifikanten Abnahme prozentual an den Gesamtlymphozyten zeigte (Abb. 20, 21, 22, 23).

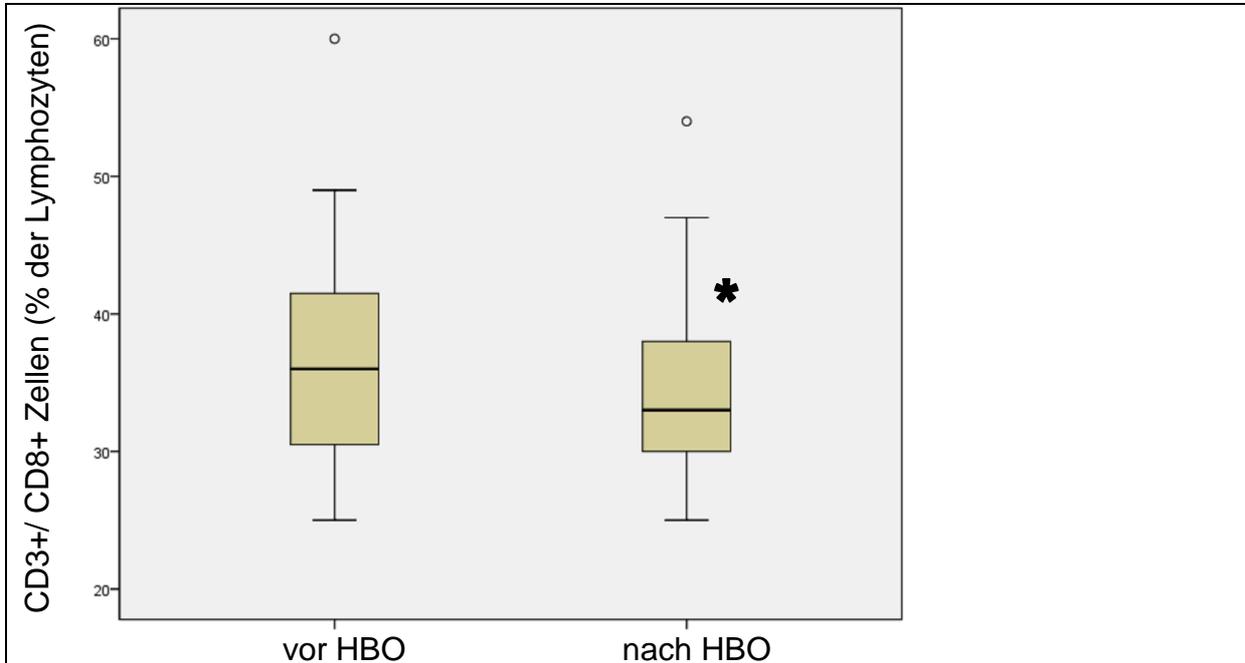


Abb. 20: Anteil der Suppressor-/ zytotoxischen T-Zellen an den Lymphozyten (*p=0,002)

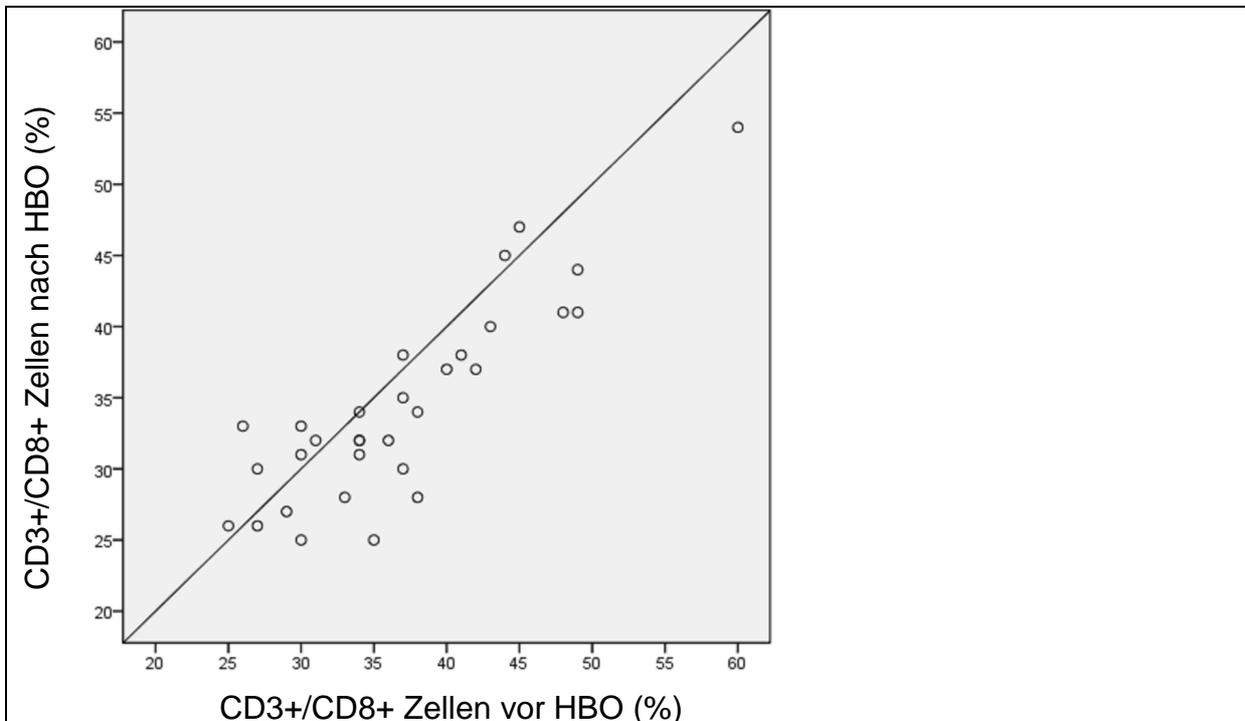


Abb. 21: Streudiagramm der Suppressor-/ zytotoxischen T-Zellen prozentual an den Gesamtlymphozyten

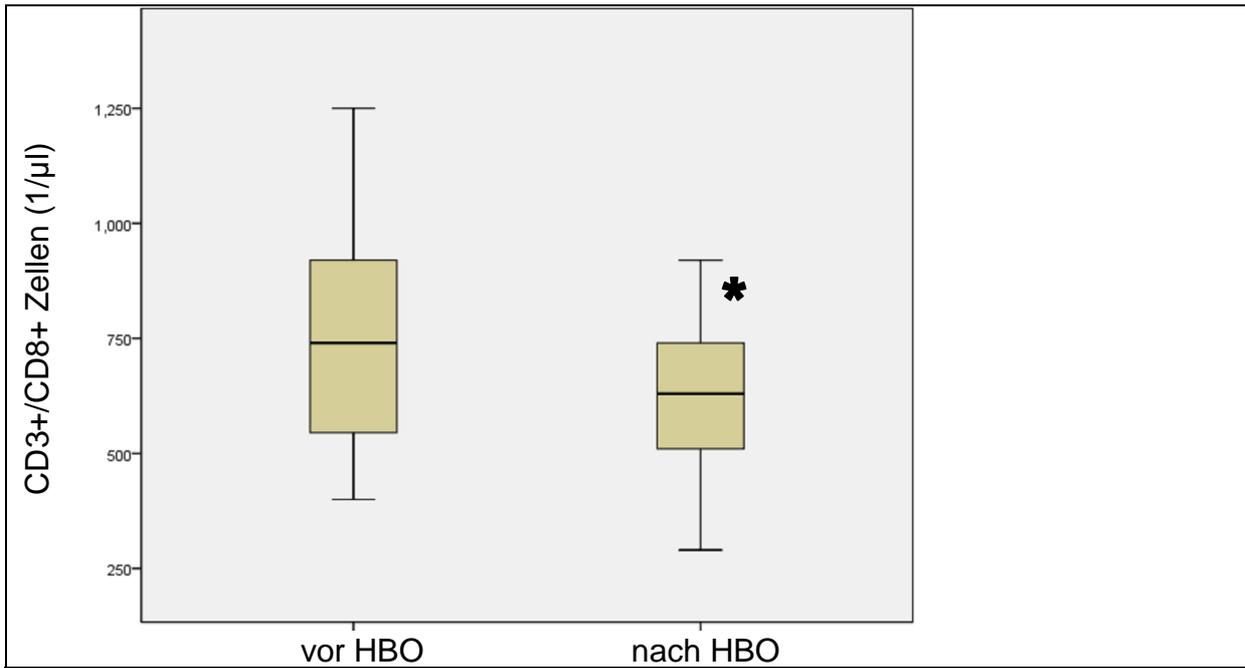


Abb. 22: Anzahl der Suppressor-/ zytotoxischen T-Zellen (*p=0,001)

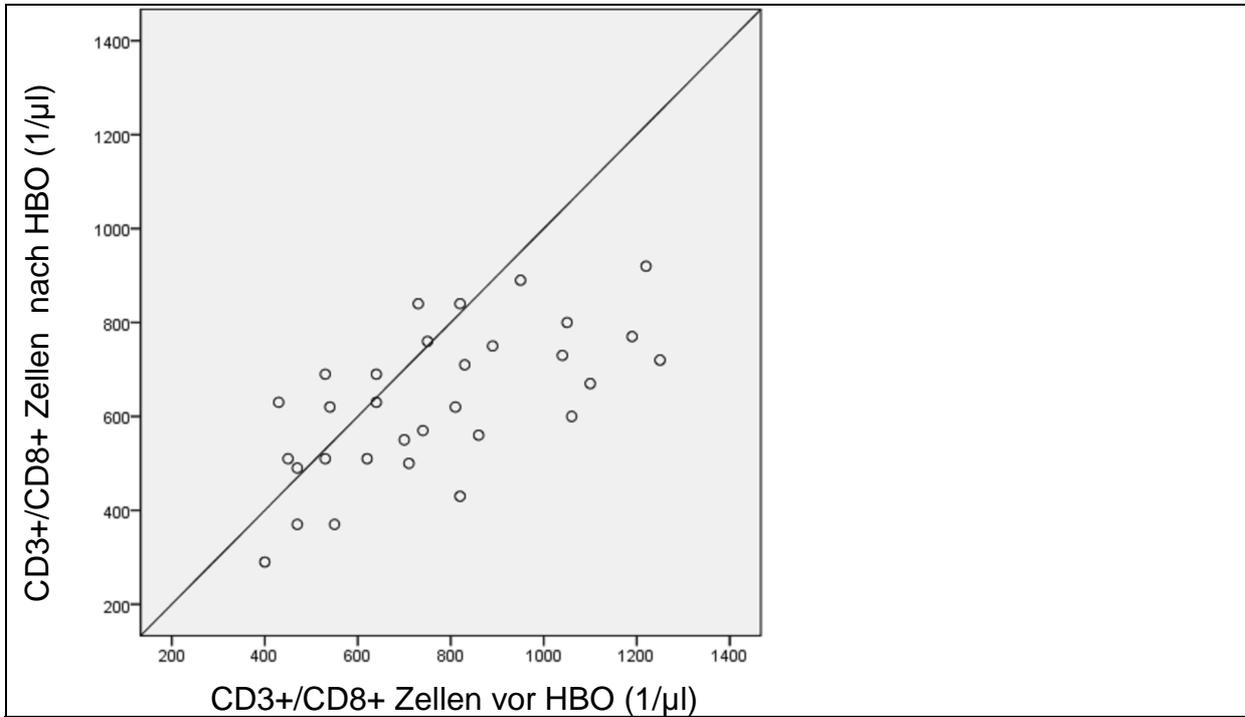


Abb. 23: Streuungsdiagramm der Suppressor-/ zytotoxischen T-Zellen

Gleichzeitig nahmen die T-Helferzellen anteilig an den Gesamtlymphozyten signifikant zu, ohne dass es zu einer signifikanten Zunahme der absoluten Zellzahl kam (Abb. 24, 25, 26).

