Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Chirurgie
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Prof. Dr. Ingo Marzi

**Vergleichende Analyse der Dynamik regulatorischer T-Zellen im
peripheren Blut bei Polytrauma am Menschen sowie am Schwein**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Rafael Felix Serve
aus New York City, USA

Frankfurt am Main, 2020

Dekan: Herr Prof. Dr. Stefan Zeuzem

Referentin: Frau Prof. Dr. Borna Relja

Korreferent: Herr Prof. Dr. Erhard Seifried

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2021

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassungen	4
1.1.	Zusammenfassung in englischer Sprache	4
1.2.	Zusammenfassung in deutscher Sprache	6
2.	Abkürzungsverzeichnis	10
3.	Übergreifende Zusammenfassung	11
3.1	Einleitung	11
3.2	Methodik	18
3.3	Ergebnisse	23
3.4	Diskussion der Gesamtergebnisse sowie deren Beitrag zur Beantwortung der Fragestellung	31
4	Publikation.....	46
4.1	Zur Veröffentlichung angenommene Publikationen.....	46
4.2	Darstellung des Anteils an der eigenen Publikation	46
4.3	Publikation <i>Comparative Analysis of the Regulatory T cells Dynamics in Peripheral Blood in human and Porcine Polytrauma</i>	48
5	Lebenslauf	61
6	Schriftliche Erklärung	63
7	Danksagung.....	64
8	Literaturverzeichnis der übergreifenden Zusammenfassung	65

1. Zusammenfassungen

1.1. Zusammenfassung in englischer Sprache

With more than 5 million casualties annually, traumatic injuries constitute a major challenge to modern medical care. They are the sixth leading cause of death worldwide and the leading cause of death and disability in patients under 45. Severely injured patients experience substantial immunological stress in the aftermath of traumatic insult, which often results in systemic immune dysregulation. A hyperinflammatory trauma-associated immune response exceeds local repair mechanisms and even constricts the immunological defence at the site of trauma. This *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) takes place within minutes to hours after trauma. Hence, organ systems which were not primarily injured are often affected by a compromised endothelial barrier, disturbed microcirculation, interstitial oedema, tissue infiltration with leukocytes, and cell death, which results in so-called remote organ injury, dysfunction, and/or failure. Simultaneously, anti-inflammatory processes after trauma can lead to severe immunosuppression, making patients susceptible to infectious complications. The suppressive immune mechanisms in this situation are summed up under the term *compensatory anti-inflammatory response syndrome* (CARS). Hyperinflammation and/or immunosuppression possibly result in multiple organ dysfunction syndrome (MODS) and failure (MOV) or potentially lethal nosocomial infections. Thus, systemic immune dysregulation accounts for a high percentage of trauma-associated mortality.

Our understanding of basic immune mechanisms in SIRS has much improved over the last decades, leading to a significant advancement in the clinical management of hyperinflammation and MOV. However, CARS is much less well understood. It is known that cells of both the innate and the adaptive immune response are involved in immunosuppression during CARS. Regulatory T cells (Treg) play a significant role regarding the posttraumatic balance of immune responses. They are able to alter and suppress innate and adaptive immune responses due to their ability to modulate and kill target cells, such as antigen-presenting cells and effector T cells, and to influence inflammatory cytokine environments and metabolic pathways. The uncontrolled activation of Treg can thus lead to systemic immune

suppression, which may in turn lead to complications such as sepsis. Still, little is known about the presence and dynamics of Treg after trauma.

In this study, we therefore aimed for a better understanding of Treg behaviour after trauma. We analysed the dynamics of different subsets of Treg in the blood of severely injured patients. *In vivo* experiments in human trauma research quickly reach their ethical and methodical boundaries. Thus, we additionally aimed for a comparison of human results with data from an adequate animal model. Porcine models are of increasing popularity due to their distinct physiological, anatomical, and genetic comparability toward humans and the comparably high degree of characterisation of the porcine immune system. The porcine polytrauma model has only been introduced in recent years. So far, no studies investigated Treg in this model. A characterization of Treg immune phenotype and dynamics in this model may strengthen its applicability and contribute to a better understanding of the pathophysiology of post-traumatic complications, e.g. SIRS and/or sepsis.

Peripheral blood was withdrawn from 20 trauma patients (TP) with injury severity score (ISS) ≥ 16 at the admittance to the emergency department (ED), and on day 1 and day 3 after admittance. Ten healthy volunteers (HV) were included as controls. The porcine polytrauma model consisted of a femur fracture, laceration of the liver, contusion of one lung, and haemorrhagic shock resulting in an ISS of 27. After polytrauma, the animals underwent resuscitation and surgical fracture fixation according to the damage-control-principle. Blood samples were withdrawn before and immediately after trauma, as well as 24 and 72 h later. We then compared blood kinetics of Treg of TP and compared those to both HV and data from porcine polytrauma. As no consensus has been reached yet, which specific set of markers will reliably identify Treg with cross-species validity in humans and mice, we analysed different subsets of Treg. Cluster of differentiation (CD) 4-positive and CD25-positive ($CD4^+CD25^+$), $CD4^+CD25^+$ forkhead box P3 ($FoxP3^+$), $CD4^+CD25^+CD127^-$ (CD127⁻), and $CD4^+CD25^+CD127^-FoxP3^+$ were stained with antibodies and characterized by flow cytometry. $CD4^+CD25^+CD127^-$ Treg are well-known in humans. This study characterizes them in pigs for the first time.

It became clear that the proportion of both $CD4^+$ cells and lymphocytes of all leukocytes were significantly lowered in peripheral blood samples after trauma.

While this effect persisted in polytraumatized patients, a recovery in percentage, but not in absolute cell counts as comparable to patients, has been observed in pigs at 72 hours after polytrauma. The proportion of $CD4^+$ lymphocytes of all lymphocytes was significantly reduced immediately after trauma and after 24 h in TP, while such reduction was observed during the complete observational time period in pigs after polytrauma. Here again, absolute cell counts were reduced in both patients and pigs during the complete observational period. With regard to Treg, a significant reduction of $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, and $CD4^+CD25^+CD127^-$ cells were detectable after polytrauma in both patients and animals. No significant changes occurred in the proportion of $CD127^-$ cells of $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ cells neither in humans nor in pigs.

This study reveals the dynamics of Treg in human blood after trauma. Over the course of a three-day experiment data regarding different Treg subsets was collected. We could show that early post-traumatic lymphocyte dynamics appear comparable between humans and pigs after polytrauma. Furthermore, the various Treg subsets, which are commonly used for Treg research, appear to have comparable immunophenotypes as well as dynamics between these two species. The porcine model for polytrauma thus seems promising regarding further research on Treg in the context of trauma.

1.2. Zusammenfassung in deutscher Sprache

Traumatische Verletzungen fordern jährlich über fünf Millionen Todesopfer. Sie sind bei unter 45-Jährigen die häufigste Ursache für Tod und körperliche Behinderung dar. Ein Polytrauma verursacht eine schwere Belastung für das Immunsystem und ist häufig von schweren Störungen der Immunregulation gekennzeichnet. Die Immunreaktion übersteigt bei schweren Traumata das für lokale Reparaturmechanismen notwendige Maß, und so kommt es je nach Ausmaß der Verletzungen innerhalb der ersten Minuten bis Stunden zu einer systemischen Hyperinflammation, dem sogenannten *Systemischen Inflammatorischen Response-Syndrom* (SIRS). Auch in nicht verletzten Organen verursacht SIRS Störungen in der Endothel-Funktion, wodurch die Mikrozirkulation in diesen Organen beeinträchtigt ist. In der Folge kommt es zu interstitieller Ödembildung, zur Gewebsinfiltration durch Leukozyten und zu Zelluntergang. Diese Prozesse können zur Fehlfunktion von Organen bis hin zum Organversagen, und, da sie häufig in

mehreren Organen gleichzeitig ablaufen, auch zum klinisch dann oft schwer beherrschbaren Multiorganversagen (MOV) führen. Auf der anderen Seite stoßen schwere Verletzungen antiinflammatorische Prozesse an, die zu einer ausgeprägten Immunsuppression führen können, dem *Kompensatorischen Antiinflammatorischen Response-Syndrom* (CARS), mit der Folge, dass polytraumatisierte Patienten erhöht anfällig für infektiöse Komplikationen sind. Die beschriebenen Funktionsstörungen des Immunsystems sind ein wichtiger Mortalitätsfaktor von polytraumatisierten Patienten. Während wir SIRS und seine Folgen über die letzten Jahre immer besser verstehen, mit signifikanten Fortschritten auch für die klinische Handhabung dieser Komplikationen des Polytraumas, ist CARS weit schlechter untersucht.