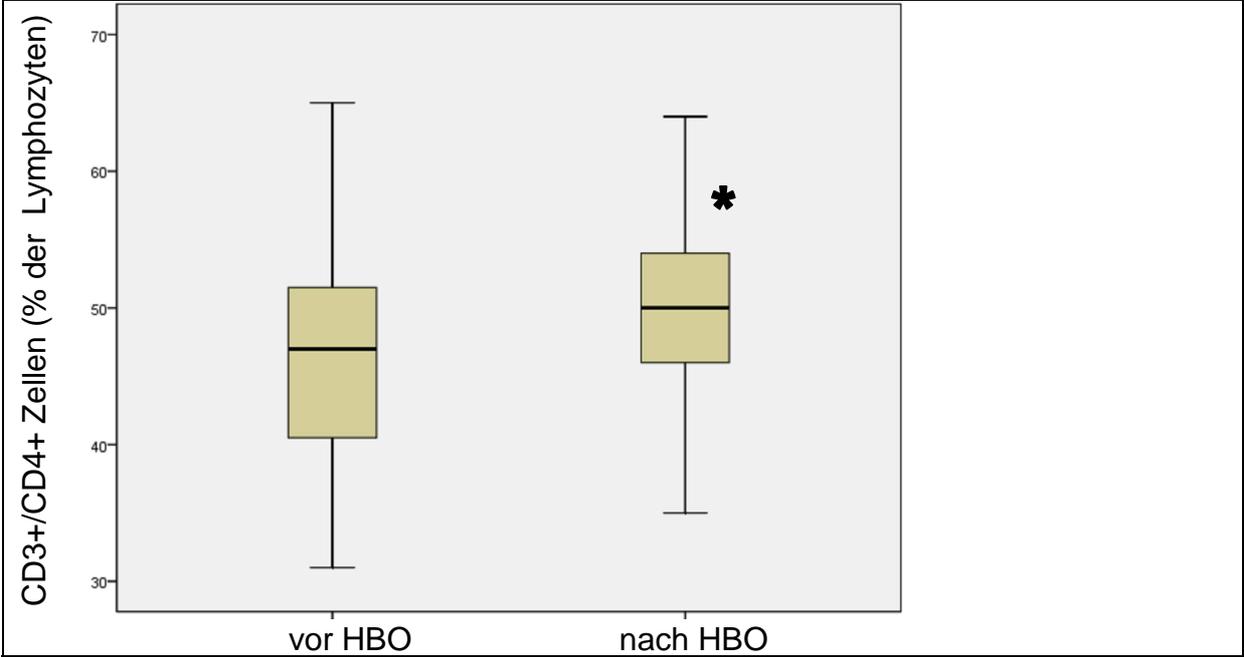


Abb. 24: Anteil der T-Helferzellen an den Lymphozyten (*p=0,0001)

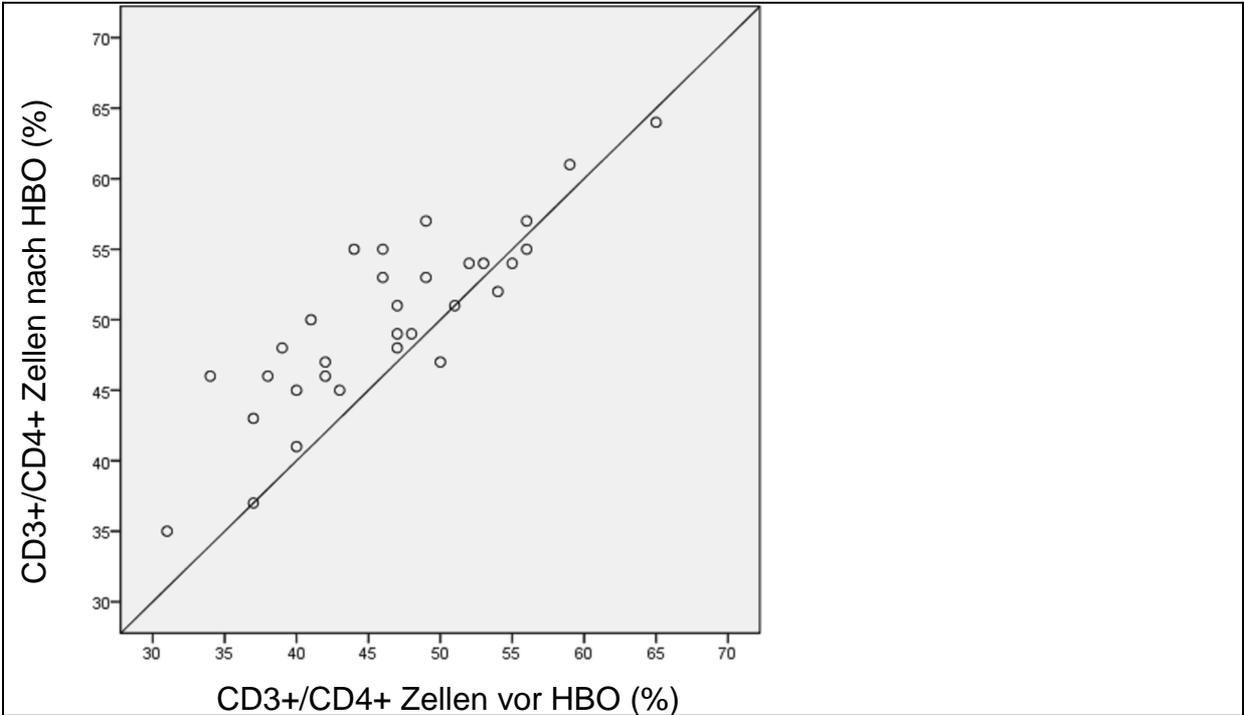


Abb. 25: Streuungsdiagramm der T-Helferzellen prozentual an den Lymphozyten

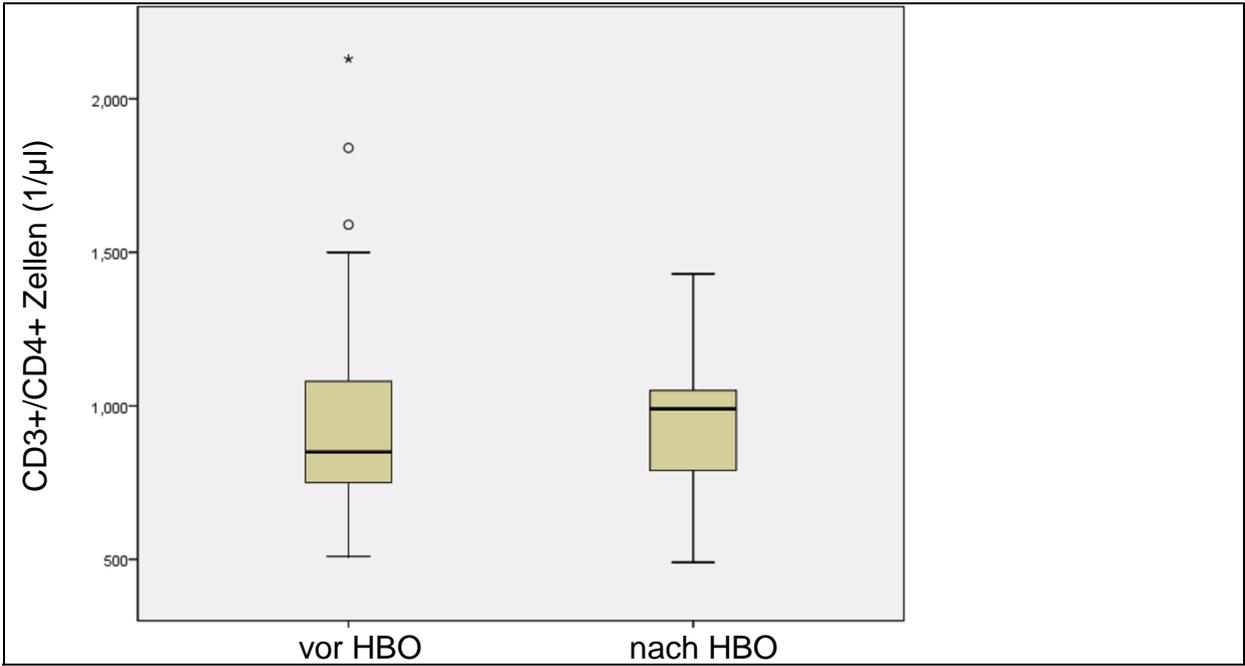


Abb. 26: Anzahl der T-Helferzellen

Nach der hyperbaren Oxygenierung wurde ein signifikanter Anstieg der Anzahl von CD25 tragenden T-Zellen verzeichnet, der sich ebenfalls als signifikante Zunahme im prozentualen Verhältnis innerhalb der Gesamtymphozyten widerspiegelte (Abb. 27, 28, 29, 30).

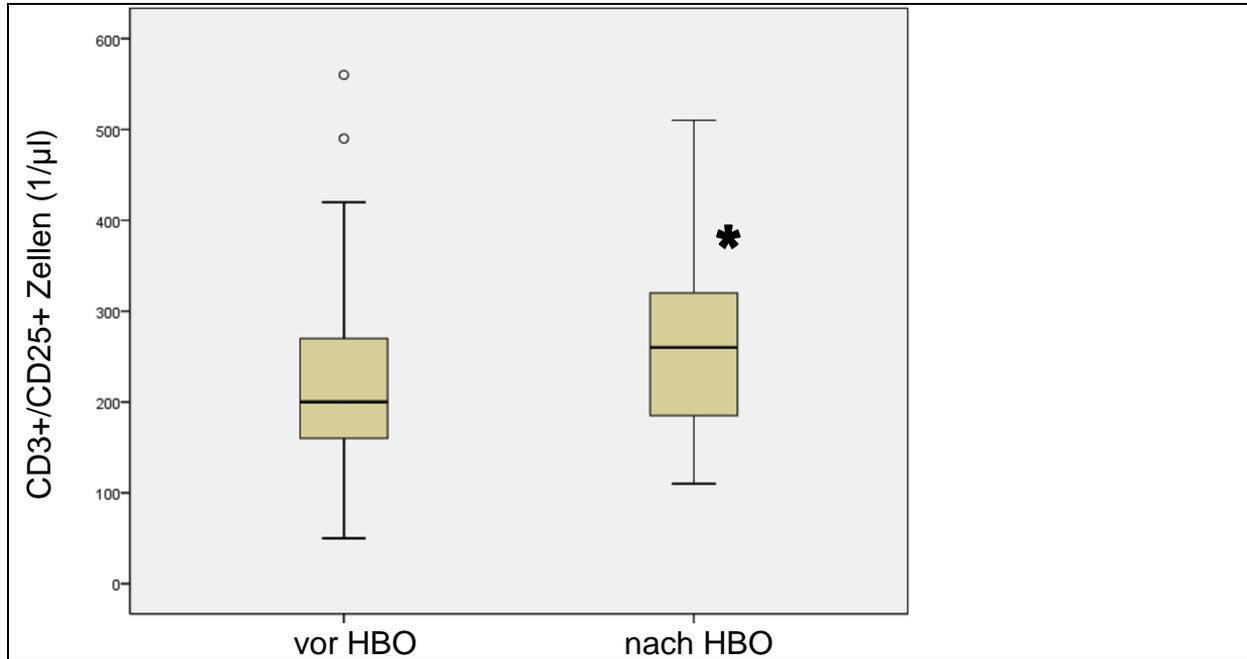


Abb. 29: Anzahl der Interleukin2 Rezeptor- tragenden T-Zellen (*p=0,033)