Während der post-traumatischen Immunantwort spielen nicht nur Zellen der angeborenen, sondern auch solche der erworbenen Immunabwehr eine wichtige Rolle. So sind regulatorische T-Zellen (Treg) entscheidend an der posttraumatischen Immunsuppression beteiligt. Treg beeinflussen die immunologische Homöostase mit einem Arsenal immunsuppressiver Werkzeuge. Sie töten oder beeinflussen beispielsweise antigenpräsentierende Zellen oder T-Effektorzellen und verändern das Zytokinmilieu und metabolische Signalwege. Nach einem Trauma kann eine überschießende Aktivität von Treg die immunologische Balance so beeinträchtigen, dass eine posttraumatische Immunsuppression entsteht oder intensiviert wird. Die hier vorgestellte Studie zielt daher dem besseren Verständnis der Dynamik von Treg nach einer stattgehabten traumatischen Verletzung. Dafür untersuchten wir die Verläufe verschiedener Subpopulationen von Treg im Blut schwer verletzter Patienten. Da der Forschung am Menschen *in vivo* enge ethische und methodologische Grenzen gesetzt sind, nehmen Tiermodelle in der Traumaforschung einen hohen Stellenwert ein. Daher verglichen wir die an Patienten erhobenen Daten über die posttraumatische Dynamik von Treg mit den Verläufen in einem adäquaten Tiermodell.

Aufgrund der guten anatomischen, physiologischen und genetischen Ähnlichkeit zum Menschen werden Tiermodelle am Schwein zunehmend beliebter. Ein Polytraumamodell am Schwein existiert erst seit wenigen Jahren. Über Treg wurde in diesem Rahmen bisher nicht geforscht. Die Charakterisierung ihres Immunphänotyps und ihrer Dynamik könnte die Anwendbarkeit des Schweine-

Modells für Fragen der Trauma-Forschung verbessern und gleichzeitig unser Verständnis der Pathophysiologie posttraumatischer Komplikationen wie SIRS oder Sepsis erhöhen.

Bei 20 Traumapatienten (TP) mit einem *Injury Severity Score* (ISS) ≥ 16 wurde bei Ankunft in der Notaufnahme, nach einem und nach drei Tagen venöses Blut entnommen. Zehn gesunde Freiwillige (HV) fungierten in der Studie als Kontrollgruppe. Das Polytrauma im Großtiermodell am Schwein bestand aus einer Femurfraktur, einer Leberlazeration, einer Lungenkontusion und einem hämorrhagischen Schock, was einen ISS von 27 ergab. Auf die Trauma-induktion folgte die Reanimationsphase und die chirurgische Versorgung der Femurfraktur nach dem *damage-control*-Prinzip. Die Blutentnahmen erfolgten bei den Versuchstieren vor und sofort nach Trauma, sowie nach 24 und 72 Stunden. Wir verglichen die Dynamik der Verläufe der Treg von TP mit denen von HV und mit Daten aus den Tierversuchen. Es herrscht noch kein wissenschaftlicher Konsens darüber, welche Kombination aus immunologischen Oberflächenmarkern die Identifikation von Treg zuverlässig gewährleisten kann. Dies liegt auch daran, dass Treg eine Gruppe verschiedener Unterpopulationen darstellen. Folglich analysierten wir verschiedene Kombinationen. Wir färbten *Cluster of differentiation* (CD) 4-positive und CD25-positive ($CD4^+CD25^+$), $CD4^+CD25^+$ forkhead box P3 (FoxP3) $^+$, $CD4^+CD25^+CD127$ -negative ($CD127^-$) und $CD4^+CD25^+CD127^-$ FoxP3 $^+$ Zellen mit Antikörpern und charakterisierten die jeweilige Gruppe mithilfe der Durchflusszytometrie. $CD4^+CD25^+CD127^-$ Treg sind beim Menschen bekannt. Beim Schwein werden sie in dieser Studie erstmalig beschrieben.

Die Anteile von $CD4^+$ Zellen beziehungsweise von Lymphozyten an allen Leukozyten waren im venösen Blut bei Patienten und Versuchstieren nach Trauma signifikant verringert. Während dieser Effekt bei Polytraumapatienten anhielt, fand bei den Versuchstieren nach 72 Stunden eine prozentuale Erholung statt. Die absoluten Zellzahlen hingegen blieben verringert. Unmittelbar nach Trauma sowie einen Tag nach Trauma zeigte sich auch der Anteil von $CD4^+$ Lymphozyten an allen Lymphozyten bei TP signifikant reduziert. Im Tierversuch bestand diese Verringerung über den gesamten Versuchszeitraum. Hier waren ebenfalls bei Patienten und Schweinen über den gesamten Beobachtungszeitraum die absoluten Zellzahlen verringert. Bei Untersuchung der posttraumatischen Treg-Dynamik

waren signifikante Verringerungen der Populationen $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ und $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen bei Menschen und Schweinen nach Polytrauma messbar. Weder beim Menschen noch beim Schwein zeigten sich signifikante Änderungen des Anteils der $CD127^-$ Zellen an $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen.

Diese Studie liefert eine Beschreibung der Dynamik verschiedener humaner Treg-Populationen im Blut über den Verlauf von 3 Tagen. Wir konnten außerdem zeigen, dass die frühe posttraumatische Reaktion von Lymphozyten in ihrer Dynamik im Menschen und im Schwein vergleichbar erscheint. Dabei weisen Treg-Subpopulationen beider Spezies vergleichbare Immunphänotypen und Verläufe auf. Es liegt deshalb nahe, dass sich das Großtiermodell am Schwein gut als Polytraumamodell für die Erforschung von Treg nach Trauma eignet.

2. Abkürzungsverzeichnis

ACL	Durchschnittliche absolute Leukozytenzahlen <i>Mean absolute cell count of leukocyte cells</i>
ADP	Adenosin-Diphosphat
AIS	<i>Abbreviated injury scale</i>
AMP	Adenosin-Monophosphat
APC	Antigenpräsentierende Zellen, <i>antigen-presenting cells</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
CARS	Kompensatorisches Antiinflammatorisches Response-Syndrom <i>Compensatory antiinflammatory response syndrome</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CLP	<i>Cecal ligation and puncture</i>
CLR	<i>C-type lectin receptor</i>
CMV	Cytomegalievirus
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DAMPs	<i>Damage associated molecular patterns</i>
ED	Notaufnahme, <i>emergency department</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie, <i>Flourescence-activated cell sorting</i>
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
GARP	<i>Glycoprotein A repetitions predominant</i>
HV	Gesunde Freiwillige, <i>healthy volunteers</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IL	Interleukin
ISS	<i>Injury Severity Score</i>
MODS	<i>Multiple organ dysfunction syndrome</i>
MOF	<i>multi organ failure</i>
MOV	Multiorganversagen
NK	natürliche Killerzellen, <i>natural killer cells</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
pTreg	peripher induzierte regulatorische T-Zellen
SEM	Standardfehler, <i>standard error of the mean</i>
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom <i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
TGFβ	<i>Transformation Growth Factor beta</i>
Th1	Typ1-T-Helferzellen, <i>type-1 T-helper-cells</i>
Th2	Typ2-T-Helferzellen, <i>type-2 T-helper-cells</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
TP	Traumapatienten, <i>trauma patients</i>
Treg	Regulatorische T-Zellen, <i>Regulatory T cells</i>
tTreg	Im Thymus induzierte regulatorische T-Zellen

3. Übergreifende Zusammenfassung

3.1 Einleitung

Mit weltweit mehr als fünf Millionen jährlichen Opfern stehen traumatische Verletzungen an sechster Stelle der führenden Todesursachen.[1, 2] Bei unter 45-jährigen stellen schwere Verletzungen die häufigste Todesursache und die häufigste Ursache körperlicher Behinderungen dar.[2, 3] Durch die demographische Entwicklung der Weltbevölkerung sind vermehrt auch Ältere betroffen.[4] Hier wird die Behandlung oft durch Komorbiditäten zusätzlich erschwert. 30-70% aller Tode durch schwere Verletzungen ereignen sich mit starken regionalen Unterschieden noch vor der Ankunft im Krankenhaus.[5-7] Ein Drittel der Todesfälle nach Aufnahme in eine Klinik tritt in den ersten sechs Stunden nach Trauma ein und in den ersten 24 Stunden erhöht sich dieser Anteil auf über die Hälfte.[7] Im Anschluss sinkt die frühe Mortalität bezogen auf die Gesamtheit der Patienten im Verlauf kontinuierlich.[7] Fasst man den einzelnen Patienten ins Auge, so sind Schwere, Art und Kombination von einzelnen Verletzungen entscheidende Faktoren im Hinblick auf die individuelle Mortalität.[8, 9] Die meisten vital bedrohlichen Verletzungen sind Schädel-Hirn-Traumata (SHT), während der traumatische massive Blutverlust, der durch verschiedenste Verletzungen und/oder deren Kombinationen auftreten kann, die am schnellsten zum Tode führende Diagnose darstellt.[7, 8] Durch signifikante Verbesserung der Akutversorgung in den vergangenen Jahren konnte die Mortalität in den ersten Stunden nach Trauma bereits deutlich gesenkt werden.[10] Die später auftretenden Herausforderungen in der Versorgung polytraumatisierter Patienten nehmen deshalb einen immer größeren Stellenwert ein, wobei hier die immunologischen Prozesse zum Tragen kommen.[11]

Durch den verletzungsbedingten Zelluntergang fallen immunologisch wirksame Mediatoren an. Zu diesen gehören eine Vielzahl verschiedener endogener Moleküle aus dem Nukleus, dem Zytosol, den Mitochondrien und dem Extrazellulärraum, sowie exogener Moleküle, die von Bakterien, Pilzen oder Viren stammen können.[12] Diese proinflammatorischen Mediatoren umfassen also sogenannte endogene *damage associated molecular patterns* (DAMPs) und/oder exogene *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). Innerhalb von Minuten bis Stunden können sie das angeborene Immunsystem lokal aktivieren. Über

Signalkaskaden und durch die Einschwemmung von PAMPs und DAMPs in die Blutbahn findet jedoch auch eine systemische Aktivierung des angeborenen Immunsystems statt.[12, 13] So kommt es zur Entstehung eines *systemischen inflammatorischen Response-Syndroms* (SIRS), das klinisch durch Hypo- oder Hyperthermie, Tachykardie, Tachypnoe sowie Leukozytopenie oder Leukozytose erfasst wird.[14] Von der durch PAMPs und DAMPs vermittelten Aktivierung betroffen sind zelluläre Anteile wie beispielsweise Neutrophile Granulozyten und Monozyten, aber auch humorale Anteile wie etwa das Komplement- oder das Gerinnungssystem.[15] Das SIRS stellt zunächst die physiologische Reaktion des Körpers auf das zugrundeliegende Trauma dar. Je nach Ausmaß eines Traumas können jedoch sehr große Mengen von DAMPs und PAMPs wirksam werden und zu einer unkontrollierten Entgleisung nachgeschalteter Mechanismen führen.[12] Dies wird in der Literatur teilweise als *cytokine storm* bezeichnet.[12] Die überschießende Immunreaktion kann in der Folge Organe kompromittieren, die primär nicht durch das Trauma betroffen waren. Ausgelöst durch immunstimulatorische Mediatoren und Gewebsinfiltration durch Leukozyten kommt es zu Störungen der endothelialen Barriere, gestörter Mikrozirkulation, interstitieller Ödembildung und kontrolliertem sowie unkontrolliertem Zelltod.,[9, 16, 17] Dies hat nicht selten ein sekundäres Organversagen zur Folge. Versagen daraufhin mehrere Organe gleichzeitig, so spricht man von einem MOV. Die Inzidenz schwankt dabei bei einem ISS > 15 je nach *Scoring*-System (Denver Post Injury Multiple Organ Failure Score, Sequential Organ Failure Assessment, Marshall Multiple Organ Dysfunction Score) zwischen 22.8 und 58.5%.[18] Damit stellt das MOV heute die wichtigste späte Todesursache nach Trauma dar.[19]

Wenn es gelingt, polytraumatisierte Patienten vor Organversagen oder MOV durch frühe posttraumatische Inflammation zu bewahren, schließt sich nicht selten eine Phase ausgeprägter Immunsuppression an, die durch nosokomiale Infektionen zum Tode führen kann.[20, 21] Bis vor einigen Jahren wurde SIRS als die erste Phase einer inadäquaten Immunreaktion angenommen, gefolgt von einer reaktiv überschießenden Immunsuppression, auch *kompensatorisches antiinflammatorisches Response-Syndrom* (CARS) genannt. Während im Rahmen eines SIRS maßgeblich die angeborene Immunantwort gestört wird, treten durch ein CARS Beeinträchtigungen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort auf.[15] Hierdurch kann aufkeimenden Infektionen nur inadäquat oder verspätet

begegnet werden.[22, 23] Immer mehr Studien widersprachen jedoch einer zeitlichen Trennung dieser beiden Phasen und zeichnen eher ein Bild von gleichzeitigem Auftreten von SIRS und CARS. Bei überschießender Inflammation früh nach Trauma wurden Defekte der angeborenen Immunantwort gefunden.[24] Umgekehrt konnte auch bei schwer kranken Patienten, die sich in einem immunsupprimierten Zustand befanden, eine überaktivierte systemische Inflammation nachgewiesen werden.[22] Inzwischen geht man deshalb davon aus, dass bereits in den ersten Minuten bis Stunden nach Trauma pro- sowie antiinflammatorische Kaskaden angestoßen werden und gleichzeitig ablaufen.[12, 13, 24] Die gestörte Balance beziehungsweise das starke Überwiegen einer Seite resultiert dann beispielsweise in MOF oder fulminanten Sepsisverläufen.[12] Die Therapie von Organversagen ist oft schwierig und meist nur supportiv möglich. Deshalb sind die Prävention und die frühe Erkennung von SIRS für das *Outcome* des Patienten sehr wichtig. Die Modulation der proinflammatorischen Reaktion ist heute schon Bestandteil von Therapiekonzepten im intensivmedizinischen Bereich.[25] In Bezug auf die posttraumatische Immunsuppression stellt sich die Situation anders dar. Die zellulären und molekularen Mechanismen der Immunsuppression nach Trauma sind weniger gut erforscht als die der Hyperinflammation. Prädiktive Risikofaktoren für posttraumatische Sepsis sind Gegenstand aktueller Forschung und ein erster klinischer prädiktiver *Score* wird erprobt, um das Risiko einer Sepsis nach Trauma abschätzen zu können.[26-29] Kausale therapeutische Ansätze sind aber bisher rar. Dafür reicht das Verständnis der Pathophysiologie der posttraumatischen Immunsuppression noch nicht aus. Dies hat die Erforschung der posttraumatischen (und im Rahmen von Sepsis auftretender) Immunsuppression in den letzten Jahren mehr in den Fokus gerückt.[20-22, 30] Wie bereits erwähnt sind während der posttraumatischen Immunsuppression neben der angeborenen Immunantwort auch Anteile der adaptiven Immunantwort gestört.[15, 22] Dies stellt für den Organismus eine besondere Behinderung bei der Bekämpfung aufkeimender Infektionen dar. Unter anderem sind Makrophagen in ihrer Funktion eingeschränkt, die Präsentation von Antigenen ist vermindert, T-Zellen zeigen verminderte Proliferations- und erhöhte Apoptoseraten sowie Einschränkungen in ihrer Funktionalität und die Immunantwort wird vermehrt durch Typ2-T-Helferzellen (Th2) anstatt von Typ1-T-Helferzellen (Th1) vermittelt.[15, 25]