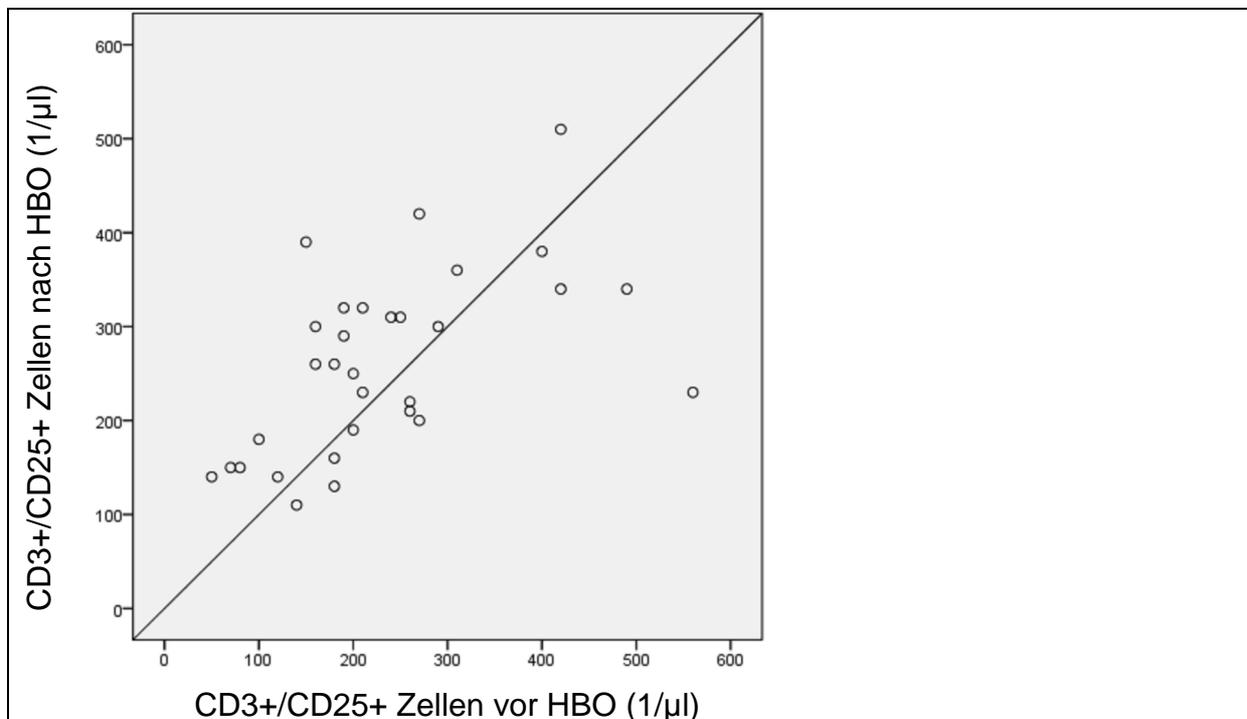


Abb. 30: Streuungsdiagramm Interleukin2 Rezeptor- tragenden T-Zellen

Die HLA-DR tragenden Zellen blieben durch die hyperbare Sauerstofftherapie unbeeinflusst (Abb. 31).

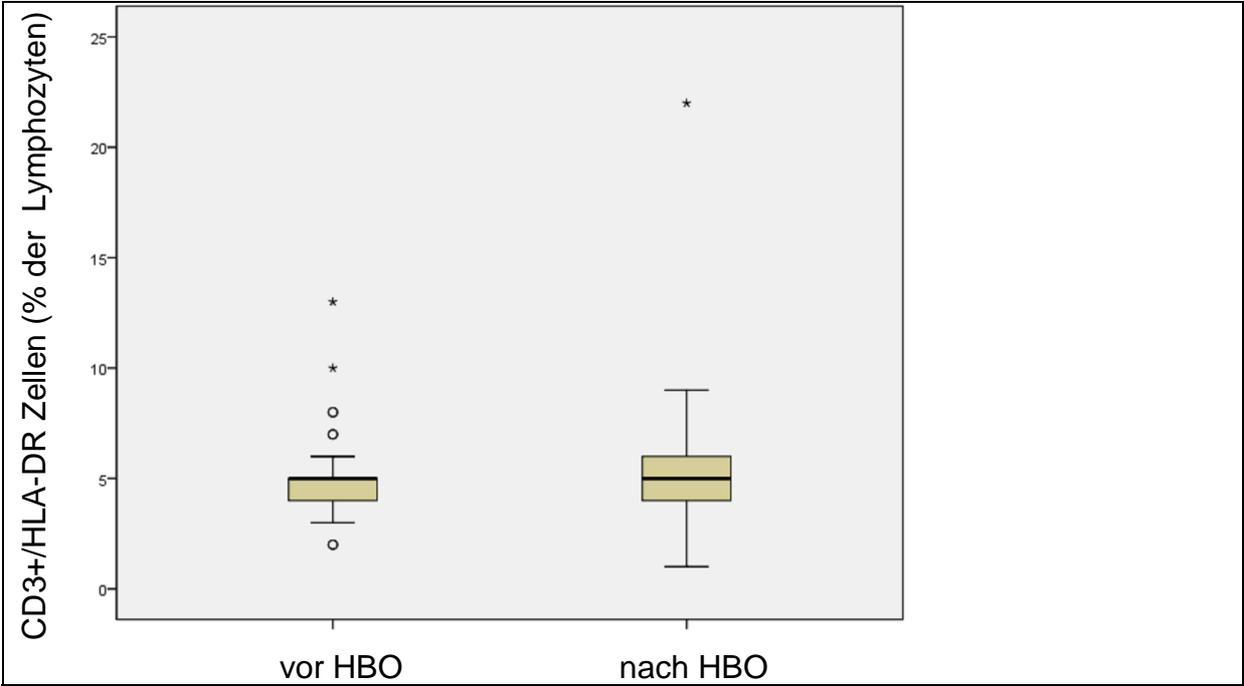


Abb. 31: Anteil der HLA-DR tragenden T-Zellen an den Lymphozyten

5 DISKUSSION

Sauerstoff ist für Zellen zur Bildung von energiereichen Phosphatverbindungen lebensnotwendig. Ein erhöhter Sauerstoffpartialdruck, wie im Rahmen der hyperbaren Sauerstofftherapie, führt zu einer vermehrten Entstehung freier Sauerstoffradikale in den Zellen. Freie Radikale sind bei der Abtötung von Pilzen und Bakterien sehr bedeutsam. Wenn diese hochreaktiven Oxidantien jedoch im Übermaß auftreten oder die antioxidative Abwehr der Zellen geschwächt ist, kann es in Form von sogenanntem oxidativen Stress zur Schädigung von körpereigenen Zellen kommen (Benedetti et al., 2004). Eine daraus resultierende erhöhte Mutageneserate wird als mögliche Ursache für die Pathogenese von Neoplasien und Metastasen diskutiert (Rothfuss et al., 2000). Demgegenüber konnte tierexperimentell *in vivo* durch eine mehrwöchige hyperbare Sauerstoffexposition ein Rückgang großer Zellkolonien eines Mammakarzinoms verzeichnet werden (Haroon et al., 2007). Des Weiteren konnten Rothfuss et al. bei Lymphozyten *in vitro* bereits nach einmaliger HBO einen anhaltend protektiven Effekt gegenüber den toxischen Eigenschaften des Sauerstoffs feststellen (1998). 24 Stunden bis eine Woche nach der Behandlung von gesunden Probanden konnte eine Exposition mit Wasserstoffperoxid keine Schäden an der DNA der Zellen mehr hervorrufen.

Leukozyten sind sowohl bei der Abwehr von körperfremden Mikroorganismen als auch bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungsprozessen von zentraler Bedeutung. Die Lymphozyten tragen die Hauptverantwortung für die zelluläre Immunabwehr und wirken als Faktoren der unspezifischen und der spezifischen Immunität über die gesamte Dauer einer Immunantwort. Zudem sind sie durch die Bildung und Abgabe von löslichen Faktoren auch Bestandteil der humoralen Immunreaktion. Durch ihre Fähigkeit Eiweiß-, Fett- und Kohlenhydratstrukturen zu erkennen und Fremdartigene von körpereigenen Antigenen zu differenzieren, sind sie darüber hinaus für die Immunregulation verantwortlich. Auf diese Weise sind Lymphozyten sowohl an der Kontrolle der Immunreaktion gegen Krankheitserreger, als auch an der Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen beteiligt (Janeway et al., 1997; Staines et al., 1999).

Die hyperbare Oxygenierung wird zur Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen

angewendet. Sie kommt in bestimmten lebensbedrohlichen Akutsituationen als obligatorische Behandlungsmaßnahme zum Einsatz. Andererseits werden auch Patienten bei elektiver Indikation behandelt. In Anbetracht der inkongruenten Datenlage in den bisherigen Studien stellt sich die Frage, ob die Durchführung einer hyperbaren Sauerstofftherapie für die Patienten möglicherweise ein gesundheitliches Risiko durch immunalternierende Nebenwirkungen mit sich bringt. Zumal bislang nur wenige Studien beschrieben sind, in denen der Effekt der HBO mit praxisnahen Therapieschemata auf das humane Immunsystem untersucht wurde (Juttner et al., 2003, Weisz et al., 1997).

Eine etwaige immunsuppressive Wirkung der hyperbaren Sauerstofftherapie im Sinne eines Abfalls der ermittelten Zellpopulationen könnte zu einer erhöhten Infektanfälligkeit führen (Brenner et al., 1999). Für einen immunsuppressiven Effekt der HBO wurden in der Literatur bereits verschiedene Mechanismen diskutiert. Neben der unmittelbaren Zytotoxizität des Sauerstoffs durch die Bildung von Radikalen (Narkowicz et al., 1993), werden auch sekundäre Ursachen, wie die Sekretion endogener Stresshormone in Erwägung gezogen (Xu et al., 1997). Trifft dies zu wäre auch eine gezielte Applikation der HBO zur Behandlung bestimmter Autoimmunerkrankungen oder von Transplantatabstoßungsreaktionen denkbar (Brenner et al., 1999; Al-Waili et al., 2006).

Die Behandlung in einer Druckkammer wird häufig als Stresssituation erlebt und kann folglich die Ausschüttung von Stresshormonen wie Katecholaminen und Kortikoiden beeinflussen (Tremellen et al., 1993, Lund et al. 1999). Dabei ist in der Regel mit einer Abnahme der situativ ausgelösten Reaktionen mit Häufigkeit der Behandlungen zurechnen. Eine erhöhte Konzentration von Katecholaminen führt zu einer zirkulatorischen Mobilisation von Leukozyten (Shepard, 1997). Die Aktivität der NK-Zellen erhöht sich und die Phagozytoseaktivität wird unterdrückt (Won and Ross, 1975). Kortisol stimuliert die Ausschwemmung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark in den Kreislauf, unterdrückt aber auch die Aktivität der zirkulierenden NK-Zellen (Lang und Verrey, 2007).