Regulatorische T-Zellen (Treg) nehmen dahingehend eine Schlüsselrolle ein, da die genannten Beeinträchtigungen der Immunantwort auch durch sie vermittelt werden. Dies legt nahe, dass sie an der posttraumatischen Immundysregulation entscheidend beteiligt sind.[31] 1970 wurden von Gershon und Kondo erstmals T-Zellen beschrieben, die Immunreaktionen abschwächen und sich von T-Helferzellen unterscheiden.[32] Diese wurden damals als *suppressor T cells* bezeichnet.[33] Zu intensiver Forschung an Treg kam es dagegen erst einige Jahre später, als durch die Erforschung ihrer Rolle im Rahmen verschiedener Autoimmunkrankheiten deutlich wurde, dass sie durch Immunsuppression wesentlich zur Selbsttoleranz beitragen und inflammatorische Prozesse stark beeinflussen.[34, 35] Treg üben ihre immunsuppressive Wirkung über eine Reihe verschiedener Werkzeuge aus. Eine wichtige kostimulatorische Domäne auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (APC) ist CD80. Treg binden CD80 über das Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4) und regulieren damit seine Expression herunter.[36] Eine spezifische Immunantwort wird so gleich zu Beginn erschwert. Durch die Produktion von Granzym A und B sowie Perforin zwingen Treg Zielzellen wie beispielsweise T-Effektorzellen zur Apoptose.[37] Treg bauen über CD39 extrazelluläres Adenosin-Triphosphat (ATP), das proinflammatorische Wirkungen hat und die Proliferation von T-Zellen anregt, zu Adenosin-Diphosphat (ADP) und Adenosin-Monophosphat (AMP) um. ADP und AMP werden durch CD73, ebenfalls von Treg exprimiert, weiter zu antiinflammatorischem Adenosin verstoffwechselt.[31] Zusätzlich schütten Treg selbst antiinflammatorische Zytokine wie Transforming Growth Factor beta (TGFβ), Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-35 (IL-35) aus und begünstigen so zum Beispiel durch Th2 vermittelte Reaktionen oder induzieren Anergie bei verschiedenen Lymphozyten.[25, 30, 31, 38] Treg stellen also ein vielversprechendes Forschungsobjekt im Hinblick auf posttraumatische Immunsuppression dar.

Bisher wurde in der Literatur kein Konsens erreicht, wie diese Zellen standardisiert zu charakterisieren sind. Ein Grund hierfür ist, dass Treg keine homogene Gruppe bilden, sondern eine Mehrzahl von regulatorisch wirksamen T-Zellen unterschiedlicher Herkunft. So gibt es native Treg, die ihren Ursprung im Thymus haben (tTreg), aber auch induzierte Treg, die in der Peripherie aus anderen T-Zellpopulationen entstehen können (pTreg).[39] Neben zirkulierenden Treg werden auch gewebespezifische *tissue Treg* beschrieben, die lokal spezialisierte

Funktionen übernehmen und die je nach Ursprungsgewebe Unterschiede aufweisen.[40, 41] Außerdem zeigen auch andere Zellen, wie beispielsweise aktivierte T-Effektorzellen, zeitweise ein ähnliches Profil ($CD4^+CD25^+$) von Oberflächenantigenen wie Treg.[30] Seit 1995 werden Treg vor allem anhand von CD4 und CD25, der α -Kette des IL-2-Rezeptors charakterisiert.[33] Die erhöhte Aktivität von $CD4^+CD25^+$ Treg bei schwer verletzten Patienten wurde erstmals von MacConmara *et al.* beschrieben.[42] Seit der Entdeckung der Treg-spezifischen und dauerhaften Expression des Transkriptionsfaktors forkhead box protein 3 (FoxP3) wird dieser ebenfalls oft zur Charakterisierung von Treg genutzt.[31, 43, 44] Die Kombination aus CD4, CD25 und FoxP3 wurde in der immunologischen Traumaforschung in Tiermodellen wie auch Untersuchungen an menschlichen Proben verwendet.[45, 46] Weiterhin wird nach zusätzlichen Markern geforscht, mit denen Treg zuverlässig charakterisiert werden können. So wurden unter anderen CD127[47], CTLA-4[48] und Glycoprotein A repetitions predominant (GARP)[49] als vielversprechende Kandidaten ins Spiel gebracht.

Zhang *et al.* konnten einen erhöhten Anteil von $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ Treg an allen Lymphozyten in den ersten drei Wochen nach Thoraxtrauma nachweisen.[50] Welche Dynamik Treg und speziell verschiedene Subpopulationen von Treg nach schwerem Trauma aufweisen ist aber weitgehend unerforscht und auf die aktuelle Studienlage dazu wird in der Diskussion näher eingegangen. Dies liegt mitunter daran, dass noch weitgehend unklar ist, welche Untergruppen von nativen und induzierten Tregs es gibt, welches Maß an Plastizität sie besitzen und welche Funktionen die einzelnen Gruppen voneinander unterscheiden.[51] In unserer Studie nutzten wir CD4, CD25, FoxP3 und/oder CD127 zur Charakterisierung des jeweiligen Immunphänotyps und der Dynamik von Treg nach Polytrauma bei Patienten und im Großtiermodell am Schwein.

In der Versorgung von posttraumatischen Komplikationen werden prognoseverbessernde Fortschritte erzielt und mit Immunsuppression assoziierte Komplikationen wie zum Beispiel Sepsis sind dank der modernen Intensivmedizin immer besser beherrschbar. Wie zuvor bereits erwähnt fehlen jedoch diagnostische Mittel, um diese Komplikationen zuverlässig vorherzusagen und so schon früh zu antizipieren.[14] Um diagnostische Biomarker oder therapeutische Ansätze zu identifizieren, ist ein grundlegendes Verständnis der immunologischen Pathomechanismen unumgänglich und in der Literatur vielfach gefordert.[14, 16,

52, 53] Die Forschung mithilfe von Mausmodellen hat zu weitreichenden Fortschritten in der biomedizinischen Wissenschaft und zur Entwicklung wichtiger Krankheits- und Therapiemodelle *in vivo* geführt und wird auch in Zukunft einen wichtigen Stellenwert behalten.[54] Meist werden hierfür kleine Ausschnitte des Organismus untersucht, wobei der in der Gesamtheit betrachtete Unterschied zwischen Mensch und Maus oft vernachlässigbar ist oder vernachlässigt wird. Ob eine so vielschichtige und den gesamten Organismus umfassende Situation wie die systemische Inflammation nach Polytrauma im Mausmodell adäquat wiedergespiegelt werden kann, wird jedoch stark bezweifelt.[55-58] Inkonsistenzen zwischen dem Immunsystem der Maus und dem des Menschen bestehen in wichtigen Bereichen, wobei hier insbesondere die Unterschiede in Immungenetik und -funktionen hervorzuheben sind. So finden sich abweichende Leukozytensubpopulationen und -funktionsweisen, sowie anders angelegte Zytokinkaskaden.[56, 59] Folglich wird der Einsatz von Mausmodellen kritisiert, vor allem zur Erforschung von menschlichen entzündlichen Erkrankungen, Trauma und verschiedenen Arten der Wundheilung.[57, 60] Traumamodelle wurden auch mithilfe anderer Spezies erprobt, darunter Schafe[61], Hunde[62] und Primaten[63] Insbesondere bei Hunden und Primaten sind dabei ethische Bedenken besonders zu berücksichtigen. Als relevanteste Spezies zur Erforschung komplexer immunologischer Zusammenhänge werden neben Mäusen und Ratten vor allem Schweine angesehen.[64] Modelle am Schwein, zumeist durchgeführt am Hausschwein (*Sus scrofa domesticus*), etablieren sich den letzten Jahren zunehmend und nicht nur im Bereich der Traumaforschung. Durch die deutlichen anatomischen und physiologischen Ähnlichkeiten zwischen Schwein und Mensch lassen sich einige Ergebnisse nicht nur besser übertragen, auch am Menschen erprobte Prozeduren lassen sich am Schwein leichter anwenden. Zusätzlich erlaubt die Größe der Tiere eine wesentlich ergiebigere Probengewinnung.[60, 65, 66] Nach dem Immunsystem von Mäusen und Primaten ist das von Schweinen außerdem das am detailliertesten beschriebene.[59] Ein Polytraumamodell am Schwein hat also großes Potential das Verständnis der posttraumatischen Immunreaktion beziehungsweise von SIRS und CARS voranzubringen. Die Anwendbarkeit eines solchen Modelles gilt es zu verifizieren. Deshalb haben wir in dieser Studie die Dynamik der aktuell definierten humanen Treg-Subtypen zwischen Patienten und Schweinen nach Polytrauma im peripheren Blut

beschrieben und miteinander verglichen.

3.2 Methodik

Ethische Aspekte

Die an dieser Studie beteiligten Patienten und Probanden wurden am Universitätsklinikum der Goethe-Universität Frankfurt rekrutiert. Die Zustimmung zur Teilnahme an der Studie aller erfolgte persönlich beziehungsweise durch deren gesetzmäßige Betreuer gemäß dem Ethikantrag (312/10) im Sinne der Erklärung von Helsinki und den „Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology“ (STROBE)-Richtlinien.[67]

Die Genehmigung der Tierversuche nach den vorgelegten Protokollen erfolgte durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Recklinghausen, Germany, AZ: 84.02.04.2014A265. Die Tierexperimente wurden im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und unter Berücksichtigung des größtmöglichen Schutzes der Versuchstiere durchgeführt. Sie fanden im Institut für Versuchstierkunde und experimentelle Chirurgie der Universität RWTH Aachen statt. Institutionelle Richtlinien wurden wie in “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (Eighth Edition The National Academies Press, 2011) befolgt.[68] Alle Tiere wurden im Einklang mit den “ARRIVE”-Richtlinien behandelt.[69]

Auswahl von Patienten und Probanden

Zwanzig Polytraumapatienten mit einem $ISS \geq 16$ wurden in die Studie eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren Alter (jünger als 18 oder älter als 80 Jahre), Vordiagnosen der Probanden (akuter Myokardinfarkt, Krebs, eine Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), infektiöse Hepatitis, eine akute Cytomegalievirusinfektion (CMV) und/oder Thromboembolien), sowie eine aktuell stattfindende Chemo- oder immunsuppressive Therapie. Bei der Ankunft in der Notaufnahme wurden die Vitalparameter erfasst und der ISS anhand der *abbreviated injury scale* (AIS) von 2008 berechnet.[70, 71] Als Kontrollgruppe wurden 10 gesunde Freiwillige in die Studie aufgenommen. Die Gruppengröße betrug insgesamt $n = 30$.

Auswahl und Vorbereitung der Versuchstiere

Zehn Schweine der Rasse *Sus scrofa* mit einem Alter von drei Monaten und einem Gewicht von 30 ± 5 kg wurden für die hier beschriebenen Experimente von einer *disease-free barrier breeding facility* bereitgestellt und 7 Tage zur Akklimatisierung in belüfteten Räumen gehalten. Vor Versuchsbeginn untersuchte ein Veterinärmediziner alle Tiere. Außerdem hatten sie freien Zugang zu Wasser und wurden über Nacht nüchtern gehalten. Auf der Grundlage der ethischen Prinzipien der 3Rs (Replacement, Refinement, and Reduction) sind die hier präsentierten Daten im Rahmen einer von Horst *et al.* beschriebenen größeren Studie der TREAT Aachen erhoben worden.[72] Die Gruppengröße betrug insgesamt $n = 10$.

Instrumenteller Aufbau und Anästhesie im Tierexperiment

Die Versuchstiere wurden mit einer intramuskulären Applikation von Azaperone (4 mg/kg, StresniTM, Janssen) prämediziert. Die Anästhesie wurde intravenös mit einem Bolus Propofol (3 mg/kg) induziert und mit einer durchgehenden Infusion von Propofol und Sufentanil für die gesamte Dauer des experimentellen Beobachtungszeitraumes aufrechterhalten. Die Tiere wurden nach Beginn der Anästhesie orotracheal intubiert (7.5 ch Tubus, Hi-Lo LanzTM) und lungenprotektiv im volumenkontrollierten Modus (Draeger, Evita, Lübeck, Germany) beatmet (Atemzugvolumen von 6–8 ml/kg/KG; inspiratorische Sauerstofffraktion von (FiO₂) 0,5; positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 8 mm Hg (Plateaudruck < 28 mm Hg); Anpassungen erfolgten nach einem expiratorischen Ziel-pCO₂ von 35–45 mm Hg).[72] Ein steriles Einbringen von Kathetern erfolgte in die *Vena jugularis externa* zwecks Volumenapplikation, Anästhesie und Überwachung des zentralen Venendruckes (ZVD, Zentralvenöser 4-Lumen-Katheter, 8.5 Fr., ArrowCatheter, Teleflex Medical, Germany), in die rechte *Vena femoralis* zwecks Induktion hämorrhagischen Schocks (3-Lumen-Hämodialysekatheter, 12.0 Fr., ArrowCatheter, Teleflex Medical, Germany) und in die rechte *Arteria femoralis* zwecks kontinuierlicher Blutdrucküberwachung (4.0 Fr. intraarterieller Katheter, Vygon, Germany). Die Katheterisierung der Harnblase erfolgte suprapubisch (12.0 Fr, Cystofix, Braun, Melsungen, Germany). Volumen wurde kontinuierlich mit kristalloiden Lösungen (Sterofundin ISO[®], 2 ml/kg/h)

substituiert. Die Referenzwerte wurden nach erfolgreicher Instrumentierung und Kalibrierung und vor Beginn der experimentellen Phase erhoben.

Induktion des Polytraumas im Tierexperiment

Das induzierte Polytrauma bestand aus einer offenen Femurfraktur, einer einseitigen Thoraxkontusion und einer Leberlazeration, kombiniert mit einem kontrolliert herbeigeführten hämorrhagischen Schock. Dafür wurden die Versuchstiere zunächst in Rechtsseitenlage gelagert. Über einen Hautschnitt wurde ein offener Zugang zum Femur geschaffen. Die Femurfraktur wurde durch einen gezielten Bolzenschuss auf einen direkt dem Femur aufliegendem Metallstempel am rechten Hinterlauf verursacht (Blitz-Kerner, turbocut JOBB GmbH, Germany, 9 × 17, Dynamit Nobel AG, Troisdorf). Nach anschließender Lagerung in Rückenlage wurde die Thoraxkontusion mithilfe eines Bolzenschusses auf eine dem Thorax aufliegende Metallplatte erzeugt. Eine darauffolgende Mittellinienlaparotomie ermöglichte den Zugang zur Leber, wo am kaudalen Leberlappen eine kreuzförmige Inzision von 4,5 cm × 4,5 cm vorgenommen wurde. Dies resultierte in einer Blutung, die für 30 Sekunden unkontrolliert stattfand und anschließend gestillt wurde, indem die Leber mit sterilen Kompressen 10 cm × 10 cm umhüllt wurde. Der hämorrhagische Schock wurde durch Blutentnahme an der rechten *Arteria femoralis* bis zu einem mittleren arteriellen Blutdruck von 40 ± 5 mm Hg erreicht und für 90 Minuten aufrechterhalten. Während dieser Schockphase erreichten die Versuchstiere eine Hypothermie.