Ein Anstieg bestimmter Immunparameter ist nicht grundsätzlich mit einer verbesserten Abwehrlage gleichzusetzen. Denn eine höhere Anzahl der

verschiedenen Lymphozytensubpopulationen innerhalb der Normgrenzen ist nicht unmittelbar mit einer potenteren Abwehrleistung gleichzusetzen. Durch die zusätzliche Bestimmung von Oberflächenrezeptoren, die bei der Aktivierung der Zellen exprimiert werden, kann zumindest eine Aussage über deren Funktionszustand getroffen werden (Weaver, 2000). Letztlich muss eine Änderung der Abwehrlage in Abstimmung mit klinischen Verlaufsparemtern beurteilt werden. Weisz et al. führten bei Patienten mit Morbus Crohn eine hyperbare Sauerstofftherapie durch. Im Zusammenhang mit den günstigen klinischen Verläufen fiel ein Absinken der IL1-, IL6- und TNF α - Spiegel in den ersten sieben Tagen auf. Die genannten Zytokine haben eine entzündungsfördernde Wirkung, so dass die gute Abheilungsrate der akuten Entzündung auf das Absinken der Werte zurückgeführt werden konnte (Weisz et al., 1997).

5.1. Probandenkollektiv und Methoden

Bei der vorliegenden Untersuchung wählten wir die Probanden aus einem Kollektiv von Patienten mit akuten Innenohrfunktionsstörungen aus. Dadurch waren neben dem standardisierten Ablauf der hyperbaren Sauerstofftherapie auch ein synchroner Abnahmezeitpunkt und Verarbeitungszeitraum der Blutproben gewährleistet. Somit konnten tageszeitliche Schwankungen der untersuchten Immunparameter von vornherein ausgeschlossen werden. Eine signifikante Abhängigkeit zwischen der Anzahl der T-Lymphozyten sowie aktivierten Zellen (HLA-DR) und der zirkadianen Rhythmik ist belegt (Ritchie et al., 1983).

Bei dem Vergleich der Resultate mit bisherigen Studien muss die Altersverteilung in den untersuchten Kollektiven mit berücksichtigt werden. Bekanntermaßen nimmt die Funktionsfähigkeit des Immunsystems mit zunehmendem Alter ab (Baenkler et al., 2001). Bestimmte Zellpopulationen ändern sich im Laufe der Zeit in ihrem prozentualen Anteil. So wurde beispielsweise wiederholt ein Anstieg der CD4+ Zellen mit zunehmendem Alter beschrieben (Reichert et al., 1991; Tollerud et al., 1989). Die Arbeitsgruppen von Ginaldi und DeMartinis, die immunphänotypische Veränderungen von T-Lymphozyten bei alten Personen untersuchten, berichteten von vermehrten aktivierten T-Zellen, vermehrten NK-Zellen und verminderten Anteilen an T-Zellen, die Adhäsionsmoleküle exprimieren (Ginaldi et al., 2000; DeMartinis et al., 2000). Weksler stellte fest, dass Alterungsprozesse ab einem Alter

von 70 Jahren relevant werden (1980), so dass bei unserem Probandenkollektiv mit einem Altersspektrum von 30 bis 54 Jahren keine altersbedingten Veränderungen zu erwarten waren.

Des Weiteren berücksichtigten wir eine aussagekräftige Geschlechterverteilung unserer Probanden (11 Frauen, 20 Männer). Eine einseitige Geschlechterverteilung der Probandengruppen kann ebenfalls Einfluss auf die Ergebnisse haben. Unterschiede in den Immunparametern zwischen den Geschlechtern sind bekannt. So ergaben Untersuchungen gesunder Probanden signifikant höhere CD4+ und signifikant niedrigere CD8+ Zellanteile bei Frauen als bei Männern (Tollerund et al., 1989). Eine andere Studie zu Referenzwerten für Lymphozytenuntergruppen berichtete von erhöhten CD3+ und CD4+ Zellen bei weiblichen Probanden und höheren NK-Zellanteilen bei Männern und stellte außerdem bezüglich aller untersuchter Antigene eine höhere Variabilität bei Männern als bei Frauen fest (Reichert et al., 1991).

Unterschiedliche immunologische Untersuchungsmethoden können zu unterschiedlichen Resultaten führen. Ältere Studien arbeiteten mit Techniken wie Rosettenbildung (Nyland et al., 1989) oder Fluoreszenzmikroskopie (Bittermann, 1993). Die neueren Untersuchungen des zellulären Immunsystems werden nahezu ausschließlich mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (Chen et al. 2003, Jaeger et al. 2002, Xu et al. 1997). Sie stellt die apparative Basis für eine schnelle und zuverlässige Charakterisierung von Zellen aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften dar. Das Anwendungsspektrum reicht von Lymphozytentypisierung über funktionelle Untersuchungen bis hin zu Zellzyklusanalysen.

Von Bedeutung in der Diskussion der Ergebnisse verschiedener Arbeiten ist neben der Analysemethode auch die Methode der Probenaufbewahrung und Probenverarbeitung (Ashmore et al., 1989). Das Verwenden von Frischblut hat den Vorteil, dass die Verhältnisse der Zellanteile am ehesten dem *in vivo* Zustand entsprechen. Bei vorübergehendem Einfrieren muss durch die dafür notwendige Vorbehandlung und die mehr oder weniger lange Lagerung der Proben immer mit einem gewissen Verlust bestimmter Zellpopulationen gerechnet werden (Ekong et

al., 1993). Aus diesem Grund verwendeten wir in dieser Studie Frischblut, das innerhalb von 24 Stunden nach Blutentnahme gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert wurde.

Auch die Applikationskonditionen der hyperbaren Sauerstofftherapie, das heißt Höhe des Überdrucks, Behandlungsdauer, Intervallzeiten und Anzahl der Wiederholungen wirken sich entscheidend auf die Zellproliferation und Zellfunktion aus. Granowitz et al. untersuchten die Auswirkung von erhöhtem Umgebungsdruck und Hyperoxie unabhängig voneinander und als Kombination, in Form von hyperbarer Sauerstofftherapie, auf die Proliferation gutartiger und bösartiger Mamma-Epithelzellen *in vitro*. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Proliferation am deutlichsten durch die HBO hemmen ließ und zudem die antiproliferative Wirkung von der Dauer der hyperbaren Oxygenierung abhängig war (Granowitz et al., 2005).

5.2. Tierexperimentelle Studien

Betrachtet man kontrollierte Tierstudien mit Mäusen, fallen bereits kontroverse Resultate auf (Tab. 2). Nach achttägiger Exposition mit hyperbarem Sauerstoff stellten Gadd et al. einen Abfall der Lymphozytenproliferationen und eine signifikante Zunahme von IL2-Rezeptor Expression auf CD8+ Lymphozyten fest. Bezüglich der Phagozytoseaktivität und des respiratory burst neutrophiler Granulozyten konnte die Arbeitsgruppe von Gadd keine Einflussnahme nachweisen. Das Behandlungsprotokoll war charakterisiert durch eine täglich zweimal durchgeführte 90-minütige Expositionen mit 100%igen Sauerstoff bei 2 bar Gesamtdruck und einer Pause über 100 Minuten zwischen den Expositionen (Gadd et al., 1990).

Saito et al. hingegen konnten eine deutliche Suppression der Antikörperreaktion durch die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff nachweisen. Eine Woche nach Immunisierung von Mäusen mit Schafserythrozyten wurde das Ausmaß der Antikörperreaktion überprüft. Durch tägliche hyperbare Oxygenierung (1,9 bar Gesamtdruck, 100% O₂) über 60 Minuten an fünf konsekutiven Tagen fiel im Vergleich zur Kontrollgruppe die Bildung spezifischer B-Zellen und T-Helferzellen deutlich geringer aus. Zudem war die Produktion von Immunglobulinen reduziert. Nach HBO-Langzeittherapie über zwei Monate zeigte sich ein Rückgang der klinischen Symptome, bestehend aus Proteinurie, Lymphadenopathie und

Gesichtserythrem (Saito et al., 1991). Xu et al. fanden heraus das die verschiedenen Lymphozytenuntergruppen unterschiedlich sensitiv reagieren. Gesunde und genetisch modifizierte Mäuse (Lupus erythematodes Mausmodell) wurden über drei bis sieben Tage mit reinem Sauerstoff bei 2,8 bar vier Stunden täglich behandelt. Dabei kam es zu einem unterschiedlich hohen Abfall der B-Zellen und gesamten T-Zellen sowie einem Anstieg der T-Helfer- und Suppressorzellen. Insgesamt reagierten die Zellen im Thymus stärker als die Lymphozyten in der Milz. Da auch die Zellpopulationen der genetisch modifizierten Mäuse signifikant abfielen, wurde ein möglicher therapeutischer Effekt bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen mit HBO diskutiert (Xu et al., 1997).

In einer weiteren Studie mit Mäusen wurden klinische und immunserologische Parameter nach hyperbarer Oxygenierung untersucht. Genetisch modifizierte Mäuse (Lupus erythematodes Mausmodell) wurden einer 14tägigen Behandlung mit 95%igen O₂ bei 2,5 bar über 90 Minuten täglich unterzogen. Dabei wurden Lebenszeit, Proteinurie, Autoantikörper (anti-dsDNA AK), Lymphozytensubpopulationen und morphologische Veränderungen der Nieren untersucht. Die HBO führte zu einer erhöhten Überlebensrate der Mäuse. Zudem kam es zu einem Rückgang der Proteinurie und der Autoantikörper. Die histologische Untersuchung der Mäusenieren deutete auf einen verlangsamten Progress der Immunkomplexablagerungen hin. Die Durchflusszytometrie der Blutproben dokumentierte prozentuale Veränderungen der Lymphozytenuntergruppen. Vor allem ein signifikanter Abfall der T-Helferzellen und, entsprechend den Ergebnissen in unserer Arbeit (Abb. 15, 16), ein signifikanter Anstieg der B-Zellen konnten nachgewiesen werden. Insgesamt stellte sich eine Verbesserung der Autoimmunerkrankung durch die HBO heraus (Chen et al., 2003).

Hußmann et al. untersuchten die Auswirkung hyperbarer Sauerstofftherapie auf die Lymphozytensubpopulationen in Milz und in peripherem Blut am Verbrennungsmodell bei Ratten. Dabei ließ sich eine Erniedrigung der zytotoxischen T-Zellen nach einmaliger und nach mehrmaliger HBO in Kombination mit der Wundexzision feststellen (Hußmann et al., 1996). Eine signifikante Reduktion der CD8+ Zellen wurde auch in unserer Arbeit dokumentiert (Abb. 20, 21, 22, 23).

5.3. Vergleichsstudien mit Menschen

Die Ergebnisse der Studien mit menschlichen Probanden erscheinen ebenfalls widersprüchlich (Tab. 2). Nyland et al. deuteten ihre Daten von Patienten mit Multipler Sklerose, die einer HBO unterzogen wurden, als eine Immunstimulation. Nach 20 Sitzungen mit 100-prozentigem Sauerstoff beobachtete er fluoreszenzmikroskopisch einen signifikanten Anstieg der totale T-Lymphozyten und der T-Helferzellen, eine erhöhte allgemeine Rezeptordichte auf den Lymphozyten und Granulozyten, einen erhöhten Sauerstoffverbrauch der Granulozyten und eine signifikant erhöhte IgA-Konzentration im Serum. Die Konzentrationen der IgM und IgG blieben unverändert (Nyland et al., 1989).

Ebenfalls einen anregenden Effekt auf die Immunabwehr erbrachten die Ergebnisse von Bitterman et al. (1993). Eine einmalige Sauerstoffexposition gesunder Probanden über 90 Minuten bei 2,8 bar führte unmittelbar zu einem signifikanten Anstieg von HLA-DR-tragenden Zellen. Der Haupteffekt der einmaligen HBO bestand in dem signifikanten Abfall der CD4:CD8-Ratio auf Werte unterhalb des Normbereichs. In der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung stiegen die zytotoxischen T-Zellen und Monozyten an, während die T-Helferzellen abfielen. Die absolute Lymphozytenzahl, die B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und NK-Zellen blieben unverändert. Bei der Kontrollgruppe mit Raumluft wurden keine Veränderungen nachgewiesen. Eine Beeinflussung der Resultate durch einzelne Komponenten, wie z.B. Überdruck oder unspezifische Stressfaktoren, wurden durch einen entsprechenden Studienaufbau ausgeschlossen (Bitterman et al., 1993).

Die Arbeitsgruppe von Ginaldi stellte in einer Untersuchung von gesunden Probanden, die über 30 Sitzungen mit 94- bis 98-prozentigen Sauerstoff über Maske bei 2,5 bar behandelt wurden, ebenfalls einen signifikanten Anstieg von aktivierten CD8+ Zellen mittels Durchflusszytometrie fest. Sie berichtete über eine vermehrte Expression von CD25 und HLA-DR auf den Suppressorzellen sowie über einen leichten Abfall des Serum IL2-Spiegels (Ginaldi et al., 1991).

Dem gegenüber stehen Veröffentlichungen, die keinen Einfluss der hyperbaren Sauerstofftherapie auf die Immunparameter nachwiesen. Eine Doppelblindstudie von Barnes et al. bei 120 an Multipler Sklerose erkrankten Patienten erbrachte

fluoreszenzmikroskopisch keine signifikanten Veränderungen der T-Lymphozyten sowie T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen. Die Patienten wurden täglich einer 90-minütigen HBO mit 100%igen Sauerstoff und 2 bar über 20 Sitzungen unterzogen (Barnes et al., 1987).

Auch die Arbeitsgruppe von Jaeger stellte keinen Einfluss der HBO auf Monozyten und Lymphozyten fest. Nach zehn täglichen Behandlungen gesunder Probanden mit reinem Sauerstoff bei 2,5 bar über 90 min. kam es zu keinen signifikanten quantitativen Veränderungen in der Durchflusszytometrie. Ein Einfluss auf die Lymphozytenfunktion, gemessen anhand der HLA-DR und IL2-Rezeptor Expression, wurde ebenfalls nicht nachgewiesen. Abweichend von unserem Behandlungsschema wurde bei den HBO-Sitzungen die Sauerstoffgabe insgesamt vier mal über jeweils fünf Minuten unterbrochen und Raumluft geatmet (Jaeger et al., 2002). Die „Luftpausen“ sollen die Gefahren der Sauerstofftoxizität reduzieren (Welslau and Almeling, 1996). Gleichzeitig wird ein geringerer Sauerstoffpartialdruck erzielt und damit eine geringere Wirkung des Therapeutikums Sauerstoff in Kauf genommen. Das von uns verwendete Therapieschema *ohne* Luftpausen findet z.B. bei der Therapie des Gasbrandes Anwendung (Bakker and Kox, 1988).

5.4. Eigene Ergebnisse

Bei dem Therapieprotokoll unserer Probanden mit der Gabe von reinem Sauerstoff unter hyperbaren Bedingungen ohne Unterbrechungen über 110 min. zeigten sich eine Reihe von signifikanten Veränderungen der zellulären Immunabwehr (Tab. 2). Nach der zehntägigen Behandlung unserer Probanden stellte sich in der durchflusszytometrischen Analyse der Blutproben ein erheblicher Abfall der Gesamtlymphozytenzahl heraus. Die absolute Zellzahl nahm signifikant ab (Abb. 6, 7), ohne dass sich der prozentuale Anteil innerhalb der Leukozyten signifikant änderte (Abb. 5). Zusätzlich fiel eine signifikante Abnahme der natürlichen Killerzellen auf (Abb.8, 9, 10, 11). Die NK-Zellen sind Bestandteil der angeborenen Immunabwehr und sind in die frühe Erregerkontrolle involviert. Durch ihre Fähigkeit zur Zytolyse spielen sie eine bedeutende Rolle in der Abwehr virusinfizierter und transformierter maligner Zellen. Zudem sind sie an der Transplantatabstoßung beteiligt (Bancroft, 1993). Die signifikante Abnahme der Gesamtlymphozyten und insbesondere der natürlichen Killerzellen spricht zunächst für einen

immunsuppressiven Effekt der HBO.

Die absolute Zahl der B- und T-Lymphozyten änderte sich im Rahmen der hyperbaren Oxygenierung nicht (Abb. 14, 17). Durch den Rückgang der NK-Zellen bedingt, nahm jedoch der prozentuale Anteil der B- und T-Zellen an den Gesamtlymphozyten signifikant zu (Abb. 12, 13, 15, 16). Innerhalb der T-Lymphozyten verschob sich das Verhältnis von T-Helferzellen zu Suppressor-/zytotoxischen Zellen deutlich in Richtung T-Helferzellen. Durch einen signifikanten Abfall der zytotoxischen Zellen (Abb. 22, 23) nahm die CD4:CD8 Ratio signifikant zu (Abb. 18, 19). Anteilig an den Gesamtlymphozyten nahmen die CD8+ Zellen signifikant ab (Abb. 20, 21) und die CD4+ Zellen signifikant zu (Abb. 24, 25).

Die T-Zellen tragen die Hauptverantwortung für die zellvermittelte Immunabwehr. Die Anzahl der T-Helferzellen ist ein Maß für den Zustand des Immunsystems. Durch die Erkennung von Peptidantigenen und die Ausschüttung von Zytokinen sind die CD4+ Lymphozyten sowohl an der zellvermittelten als auch an der humoralen Immunantwort beteiligt (Staines et al., 1999). Die zirkulierende CD4+ Zahl und das Verhältnis CD4:CD8 sind folglich aussagekräftige Parameter für den momentanen immunologischen Status. Es ergibt sich eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen und bestimmte Neoplasietypen sobald die T-Helferzellen unter 200×10^6 Zellen/Liter im peripheren Blut fallen oder die CD4:CD8-Ratio unter eins fällt (Brenner et al., 1999). Die CD8+ Zellen bewirken eine negative Regulierung von Immunreaktionen. Ihre zytotoxische Komponente ist in der Lage, Viren und Bakterien nach Präsentation durch Makrophagen zu zerstören und Tumorzellen wirksam anzugreifen. Auch die Abstoßungsreaktion von Gewebetransplantaten (z. B. Knochenmark) wird von CD8 positiven Zellen bewirkt (Heckner und Freund, 2004).

Die Veränderungen betreffend die B- und T-Lymphozyten inklusive der CD4 positiven Zellen weisen auf eine stimulierende Wirkung der hyperbaren Sauerstofftherapie auf das Immunsystem hin. Da die quantitativen Verschiebungen der Immunzellen nicht unmittelbar mit einer tatsächlich veränderten Abwehrlage gleichzusetzen sind, ist es erforderlich, sich auch ein Bild über den Funktionszustand der T-Lymphozyten zu machen. Hierfür überprüften wir die Expression von den Oberflächenantigenen CD25 (= Interleukin 2-Rezeptor) und HLA-DR (Weaver, 2000). Der IL2-Rezeptor ist in

erster Linie ein Aktivierungsmarker der T-Helferzellen, während HLA-DR für eine Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen spricht. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde nach der HBO ein signifikanter Anstieg der CD25 tragenden T-Zellen verzeichnet (Abb. 29, 30), die sich auch als signifikante Zunahme prozentual innerhalb der Gesamtlymphozyten widerspiegelte (Abb. 27, 28). Die HLA-DR tragenden Zellen blieben durch die HBO unbeeinflusst (Abb. 31).

Tabelle 2: Datenübersicht über bisherige Studien und vorliegende Arbeit

Autor	Spezies (Anzahl)	HBO-Regime	Lymphozyten	B-Zellen	T-Zellen	Helferzellen	Supp./zytotox. Zellen	NK-Zellen	Aktivierungsmarker
Barnes et al. (1987)	MS-Patienten (120)	20d, 90 min., 100% O ₂ , 2 bar			↔	↔	↔		
Bitterman et al. (1993)	Gesunde Probanden (20)	1d, 90min., 100% O ₂ , 2,8bar	↔	↔	↔	↓	↑	↔	HLA-DR↑
Chen et al. (2003)	Genetisch modifizierte Mäuse (32)	14d, 90 min., 95% O ₂ , 2,5 bar		↑	↓	↓	↔		CD3+/ CD25+↑
Gadd et al. (1990)	Mäuse (21)	8d, 2x 90 min., 100% O ₂ , 2,4 bar	(↓)			↔	↔		CD8+/ CD25+↑
Ginaldi et al. (1991)	Gesunde Probanden (15)	30d, 100 min., 94-98%O ₂ , 2,5 bar			↔	↔	↔		CD8+/ CD25+↑ CD8+/ HLA-DR↑
Hußmann et al. (1996)	Rattenmodell, <i>in vitro</i> (74)	7d, 2x 90min., 100% O ₂ , 2,5bar				↔	↓		
Jaeger et al. (2002)	Gesunde Probanden (30)	10d, 90 min. incl. 4x 5min. O ₂ -Pause, 100% O ₂ , 2,5 bar	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Nyland et al. (1989)	MS-Patienten (10)	20d, 90 min., 100% O ₂ , 2 bar			↑	↑	↔		Rezeptor-dichte↑
Saito et al. (1991)	Gesunde & genetisch modifizierte Mäuse	5d, 60 min., 100% O ₂ , 1,9bar		↓	↓				
Xu et al. (1997)	Gesunde & genetisch modifizierte Mäuse	3-7d, 4 h, 100% O ₂ , 2,8 bar		↓	↓	↑	↑		
Pildner v. Steinburg (2010)	Gesunde Probanden (31)	10d, 110min., 100% O ₂ , 2,5 bar	↓	↑	↑	↑	↓	↓	CD3+/ CD25+↑ CD3+/ HLA-DR↔

Zusammenfassend konnten wir erstmalig zeigen, dass es nach einer zehntägigen hyperbaren Sauerstofftherapie mit dem von uns verwendeten Behandlungsschema bei fast allen untersuchten Immunparametern zu signifikanten Verschiebungen im peripheren Blut kommt. Sowohl die einzelnen Lymphozytenuntergruppen als auch die Aktivierungsmarker auf den T-Zellen wiesen signifikante Veränderungen auf. Somit ist bei dem angewandten Behandlungsprotokoll von einer immunmodulatorischen Wirkung der HBO auszugehen. Eine differenziertere Interpretation im Sinne einer Stimulation oder Suppression der zellulären Immunabwehr fällt schwer, da sich bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse kein einheitlicher Trend erkennen lässt. Die Abnahme von Gesamtlymphozyten und natürlichen Killerzellen lassen einerseits auf eine Immunsuppression schließen. Der Anstieg von B- und T-Lymphozyten, CD4:CD8 Ratio und IL2-Rezeptor tragenden T-Zellen legt andererseits eine anregende Wirkung auf die Immunabwehr nahe.