Am Ende der Polytraumaphase folgte die Reanimation der Versuchstiere im Einklang mit etablierten Richtlinien.[73, 74] Hier wurden die Rückkehr zur dem Ausgangswert entsprechenden FiO₂ und Reinfusion des entnommenen Blutes sowie Volumensubstitution mit zusätzlichen Kristalloiden (Sterofundin ISO®, 2 ml/kg/h) berücksichtigt.[75, 76] Die Tiere wurden mithilfe eines Warmluftsystems wieder einer Normothermie (38,7-39,8°C) zugeführt.[75] Die offene Femurfraktur wurde anschließend nach etablierten Traumarichtlinien chirurgisch versorgt.[74] Dies geschah nach dem *damage-control*-Prinzip mit einem *Fixateur externe*. Die intensivmedizinische Therapie und Therapie der Komplikationen fand nach standardisierten Vorgehensweisen der neusten Empfehlungen des European Resuscitation Council and Advanced Trauma Life Support statt.[73] Nach einem Beobachtungszeitraum von 72 Stunden wurden die Versuchstiere in Anästhesie

durch eine Kaliumchloridinjektion euthanasiert.

Gewinnung der Blutproben

Alle Blutproben wurden mithilfe vorgekühlter Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) entnommen. Bei Polytraumapatienten wurde Blut sofort nach ihrer Ankunft in der Notaufnahme aus einer peripheren Vene und dann ebenfalls nach 24 beziehungsweise 72 Stunden zumeist aus zentralen Venenkathetern in EDTA-Röhrchen abgenommen. Im Tierexperiment erfolgten die Blutentnahmen vor der Induktion des Polytraumas (ctrl), unmittelbar danach (AT) und außerdem nach 24 (D1) und nach 72 Stunden (D3) aus einem zentralen Venenkatheter. Die Proben wurden bis zur durchflusszytometrischen Färbung gekühlt. Blutbilder wurden mit einem automatischen Sysmex XE-2100-Blutzellzähler angefertigt (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt) und sind als „mean absolute cell count of leukocyte cells (ACL)“ angegeben.

Färbung und Messung der Oberflächenrezeptoren mittels

Durchflusszytometrie

Von den humanen Blutproben wurden 10 µl in FACS Polystyrolröhrchen (BD Pharmingen™) gefüllt. Diese wurden mit 5 µl *mouse anti-human* CD4 Brilliant Violet 421 (Clone RPA-T4), *mouse anti-human* CD25 APC-Cy7 (Clone BC96) und *mouse anti-human* CD127 PerCP-Cy5.5 (Clone HIL-7R-M21, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) Antikörpern für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die von den Versuchstieren gewonnenen Blutproben wurden nach demselben Protokoll, aber mit anderen Antikörpern behandelt. Folgende Antikörper wurden hier benutzt: *mouse anti-pig* CD4a Alexa Fluor® 647 (Clone 74-12-4, BD), *mouse anti-pig* CD25 (Mx405-konjugiert) (Clone K231.3B2, Bio-Rad Antibodies, zuvor bekannt als AbD Serotec, Hercules, CA, USA), und *polyclonal* anti-IL7R FITC (CD127, antikoerper-online GmbH, Aachen).

Nach der beschriebenen Inkubation wurden 2 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) hinzugefügt und die Proben 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Nach Entfernung der Überstände folgte eine Inkubation mit 100 µl Fix & Perm Solution A (FIX&PERM Kit, An Der Grub) für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einer anschließenden Zentrifugation für 5 Minuten bei 400 g mit 2 ml hinzugefügtem

PBS wurden die Überstände erneut entfernt und die Proben mit 100 µl Fix & Perm Solution B und 5 µl Antikörperlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dies geschah mit *monoclonal* FoxP3 PE-Cy7 (Clone PCH101) bei den menschlichen Proben und *monoclonal* FoxP3 PE-Cyanine7 (Clone FJK-16s, Affymetrix eBiosciences, Santa Clara, CA, USA) bei den aus Schweinen gewonnenen Proben. Die Proben wurden dann mit 2 ml FACS Lysing Solution (BD Pharmingen™) weitere 10 Minuten inkubiert und erneut bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Es folgten die Entfernung der Überstände, eine Resuspension in 4 ml PBS mit 0,5% Albumin aus Kälberserum (*Flourescence-activated cell sorting*(FACS)-Puffer) und eine weitere Zentrifugation für 5 Minuten bei 400 g. Nach Entfernung der Überstände wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer in Lösung gebracht und in einem BD FACS Canto 2™ mit der FACD DIVA™ Software (BD) durchflusszytometrisch analysiert. Jede Zellpopulation wurde in dem korrespondierenden Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht definiert. Die genaue *Gating*-Strategie ist in den jeweiligen Abbildungen dargestellt.

Statistische Analysen

Zur statistischen Auswertung wurde die Statistiksoftware GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA) genutzt. Für die Beurteilung der Teststärke wurde mit einem Alpha von 0,05 gearbeitet und eine Teststärke von 0,8 für zweiseitige Tests definiert. Mittelwert und Standardfehler wurden dabei in Prozent der entsprechenden Elternpopulation angegeben. Die Normalverteilung wurde mittels D'Agostino-Pearson-Test bestimmt. Es wurden entweder ein Mann-Whitney-*U*-Test oder ein statistischer Paarvergleich im Rahmen eines Friedman-Tests mit anschließendem Dunn-Post-Hoc-Test durchgeführt, um Differenzen zwischen den Gruppen zu vergleichen. Bei einem *p*-Wert von unter 0,05 wurde statistische Signifikanz angegeben.

3.3 Ergebnisse

Patienten

20 Polytraumapatienten (TP) und 10 gesunde Freiwillige (HV) wurden in die Studie eingeschlossen. Die Mehrheit der Probanden war männlich (TP: 75%, HV: 70%). Das durchschnittliche Alter betrug $39,0 \pm 3,5$ bei TP vs. $35,8 \pm 4,0$ bei HV. Alle Patienten erlitten ein schweres Trauma mit einem mittleren ISS von $30,5 \pm 1,8$. Bei 40% der Patienten handelte es sich um Verletzungen durch einen Sturz. Bei 40% lag ein den Kopf betreffender AIS ≥ 3 und bei 55% ein auf den Thorax bezogener AIS ≥ 3 vor. 30% der Patienten wiesen schwere Verletzungen der Extremitäten auf. Nur bei einem Patienten fand sich ein das Abdomen betreffender AIS ≥ 3 . Die durchschnittliche Liegezeit auf Intensivstation betrug $10,8 \pm 4,2$ Tage. Der durchschnittliche Krankenhausaufenthalt dauerte $24,7 \pm 5,7$ Tage. Wie in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, repräsentieren die in diese Studie integrierten Patienten die Hauptgruppe von TP mit schwerem Trauma.[77, 78]

Leukozyten

Die absoluten Leukozytenzahlen waren bei TP nach Trauma im Vergleich zu HV signifikant erhöht ($12,4 \pm 1,2$ vs. $7,2 \pm 0,9$ Zellen $\times 10^3/\mu\text{l}$, $p < 0,05$). Nach 24 Stunden und 3 Tagen sanken die Leukozytenzahlen wieder auf Werte innerhalb des Referenzbereichs (Abbildung 1).

Im Vergleich zum jeweils zu Beginn der Experimente abgenommenen Kontrollwert (ctrl) stiegen die Leukozytenzahlen im Tierexperiment nach Trauma signifikant an ($p < 0,05$). An Tag 1 (D1) und Tag 3 (D3) nach Trauma sanken die Zahlen wieder. Diese Verringerung war an D3 verglichen mit ctrl signifikant (AT: $24,2 \pm 2,3$ und D3: $11,9 \pm 1,3$ vs. $16,7 \pm 2,3$ Zellen $\times 10^3/\mu\text{l}$, $p < 0,05$, Abbildung 1).

Abbildung 1: Mittelwerte und Standardfehler der absoluten Leukozytenzahlen im peripheren Blut von Mensch und Schwein nach Polytrauma. Als Kontrollen fungierten die absoluten Leukozytenzahlen aus dem peripheren Blut von gesunden Freiwilligen (HV) beziehungsweise Versuchstieren vor Beginn der Traumainduktion (ctrl).

Folgende Angaben gelten für alle Abbildungen: AT: unmittelbar nach Traumainduktion; D1: 24 Stunden nach Trauma; D3 72 Stunden nach Trauma; Polytraumapatienten: $n = 20$, HV: $n = 10$, Versuchstiere: $n = 10$; *: Signifikante Abweichung ($p < 0,05$) verglichen mit HV beziehungsweise ctrl.

CD4⁺ Zellen

Der prozentuale Anteil der CD4⁺ Zellen an allen Leukozyten war nach Trauma verglichen mit HV signifikant reduziert ($6,4 \pm 0,9\%$ vs. $16,5 \pm 1,4\%$, $p < 0,05$; ACL: 1181,1 vs. 792,5). Ein Minimum wurde bei TP nach 24 Stunden erreicht (D1: $4,3 \pm 0,6\%$, $p < 0,05$ vs. HV; ACL: 418,9 vs. 792,5). Am Ende des Beobachtungszeitraumes lag noch immer ein signifikanter Unterschied vor ($6,1 \pm 0,8\%$ vs. HV, $p < 0,05$, Abbildungen 2A und C; ACL: 567,6 vs. 792,5).

Verglichen mit ctrl zeigte sich auch bei den Tierexperimenten nach 24 Stunden eine signifikante Reduktion des Anteils von CD4⁺ Zellen an allen Leukozyten (AT: $7,3 \pm 0,6\%$ und D1: $10,1 \pm 1,3\%$ vs. $14,4 \pm 1,1\%$, $p < 0,05$; ACL: 2413,4 vs. 1773,4 und 1430,4). Bei D3 war jedoch kein signifikanter Unterschied zu ctrl mehr zu erkennen (Abbildungen 2B, C). Die mittlere absolute Zellzahl blieb bei D3 jedoch niedriger (ACL: 1745,7).

Abbildung 2: Durchflusszytometrische Messung von CD4⁺ Zellen im peripheren Blut von Mensch und Schwein nach Polytrauma. **(A)** *Gating*-Strategie für von HV gewonnene Proben, die mit CD4-Antikörpern markiert wurden. **(B)** *Gating*-Strategie für Proben, die von Versuchstieren vor der Traumainduktion gewonnen und mit CD4-Antikörpern markiert wurden. **(C)** Mittelwerte und Standardfehler der Anteile CD4⁺ Zellen an allen Leukozyten in Prozent.

Lymphozyten

Der Lymphozytenanteil an Leukozyten verringerte sich bei TP posttraumatisch und verglichen mit HV signifikant ($16,3 \pm 2,2$ vs. $35,7 \pm 2,3\%$, $p < 0,05$; ACL: 2013,4 vs. 2556,5). Eine signifikante Verringerung bestand auch noch bei D1 und D3 ($10,2 \pm 1,8$ beziehungsweise $12,1 \pm 1,8\%$, vs. $35,7 \pm 2,3\%$, $p < 0,05$, Abbildungen 3A, B; ACL: 1006,6 und 1121,3 vs. 2,556,5).

Die Schweine wiesen unmittelbar nach Trauma und bei D1 verglichen mit ctrl ebenfalls eine signifikante Verringerung des Anteils der Lymphozyten an allen Leukozyten auf ($23,8 \pm 51,1$ beziehungsweise $35,52 \pm 4,8\%$, vs. $51,1 \pm 3,3\%$, $p < 0,05$, Abbildungen 3A, B; ACL: 5766,7 und 5015,4 vs. 8562,7). Bei D3 war der Anteil wieder auf ein mit ctrl vergleichbares Niveau gestiegen. Die mittlere absolute Zellzahl blieb jedoch bei D3 geringer (ACL: 6545,0).

CD4⁺ Lymphozyten

Während der Anteil der CD4⁺ Lymphozyten an allen Lymphozyten unmittelbar nach Trauma und bei D1 bei TP im Vergleich zu HV signifikant verringert war, ergab sich bei D3 kein signifikanter Unterschied mehr ($38,1 \pm 2,6$ beziehungsweise $35,8 \pm 3,1\%$, vs. $45,6 \pm 2,2\%$, $p < 0,05$; ACL: 766,5 und 360,2 vs. 1165,5). Die absolute Zellzahl war jedoch bei D3 noch immer geringer als bei HV (ACL: 523,6). Während des gesamten Beobachtungszeitraumes war der Anteil der CD4⁺ Lymphozyten an allen Lymphozyten im Vergleich zwischen polytraumatisierten Schweinen und ctrl signifikant reduziert (AT: $27,6 \pm 0,7\%$, D1: $26,4 \pm 0,9\%$, beziehungsweise D3: $25,9 \pm 0,7\%$, vs. $29,8 \pm 0,5\%$ in ctrl, $p < 0,05$, Abbildungen 3C, D; ACL: 2591,6, 1324,1 und 1693,8 vs. 2551,6).

Abbildung 3: Durchflusszytometrische Messung von Lymphozyten und CD4⁺ Zellen im peripheren Blut von Mensch und Schwein nach Polytrauma. **(A)** Gating-Strategie für Lymphozyten vor Trauma. **(B)** Mittelwerte und Standardfehler der Anteile von Lymphozyten an Leukozyten in Prozent. **(C)** Gating-Strategie für Proben von HV beziehungsweise ctrl, die mit CD4-Antikörpern markiert wurden. **(D)** Mittelwerte und Standardfehler der Anteile CD4⁺ Zellen an Lymphozyten in Prozent.

Verhältnis von CD4⁺CD25⁺ Treg zu CD4⁺ T-Zellen

Der Anteil CD4⁺CD25⁺ Zellen an CD4⁺ Zellen fiel nach Trauma signifikant ab und blieb bei D1 und D3 verglichen mit HV signifikant reduziert (AT: $5,7 \pm 0,9\%$, D1: $6,1 \pm 1,6\%$, beziehungsweise D3: $4,8 \pm 0,9\%$, vs. $10,53 \pm 2,1\%$ bei HV, $p < 0,05$, Abbildungen 4A–D, I; ACL: 43,5, 21,9, und 25,3 vs. 122,7).

Dieselbe Entwicklung fand sich bei den Versuchstieren an allen Messzeitpunkten verglichen mit ctrl (AT: $6,0 \pm 0,7\%$, D1: $4,6 \pm 1,1\%$, beziehungsweise D3: $3,5 \pm 0,8\%$, vs. $10,55 \pm 1,5\%$ bei ctrl, $p < 0,05$, Abbildungen 4E–H, I; ACL: 95,8, 61,5, und 59,8 vs. 269,2).

Abbildung 4: Prozentuale Anteile CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten im peripheren Blut. (A–D) *Gating*-Strategien für humane CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten. (E–H) *Gating*-Strategien für CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten beim Schwein. (I) Mittelwerte und Standardfehler der Anteile der CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten zu den verschiedenen Zeitpunkten in Prozent.