Darüber hinaus blieben die Verschiebungen aller Parameter innerhalb der Normbereiche, so dass zunächst keine klinischen Auswirkungen im Sinne einer Beeinflussung des Gesundheitszustandes oder Krankheitsverlaufs bei den Behandelten zu erwarten sind. Durch Variation der hyperbaren Sauerstoffexposition hinsichtlich der Dauer, Intensität und Anzahl der Wiederholungen könnte es jedoch zu einer Wirkungszunahme auf die Lymphozytenpopulationen kommen. Es bleibt auch offen, wie sich der Einfluss der hyperbaren Oxygenierung bei Patienten, die bereits signifikant immunsupprimiert oder sogar immuninkompetent sind, äußern würde. Möglicherweise würde ein stimuliertes Immunsystem sensibler gegenüber hyperbarem Sauerstoff reagieren und damit der immunologische Effekt eindeutiger.

Auch in Anbetracht der vorliegenden Untersuchung ist die Datenlage zu heterogen, um die Auswirkungen der hyperbaren Sauerstofftherapie auf das Immunsystem endgültig zu klären. Die in dieser Studie gezeigten Ergebnisse weisen auf eine Beeinflussung der Lymphozytenfunktionen hin ohne eine Einordnung ihrer klinischen Konsequenzen zuzulassen. Es bedarf weiterer Untersuchungen um ihre Bedeutung besser interpretieren zu können und damit möglicherweise auch nutzbar zu machen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die hyperbare Sauerstofftherapie ist die Behandlung eines spontan atmenden oder beatmeten Patienten mit reinem Sauerstoff innerhalb einer Behandlungskammer, bei Umgebungsdrücken über dem der Meereshöhe. Dabei wird durch Anhebung des Umgebungsdruckes die im Blut gelöste Sauerstoffmenge erhöht und über den Kreislauf dem gesamten Organismus zugeführt. Hyperbarer Sauerstoff nimmt auf zellulärer Ebene vielfach Einfluss auf den Körper. Im Rahmen der Wundheilung fördert er die Angiogenese, Fibrogenese und den Knochenstoffwechsel, er wirkt auf bestimmte Erreger bakterizid bzw. bakteriostatisch und verbessert die Phagozytoseleistung von Leukozyten. Die Auswirkungen von hyperbarer Oxygenierung auf die Lymphozyten, als zentrale Träger der angeborenen und erworbenen Immunabwehr, sind hingegen noch nicht eindeutig geklärt. In Anbetracht der inkongruenten Datenlage in den bisherigen Untersuchungen stellt sich die Frage, ob HBO-Patienten im Rahmen der Behandlung möglicherweise ein gesundheitliches Risiko durch immunalternierende Nebenwirkungen eingehen. Zumal bislang nur wenige Arbeiten beschrieben sind, in denen praxisnahe Therapieschemata nachgebildet wurden.

Nach Genehmigung durch die zuständige Ethikkommission untersuchten wir in der vorliegenden klinischen prospektiven Studie Patienten mit akutem Hörsturz oder Schalltrauma, die sich einer zehntägigen hyperbaren Sauerstofftherapie unterzogen. Der Einfluss der Behandlung auf die zelluläre Immunabwehr wurde anhand von quantitativen und funktionellen Änderungen der humanen Lymphozytenuntergruppen überprüft. Dafür wurde den 31 immunologisch gesunden Probanden vor der ersten und nach der letzten Tauchfahrt Blut aus einer peripheren Vene abgenommen und mittels monoklonaler Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, CD56 und HLA-DR durchflusszytometrisch analysiert.

Dabei wurde eine Reihe von signifikanten Veränderungen der Immunparameter dokumentiert. Es kam einerseits zu einer Abnahme der Gesamtlymphozytenzahl, der CD8+ Zellen und der natürlichen Killerzellen, absolut und auch prozentual innerhalb der Lymphozyten. Dies weist auf einen immunsuppressiven Effekt der durchgeführten HBO hin. Zum anderen traten Verschiebungen auf, die eine

anregende Wirkung der hyperbaren Oxygenierung auf die Immunabwehr nahe legen. Es zeigte sich nämlich ein signifikanter Anstieg der B- und T-Lymphozyten anteilig an den Gesamtlymphozyten. Auch die CD4:CD8 Ratio, bedingt durch einen Anstieg der T-Helferzellen und einen Abfall der Suppressor-/ zytotoxischen T-Zellen, stieg an. Als weiteres Aktivierungsmerkmal erhöhte sich die Zahl der IL2-Rezeptor tragenden T-Zellen signifikant. Lediglich die Expression von HLA-DR auf den T-Zellen zeigte keine Veränderungen.

Zusammenfassend zeigten bei unseren Probanden nahezu alle untersuchten Zellpopulationen signifikante Veränderungen im peripheren Blut. Sowohl die einzelnen Lymphozytenuntergruppen als auch der IL2-Rezeptor als Aktivierungsmarker auf den T-Zellen wiesen eindeutige Veränderungen auf. Somit ist bei dem angewandten Behandlungsprotokoll von einer immunmodulatorischen Wirkung der hyperbaren Sauerstofftherapie auszugehen. Dies entspricht auch dem überwiegenden Teil der bisherigen Vergleichsstudien, sowohl mit Menschen als auch mit Tieren. Eine differenziertere Interpretation im Sinne einer Stimulation oder Suppression der zellulären Immunabwehr fällt schwer, da sich bei den Ergebnissen, auch entsprechend der bisherigen Studienlage, kein einheitlicher statistischer Trend erkennen lässt.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbas, A.K., Murphy, K.M. and Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-93.
2. Allen, D.B., Maguire, J.J., Mahdavian, M., Wicke, C., Marcocci, L., Scheuenstuhl, H., Chang, M., Le, A.X., Hopf, H.W. and Hunt, T.K. (1997) Wound hypoxia and acidosis limit neutrophil bacterial killing mechanisms. *Arch Surg* 132, 991-6.
3. Al-Waili, N.S., Butler, G.J., Petrillo, R.L., Carrey, Z., Hamilton, R.W. (2006) Hyperbaric oxygen and lymphoid system function: a review supporting possible intervention in tissue transplantation. *Technol Health Care* 14(6) 489-98.
4. Ashmore, L.M., Shopp, G.M., Edwards, B.S. (1989) Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of different staining techniques and effects of blood storage. *J Immunol Methodes* 118, 209-215.
5. AWMF und Deutsche Gesellschaft für HNO-Krankheit, Kopf- und Halschirurgie (1996) Leitlinien und Algorithmen der Gesellschaft für Maßnahmen im Fachgebiet der HNO Heilkunde.
6. Baenkler, H.W (2001) Einflüsse auf das Immunsystem. In: Bob, A., Bob, K. (Ed) *Innere Medizin*. Thieme Verlag, Stuttgart, p.1615.
7. Bakker, D.J., Kox, C.D. (1988) Classification and therapy of necrotizing soft tissue infections: the role of surgery, antibiotics and hyperbaric oxygen. *Curr Probl Gen Surg* 5, 489-500.
8. Bancroft, G.J. (1993) The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Curr Opin Immunol* 5, 503-10.
9. Barao, I., Ascensao, J.L. (1998) Human natural killer cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 46, 213-29.
10. Barnes, M.P., Bates, D., Cartlidge, N.E., French, J.M. and Shaw, D.A. (1987) Hyperbaric oxygen and multiple sclerosis: final results of a placebo-controlled, double-blind trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50, 1402-6.
11. Beck. (1984) Anatomie der Innenohrschwerhörigkeit. *Arch Otolaryngol Suppl* I, 1-57.
12. Benedetti, S., Lamorgese, A., Piersantelli, M., Pagliarani, S., Benvenuti, F. and Canestrari, F. (2004) Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clin Biochem* 37, 312-7.
13. Bert, P. (1878) *La pression barometrique; recherche de physiologie experimental*. Librairie de l'academie de Medicine. Paris: Masson.
14. Bitterman, N., Bitterman, H., Kinarty, A., Melamed, Y. and Lahat, N. (1993) Effect of a single exposure to hyperbaric oxygen on blood mononuclear cells in human subjects. *Undersea Hyperb Med* 20, 197-204.

15. Bock, K.H., Frey, G., Lampl, L. (1994) Hyperbare Oxigenation. In: P. Lawin (Ed) Praxis der Intensivbehandlung. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, p. 415-437.
16. Boerema, I., Huiskes, J.W., Kroll, J.A., Kroon, B., Lokin, E. and Meyne, N.G. (1956) High atmospheric pressure as an aid to cardiac surgery. Arch Chir Neerl 8, 193-211.
17. Boerema, I., Meyne, N.G., Brummelkamp, W.H., Bouma, S., Mensch, M.H., Kamermans, F., Stern Hanf, A., van Aalderin, W. (1960) Life without blood. Ned Tijdschr Geneesk 104, 949-54.
18. Bosan, S., Walley, K.R. (2001) Models of tissue oxygen uptake and microcirculatory blood flow. In: Scharf, S.M., Pinsky, M. R., Magder, S. (Ed) Respiratory-circulatory Interactions in Health and Disease. Informa Health Care, p. 113-144.
19. Brenner, I., Shephard, R.J. and Shek, P.N. (1999) Immune function in hyperbaric environments, diving, and decompression. Undersea Hyperb Med 26, 27-39.
20. Brismar, K., Lind, F. and Kratz, G. (1997) Dose-dependent hyperbaric oxygen stimulation of human fibroblast proliferation. Wound Repair Regen 5, 147-50.
21. Brummelkamp, W.H., Hoogendijk, J., Boerema, I. (1961) Treatment of anaerobic infections (clostridal myositis) by drenching the tissue with oxygen under high atmospheric pressure. Surgery 49, 299-302.
22. Bühlmann, A.A. (1993) Tauchmedizin: Barotrauma, Gasembolie, Dekompression, Dekompressionskrankheit. 3.Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest.
23. Camporesi, E.M. (1996) Hyperbaric oxygen therapie: A committee report. In. UHMS, Maryland, p. 65-66.
24. Chen, S.Y., Chen, Y.C., Wang, J.K., Hsu, H.P., Ho, P.S. and Sytwu, H.K. (2003) Early hyperbaric oxygen therapy attenuates disease severity in lupus-prone autoimmune (NZB x NZW) F1 mice. Clin Immunol 108, 103-10.
25. Churchill-Davidson, I., Sanger, C., Thomlinson, R.H. (1955) High-pressure oxygen and radiotherapy. Lancet 1, 1091-1095.
26. DeMartinis, M., Modesti, M., Loreto F., Quaglino, D., Ginaldi, L. (2000) Adhesion molecules on peripheral blood lymphocyte subpopulations in the elderly. Life Sci 68, 139-151.
27. Demello, F.J., Haglin, J.J., Hitchcock, C.R. (1973) Comperative study of experimental Clostridium perfringens infection in dogs treated with antibiotics, surgery and hyperbaric oxygen. Surgery 73, 936-941.
28. Ehlers, S., Hölscher, C. (2004) Erworbene Mechanismen der Infektabwehr. In: Adam, D., Doerr, H.W., Link, H., Lode, H. (Ed) Die Infektiologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 34-39.
29. Ekong, T., Kupek, E., Hill, A., Clark, C., Davies, A., Pinching, A. (1993) Technical

- influences on immunophenotyping by flow cytometry. The effect of time and temperature of storage on the viability of lymphocyte subsets. *J Immunol Methods* 164(2), 263-73.
30. European Undersea Conference on Hyperbaric Medicine (ECHM) (2004) 7th European Consensus Conference on Hyperbaric Medicine, Lille / France.
 31. Fearon, D.T. and Locksley, R.M. (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-3.
 32. Flook, V. (1987) Physics and physiology in the hyperbaric environment. *Clin Phys Physiol Meas* 8, 197-230.
 33. Fujihashi, K., Boyaka, P.N., McGhee, J.R. (2005) The mucosal immune response. In: Kaufmann, S.H.E., Steward, M.W. (Ed) *Immunology*. Hodder Arnold/ASM Press, London, Washington DC, p. 519-554.
 34. Gadd, M.A., McClellan, D.S., Neuman, T.S. and Hansbrough, J.F. (1990) Effect of hyperbaric oxygen on murine neutrophil and T-lymphocyte functions. *Crit Care Med* 18, 974-9.
 35. Ganzer, U. (1998) Resümee des Rundtischgesprächs: "Hyperbare Sauerstofftherapie bei cochleären Funktionsstörungen.". In: 69. Jahrestagung der Deutsch. Ges. für HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie am 23.05.1998, Hannover.
 36. Georgi, P., Bierbach, E. (2007) Prinzip der Erregerabwehr. In: *Infektionskrankheiten und Infektionsschutzgesetz*. Urban & Fischer, München, Jena, p. 29-42.
 37. Ginaldi, L., DeMartinis, M., Modesti, M., Corsi, M.P. (1991) Modification of immune parameters after hyperbaric oxygen treatment in healthy volunteers *Journal of Hyperbaric Medicine* 6, 25-31.
 38. Ginaldi, L., DeMartinis, M., Modesti, M., Loreto F., Quaglino, D., Corsi, M.P. (2000) Immunophenotypical changes of T lymphocytes in the elderly. *Gerontol* 46: 242-248.
 39. Granowitz, E.V., Tonomura, N., Benson, R.M., Katz, D.M., Band, V., Makari-Judson, G.P. and Osborne, B.A. (2005) Hyperbaric oxygen inhibits benign and malignant human mammary epithelial cell proliferation. *Anticancer Res* 25, 3833-42.
 40. Granucci, F., Foti, M. and Ricciardi-Castagnoli, P. (2005) Dendritic cell biology. *Adv Immunol* 88, 193-233.
 41. Haroon, A.T., Patel, M. and Al-Mehdi, A.B. (2007) Lung metastatic load limitation with hyperbaric oxygen. *Undersea Hyperb Med* 34, 83-90.
 42. Hart, G.B., Lamb, R.C. (1983) Gas gangrene. *J.Trauma* 23, 991-1000.
 43. Heckner, F., Freund, M. (2004) Normale Morphologie der Blut- und Knochenmarkzellen. In: *Praktikum der mikroskopischen Hämatologie*. Urban & Fischer, München, p. 9-38.

44. Henshaw, N. (1664) Aero-chalinos: or, register for the air. Samuel Dancer. Dublin. In: I. Simpson (Ed) Compressed air as a therapeutic agent in the treatment of consumption, asthma, chronic bronchitis and other diseases. Sutherland and Knox, Edinburgh 1857.
45. Hill, G.B. and Osterhout, S. (1972) Experimental effects of hyperbaric oxygen on selected clostridial species. I. *In vitro*-studies. *J Infect Dis* 125, 17-25.
46. Hußmann, J., et al. (1996) Lyphozytensubpopulationen in Milz und Blut nach frühzeitigem Wunddébridement und akuter/chronischer Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 28, 103-107.
47. Inagaki, T., Ishino, H., Seno, H., Umegae, N. and Aoyama, T. (1997) A long-term follow-up study of serial magnetic resonance images in patients with delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning. *Psychiatry Clin Neurosci* 51, 421-3.
48. Inamoto, Y., Okuno, F., Saito, K., Tanaka, Y., Watanabe, K., Morimoto, I., Yamashita, U. and Eto, S. (1991) Effect of hyperbaric oxygenation on macrophage function in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 179, 886-91.
49. Jaeger, K., Juttner, B., Sommer, C., Scheinichen, D., Ruschulte, H., Franko, W. and Heine, J. (2002) [Effects of Repetitive Exposure to Hyperbaric Oxygen (HBO) on Leukocyte Function]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 37, 24-8.
50. Jaeger, K., Juttner, B. and Franko, W. (2002) [Hyperbaric oxygen therapy--options and limitations]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 37, 38-42.
51. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (1997) Grundbegriff der Immunologie. In: Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (Ed) Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, p. 1-36.
52. Jiang, J. and Tyssebotn, I. (1997) Cerebrospinal fluid pressure changes after acute carbon monoxide poisoning and therapeutic effects of normobaric and hyperbaric oxygen in conscious rats. *Undersea Hyperb Med* 24, 245-54.
53. Juttner, B., Scheinichen, D., Bartsch, S., Heine, J., Ruschulte, H., Elsner, H.A., Franko, W. and Jaeger, K. (2003) Lack of toxic side effects in neutrophils following hyperbaric oxygen. *Undersea Hyperb Med* 30, 305-11.
54. Kapsenberg, M.L. (2005) Dendritic-cell control of the adaptive immune response. *Nat Rev Immunol* 3, 984-993.
55. Kärre, K., Zerrahn, J. (2005) Natural killer cells. In: Kaufmann, S.H.E., Steward, M.W. (Ed) Immunology. Hodder Arnold/ASM Press, London / WashingtonDC, p. 79-108.
56. Kaufmann, S.H.E. (2008) Immunologische Grundlagen der Infektabwehr. In: R. Marre, Mertens, T., Trautmann, M., Zimmerli, W. (Ed) Klinische Infektiologie. Elsevier, München, p.40 - 51.

57. Kaye, D. (1967) Effect of hyperbaric oxygen on Clostridia *in vitro* and *in vivo*. Proc Soc Exp Biol Med 124, 360-6.
58. Kellerhals, B. (1972) Pathogenesis of inner ear lesions in acute acoustic trauma. Acta Otolaryngol 73, 249-53.
59. Kindwall, E.P. (1994) A history of hyperbaric medicine. In: Kindwall, E.P. (Ed) Hyperbaric medicine practice. Best Publishing Company, Flagstaff AZ.
60. Kindwall, E.P., Goldman R.W. (1995) Hyperbaric medicine procedures. In. WI: St. Luke's Medical Center, Milwaukee.
61. Kleine, H.D., Freund, M. (1996) Monoklonale Antikörper und Immunmarkierung. Infusionsther Transfusionsmed 23, 109-110.
62. Knighton, D.R., Halliday, B. and Hunt, T.K. (1984) Oxygen as an antibiotic. The effect of inspired oxygen on infection. Arch Surg 119, 199-204.
63. Kol, S., Ammar, R., Weisz, G. and Melamed, Y. (1993) Hyperbaric oxygenation for arterial air embolism during cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg 55, 401-3.
64. Krogsgaard, M., Davis, M.M. (2005) How T cells 'see' antigen. Nat Immunol 6, 239-45.
65. Lamm, K., Lamm, C., Schumann, K. (1995) Grundlagen einer Innenohrtherapie. Otolaryngol Nova 5, 163-60.
66. Lamm, K., Lamm, H., Arnold, W. (1998) Effect of hyperbaric oxygen therapy in comparison to conventional or placebo therapy or no treatment in idiopathic sudden hearing loss, acoustic trauma, noise-induced hearing loss and tinnitus. In: N. Yanagita, Nakashima, T. (Ed) Hyperbaric Oxygen Therapy in Otorhinolaryngology. Karger, p. 86-99.
67. Lang, F., Verrey, F. (2007) Allgemeine Aspekte endokriner Regulation. In: Schmidt, R.F., Lang, F. (Ed) Physiologie des Menschen. Springer, p. 475-480.
68. Loken, M.R. and Lanier, L.L. (1984) Three-color immunofluorescence analysis of Leu antigens on human peripheral blood using two lasers on a fluorescence-activated cell sorter. Cytometry 5, 151-8.
69. Lund, V., Kentala, E., Scheinin, H., Klossner, J., Koskinen, P., Jalonen, J. (1999) Effect of hyperbaric conditions on plasma stress hormone levels and endothelin-1. Undersea Hyperb Med. 26(2), 87-92.
70. Mader, J.T., Adams, K.R., Sutton T.E. (1987) Infectious diseases: pathophysiology and mechanisms of hyperbaric oxygen. J Hyperbaric Med 2, 133.
71. Mader, J.T., Brown, G.L., Guckian, J.C., Wells, C.H. and Reinartz, J.A. (1980) A mechanism for the amelioration by hyperbaric oxygen of experimental staphylococcal osteomyelitis in rabbits. J Infect Dis 142, 915-22.
72. Mandell, G.L. (1974) Bactericidal activity of aerobic and anaerobic

- polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* 9, 337-41.
73. Marroni, A., Oriani, G., Longoni, C. (1996) Pulmonary effects. In: Oriani G., Marroni, A., Wattel, F. (Ed) *Handbook on hyperbaric medicine*. Springer, New York, p. 75-80.
 74. McHeyzer-Williams, M., McHeyzer-Williams, L., Panus, J., Pogue-Caley, R., Bikah, G., Driver, D. and Eisenbraun, M. (2003) Helper T-cell-regulated B-cell immunity. *Microbes Infect* 5, 205-12.
 75. Meyers, R.A.M., Thom S.R. (1994) Carbon monoxide and cyanide poisoning. In: Kindwall, E. (Ed) *Hyperbaric Medicine Practice*. Flagstaff: Best Publishing Company, p. 344-372.
 76. Mialon, P., Joanny, P., Gibey, R., Cann-Moisan, C., Caroff, J., Steinberg, J. and Barthelemy, L. (1995) Amino acids and ammonia in the cerebral cortex, the corpus striatum and the brain stem of the mouse prior to the onset and after a seizure induced by hyperbaric oxygen. *Brain Res* 676, 352-7.
 77. Mielke, L., Breinbauer, B., Kling, M., Eisler, K., Moon, R.E., Hipp, R. (1996) Indikationen für den primären und frühzeitigen Einsatz der HBO. *Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 31, 100-102.
 78. Mills, K.H. (2004) Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 4, 841-55.
 79. Mittrücker, H.W., Kaufmann, S.H.E. (2005) Natural regulatory T cells and infection. *Current Opinion in Organ Transplantation* 10, 320-325.
 80. Moir, E.W. (1896) Tunneling by compressed air. *J Soc Arts* 269, Vol. XLIV, 567-585.
 81. Moon R.E. (1994) Clinical care at altered environmental pressure. In: Miller, R.D. (Ed) *Anesthesia*. Churchill Livingstone Inc., New York, p. 2277-2306.
 82. Morgenstern. (1994) Hörsturz. In: Naumann H.H., Helms, J., Heberhold, C. (Ed) *Oto Rhino Laryngologie in Klinik und Praxis*. Thieme, Stuttgart.
 83. Mueller, P.H.J., Tetzlaff, K., Neubauer, B., Mutzbauer, T.S. (1998) Pulmonary barotrauma during hyperbaric oxygen therapie: A case report. *Undersea hyperb Med* 25 (Suppl), 34.
 84. Nagata, S. and Golstein, P. (1995) The fas death factor. *Science* 267, 1449-56.
 85. Narkowicz, C.K., Vial, J.H., McCartney, P.W. (1993) Hyperbaric oxygen therapy increases free radical levels in the blood of humans. *Free Radi Res Commun* 19, 71-80.
 86. Nemiroff, P.M. (1988) Synergistic effects of pentoxifylline and hyperbaric oxygen on skin flaps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 114, 977-81.
 87. Nemiroff, P.M. and Rybak, L.P. (1988) Applications of hyperbaric oxygen for the otolaryngologist--head and neck surgeon. *Am J Otolaryngol* 9, 52-7.
 88. Nyland, H., Naess, A., Eidsvik, S., Glette, J., Matre, R. and Hordnes, C. (1989) Effect

- of hyperbaric oxygen treatment on immunological parameters in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 79, 306-10.
89. Nylander, G., Lewis, D., Nordstrom, H. and Larsson, J. (1985) Reduction of postischemic edema with hyperbaric oxygen. *Plast Reconstr Surg* 76, 596-603.
 90. Oriani, G., Marroni, A., Longoni, C. (1996) Physiology and physiopathology of hyperbaric oxygen. In: Oriani G., Marroni, A., Wattel, F. (Ed) *Handbook on Hyperbaric Medicine*. Springer, Berlin, p. 1-3.
 91. Park, M.K., Muhvich, K.H., Myers, R.A. and Marzella, L. (1991) Hyperoxia prolongs the aminoglycoside-induced postantibiotic effect in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 691-5.
 92. Peirce, E.C. (1980) Specific therapy for arterial air embolism. *Ann Thorac Surg* 29, 300-303.
 93. Pilgramm, M. (1984) Die hyperbare Sauerstofftherapie beim akuten Knalltrauma des Soldaten. *Wehrmed Monatsschr* 28, 479-492.
 94. Plafki, C., Peters, P., Almeling, M., Welslau, W. and Busch, R. (2000) Complications and side effects of hyperbaric oxygen therapy. *Aviat Space Environ Med* 71, 119-24.
 95. Podack, E.R. (2005) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. In: Kaufmann, S.H.E., Steward, M.W. (Ed) *Immunology*. Hodder Arnold/ASM Press, London / Washington DC, p. 471-485.
 96. Raffael, A., Nebe, C. T., Valet, G. (1994) Grundlagen der Durchflußzytometrie. In: Schmitz, G., Rothe, G. (Ed) *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Schattauer-Velag.
 97. Rajewsky, K. (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-8.
 98. Reichert, T., DeBruyere, M., Deneys, V., Töttermann, T., Lydyard, P, Yuksel, F., Chapel, H., Jewell, D., Van Hove, L., Linden, J., Buchner, L. (1991) Lymphocyte subset reference ranges in adult caucasians. *Clin Immunol Immunopathol* 60: 190-208.
 99. Ritchie, A.W.S., Oswald, I., Micklem, H.S., Boyd, J.E., Elton, R.A., Jazwinska, E., James, K. (1983) Circadian variation of lymphocyte subpopulations: a study with monoclonal antibodies. *British Med J* 286: 1773-1775.
 100. Rivera, J.C. (1964) Decompression sickness among divers: An analysis of 935 cases. *Milit Med* 129, 314-334.
 101. Romagni, S. (2005) Cytokines. In: Kaufmann, S.H.E., Steward, M.W. (Ed) *Immunology*. Hodder Arnold/ASM Press, London / Washington DC, p. 273-299.
 102. Rothe, G. (2007) Technische und methodische Grundlagen der Durchflussszytometrie. In: Sack, U., Tárnok, A., Rothe, G. (Ed) *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden*

- und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Karger, Basel, p. 27-70.
103. Rothfuss, A., Dennog, C. and Speit, G. (1998) Adaptive protection against the induction of oxidative DNA damage after hyperbaric oxygen treatment. *Carcinogenesis* 19, 1913-7.
 104. Rothfuss, A., Merk, O., Radermacher, P. and Speit, G. (2000) Evaluation of mutagenic effects of hyperbaric oxygen (HBO) *in vitro*. II. Induction of oxidative DNA damage and mutations in the mouse lymphoma assay. *Mutat Res* 471, 87-94.
 105. Sack, U., Rothe, G., Barlage, S., Gruber, R., Kabelitz, D., Kleine, T.O., Lun, A., Renz, H., Ruf, A., Schmitz, G. (2000) Durchflußzytometrie in der klinischen Diagnostik. *J Lab Med* 24, 277-297.
 106. Saito, K., Tanaka, Y., Ota, T., Eto, S. and Yamashita, U. (1991) Suppressive effect of hyperbaric oxygenation on immune responses of normal and autoimmune mice. *Clin Exp Immunol* 86, 322-7.
 107. Sawai, T., Niimi, A., Takahashi, H. and Ueda, M. (1996) Histologic study of the effect of hyperbaric oxygen therapy on autogenous free bone grafts. *J Oral Maxillofac Surg* 54, 975-81.
 108. Scheid, P. (1994) Physik der Gase. In: Klinker, R., Silbernagel, S. (Ed) *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme, Stuttgart, p. 216.
 109. Shepard, R.J. (1997) *Physical activity, training, and the immune response*. Carmel, Cooper Publications Group.
 110. Siddiqui, A., Galiano, R.D., Connors, D., Gruskin, E., Wu, L. and Mustoe, T.A. (1996) Differential effects of oxygen on human dermal fibroblasts: Acute versus chronic hypoxia. *Wound Repair Regen* 4, 211-8.
 111. Smith, G., Ledingham, I.M., Sharp, G.R., Norman, J.N., Bates, E.H. (1962) Treatment of coal-gas poisoning with oxygen at 2 atmospheres pressure. *Lancet* 1, 816-9.
 112. Smith, K.A. (1988) The interleukin 2 receptor. *Adv Immunol* 42, 165-79.
 113. Staines, N., Brostoff, J., James, K. (1999) *Immunologisches Grundwissen*. 3.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.
 114. Stewart, C.C. (2000) Multiparameter flow cytometry. *J Immunoassay* 21, 255-72.
 115. Taniguchi, T., Minami, Y. (1993) The IL-2/IL-2 Receptor System: A current overview. *Cell* 73, 5-8.
 116. Tibbles, P.M. and Edelsberg, J.S. (1996) Hyperbaric-oxygen therapy. *N Engl J Med* 334, 1642-8.
 117. Tipler, P.A. (1994) *Physik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
 118. Tollerud, D.J., Clark, J.W., Morris Brown, L., Neuland, C.Y., Pankiw-Trost, L.K., Blattner, W.A., Hoover, R.N. (1989) The influence of age, race and gender on

- peripheral blood mononuclear-cell subsets in healthy nonsmokers. *J Clin Immunol* 9, 214-222
119. Tonndorf, J. (1980) Acute cochlear disorders: the combination of hearing loss, recruitment, poor speech discrimination, and tinnitus. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89, 353-8.
 120. Tremellen, K.P., Williamson, J.A., Frewin, D.B., Russel, W.J. (1993) Plasma catecholamine levels during exposure to an environment of hyperbaric oxygen. *Clin Auton Res.* 3 (2), 91-3.
 121. Undersea and Hyperbaric Medical Society. (1992) Hyperbaric oxygen therapy: A committee report. Bethesda: Undersea and Hyperbaric Medical Society.
 122. Undersea Medical Society (1977) Report of the Committee on Hyperbaric Oxygenation. Bethesda: Undersea Medical Society (UMS).
 123. Van Unnik, A.J.M. (1965) Inhibition of toxin production in *Clostridium perfringens* in vitro by hyperbaric oxygen. *Antonie von Leeuwenhoek* 31, 181-186.
 124. Watts, C. (2004) The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat Immunol* 5, 685-92.
 125. Weaver, J.L. (2000) Introduction to flow cytometry. *Methods* 21, 199-201.
 126. Weksler, M.E. (1980) The immun system and the aging process in man. *Proc Soc Exp Biol Med* 165: 200-205.
 127. Weisz, G., Lavy, A., Adir, Y., Melamed, Y., Rubin, D., Eidelman, S. and Pollack, S. (1997) Modification of *in vivo* and *in vitro* TNF-alpha, IL-1, and IL-6 secretion by circulating monocytes during hyperbaric oxygen treatment in patients with perianal Crohn's disease. *J Clin Immunol* 17, 154-9.
 128. Welslau, W. and Almeling, M. (1996) Toxicity of hyperbaric oxygen (HBO)--incidence of major CNS-intoxications. *Strahlenther Onkol* 172 Suppl 2, 10-2.
 129. Welslau, W., Tirpitz, D. (1997) Anerkannte HBO-Indikationen: HBO-Indikationsliste der Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin e.V. *Caisson, Mitteilungen der Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin e.V.* 11, 23-24.
 130. Williams, J., Lewis, R.W., 2nd and Kealey, G.P. (1992) Carbon monoxide poisoning and myocardial ischemia in patients with burns. *J Burn Care Rehabil* 13, 210-3.
 131. Won, W.D., Ross, H.C. (1975) Catecholamine and phagocytic responses in infected mice exposed to hyperbaric helium-oxygen atmospheres. *Aviat Space Environ Med* 46, 191-3.
 132. Wood, J.D. (1980) GABA and oxygen toxicity: A review. *Brain Res Bull* 5, 777-780.
 133. Xu, X., Yi, H., Kato, M., Suzuki, H., Kobayashi, S., Takahashi, H. and Nakashima, I. (1997) Differential sensitivities to hyperbaric oxygen of lymphocyte subpopulations of normal and autoimmune mice. *Immunol Lett* 59, 79-84.

134. Yamane, H., Nakai, Y., Konishi, K., Sakamoto, H., Matsuda, Y. and Iguchi, H. (1991) Strial circulation impairment due to acoustic trauma. *Acta Otolaryngol* 111, 85-93.
135. Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P.G. and van Ree, R. (2002) Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 296, 490-4.
136. Yewdell, J.W., Reits, E. and Neefjes, J. (2003) Making sense of mass destruction: Quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3, 952-61.

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. E. Kochs als Direktor der Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München am Klinikum rechts der Isar bedanken, an dessen Klinik ich meine Doktorarbeit erstellen durfte.

Mein aufrichtiger Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. R. Hipp als meinen Doktorvater für die Bereitstellung des Themas und seine vorbildliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. med. L. Mielke danke ich herzlich für die umfassende Betreuung dieser Arbeit. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite, motivierte mich und hatte immer ein offenes Ohr für meine Anliegen.

Herrn Dr. med. P. Schleicher, dem Leiter des Immunbiologischen Labors Zytognost München und seinen Mitarbeitern gilt mein besonderer Dank für die freundliche Hilfestellung bei der durchflusszytometrischen Analyse der Proben.

Ein herzliches Dankeschön auch an Frau R. Busch vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München für die freundliche und prompte Beratung bei allen statistischen Fragestellungen.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. med. M. Stark, dem Leiter des Immunzytologischen Labors im Klinikum München-Schwabing für den regen Gedankenaustausch und die nützlichen Ratschläge bei der Bewertung der immunologischen Ergebnisse.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Ralph Detlef Pildner von Steinburg
Geburtsdatum	27.11.1970
Geburtsort	München
Familienstand	verheiratet

Schul Ausbildung

1977 – 1981	Volksschule Riemerling
1981 – 1990	Gymnasium Ottobrunn
	Abitur am 29.05.1990

Wehrdienst

1990 – 1991	Sanitäter der Luftwaffe, Bundeswehrkrankenhaus München, Sanitätsstaffel Fliegerhorst Erding
-------------	--

Studium

1991 – 1998	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität München
	1. Staatsexamen am 23.03.1995
	2. Staatsexamen am 21.03.1997
	3. Staatsexamen am 14.05.1998

Beruf

1998 – 2000	Arzt im Praktikum, I. Medizinische Abteilung, Krankenhaus III. Orden, München-Nymphenburg
29.02.2000	Approbation als Arzt
2000 - 2009	Assistenzarzt in der I. Medizinische Abteilung, Krankenhaus III. Orden
22.05.2005	Facharzt für Innere Medizin
Seit 2010	Hausärztlicher Internist in München