Verhältnis von CD25⁺FoxP3⁺ Treg zu CD4⁺ T-Zellen

Der Anteil von CD25⁺FoxP3⁺ Treg an CD4⁺ T-Zellen lag im gesamten Beobachtungszeitraum signifikant unter dem von HV (AT: $1,0 \pm 0,2\%$, D1: $1,5 \pm 0,6\%$, beziehungsweise D3: $0,9 \pm 0,2\%$, vs. $3,2 \pm 0,7\%$ bei HV, $p < 0,05$, Abbildungen 5A–E, K; ACL: 7,6, 5,4, und 4,9 vs. 38,9).

Auch bei den Schweinen zeigte sich verglichen mit ctrl eine Verringerung dieses Anteiles über alle Messpunkte (AT: $0,5 \pm 0,1\%$, D1: $0,6 \pm 0,2\%$ beziehungsweise D3: $0,6 \pm 0,3\%$, vs. $1,5 \pm 0,4\%$ bei ctrl, $p < 0,05$, Abbildungen 5F–J, K; ACL: 7,7, 7,9, und 10,2 vs. 37,9).

Abbildung 5: Prozentuale Anteile der $CD4^+FoxP3^+$ Lymphozyten an $CD4^+$ Lymphozyten im peripheren Blut. (A, F) *Gating*-Strategien für $CD4^+$ Lymphozyten bei Mensch und Schwein vor Trauma. (B-E) *Gating*-Strategien für humane $CD4^+FoxP3^+$ Lymphozyten. (G-J) *Gating*-Strategien für $CD4^+FoxP3^+$ Lymphozyten beim Schwein. (K) Mittelwerte und Standardfehler Anteile der $CD4^+FoxP3^+$ Lymphozyten zu den verschiedenen Zeitpunkten in Prozent.

Verhältnis von $CD25^+CD127^-$ Treg zu $CD4^+$ T-Zellen

Nach Trauma blieb über den gesamten Verlauf auch der Anteil der $CD25^+CD127^-$ Zellen an allen $CD4^+$ Zellen gegenüber HV signifikant gesenkt (AT: $3,5 \pm 0,5\%$, D1: $3,5 \pm 0,8\%$ beziehungsweise D3: $3,4 \pm 0,6\%$, vs. $7,2 \pm 1,6\%$ bei HV, $p < 0,05$, Abbildungen 6A–E, K; ACL: 26,6, 12,7, und 17,7 vs. 83,9).

Auch in den Proben, die im Tierversuch gewonnen wurden, zeigte sich über den gesamten Zeitraum der Messungen eine signifikante Verringerung dieses Anteils (AT: $4,9 \pm 0,7\%$, D1: $4,6 \pm 1,1\%$, beziehungsweise D3: $3,5 \pm 1,0\%$, vs. $9,1 \pm 1,4\%$ bei ctrl, $p < 0,05$, Abbildungen 6F–J, K; ACL: 78,8, 60,9, und 60,0 vs. 232,0).

Abbildung 6: Prozentuale Anteile von $CD25^{+}CD127^{-}$ Lymphozyten an $CD4^{+}$ Lymphozyten im peripheren Blut. (A, F) *Gating*-Strategien für $CD4^{+}$ Lymphozyten bei Mensch und Schwein vor Trauma. (B-E) *Gating*-Strategien für humane $CD25^{+}CD127^{-}$ Lymphozyten. (G-J) *Gating*-Strategien für $CD25^{+}CD127^{-}$ Lymphozyten beim Schwein. (K) Mittelwerte und Standardfehler der Anteile der $CD25^{+}CD127^{-}$ Lymphozyten zu den verschiedenen Zeitpunkten in Prozent.

Verhältnis von $CD127^{-}$ Treg zu $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ Treg

Zwischen Patienten und HV und zwischen den verschiedenen Messpunkten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Anteil der $CD127^{-}$ Zellen an $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ Zellen (AT: $60,4 \pm 5,2\%$, D1: $57,0 \pm 8,1\%$, beziehungsweise D3: $58,1 \pm 5,3\%$, vs. $64,3 \pm 5,0\%$ bei HV, $p < 0,05$, Abbildung 7). Auch bei den Tierversuchen zeigten sich hier keine signifikanten Änderungen (AT: $74,5 \pm 6,0\%$, D1: $70,8 \pm 6,8\%$ und D3: $64,5 \pm 9,0\%$, beziehungsweise, vs. $69,6 \pm 6,1\%$ bei ctrl, $p < 0,05$, Abbildung 7).

Abbildung 7: Mittelwerte und Standardfehler der Anteile CD127⁻ Lymphozyten an CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen im peripheren Blut von Mensch und Schwein zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten in Prozent.

3.4 Diskussion der Gesamtergebnisse sowie deren Beitrag zur Beantwortung der Fragestellung

Unsere Ergebnisse erlauben einen Einblick in die frühe Immunantwort in Bezug auf die Dynamik der immunsuppressiven regulatorischen T Zellen nach schwerem Trauma sowohl im humanen als auch im komparativen experimentellen *Setting* am Großtier. Über einen posttraumatischen Verlauf von 72 Stunden verfolgten wir die Dynamik von Lymphozyten und verschiedenen Treg-Populationen im Blut von Polytraumapatienten. Damit liegen diesbezüglich nun erstmalig Daten für den Zeitraum nach Aufnahme und zwischen 24 sowie 72 Stunden nach Trauma vor. Ein zusätzliches Ziel dieser Arbeit ist es, die Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse mit Daten aus Tierversuchen zu untersuchen, um so zukünftig *in vivo* Experimente in relevanten Tiermodellen zu ermöglichen. Zu diesem Zweck verglichen wir die Verläufe beim Menschen mit Daten aus einem Polytraumamodell am Schwein.

Sowohl der Anteil von $CD4^+$ Zellen als auch der Anteil von Lymphozyten an allen Leukozyten fiel nach Polytrauma signifikant ab. Dieser Effekt blieb bei TP über den gesamten Versuchszeitraum bestehen. Im Tierversuch zeigte sich 72 Stunden nach Trauma eine Erholung des prozentualen Anteils von $CD4^+$ Zellen beziehungsweise Lymphozyten an allen Leukozyten. Die absolute Zellzahl blieb jedoch signifikant reduziert.

Beim Menschen zeigte sich eine signifikante Verringerung des Anteils der $CD4^+$ Lymphozyten an allen Lymphozyten bis 24 Stunden nach Trauma. Diese signifikante Verringerung zeigte sich im Tierexperiment über die gesamte Versuchsdauer. Die absolute Zellzahl der $CD4^+$ Lymphozyten war bei beiden Gruppen über den gesamten Zeitraum reduziert.

Bei der Untersuchung der verschiedenen Subpopulationen von Treg ($CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ und $CD4^+CD25^+CD127^-$) zeigte sich eine signifikante Verringerung des Anteils dieser Populationen an allen $CD4^+$ Zellen. Dies galt für Mensch und Schwein gleichermaßen. Im Anteil der $CD127^-$ Zellen an $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen trat im Versuchszeitraum bei Menschen und Schweinen keine signifikante Veränderung auf.

Die frühe posttraumatische Dynamik von Lymphozyten im Blut erscheint also beim Menschen und beim Schwein vergleichbar zu sein. Zusätzlich ähneln sich nach unseren Beobachtungen der Immunphänotyp und die Dynamik der untersuchten Subpopulationen von Treg beider Spezies nach schwerem Trauma.

Das immunologische Ungleichgewicht nach Trauma

Ein Polytrauma verursacht neben physischen Schäden eine komplexe systemische Immunreaktion. Unter den Begriffen SIRS und CARS werden dabei hyperinflammatorische und immunsuppressive Vorgänge zusammengefasst, die in Reaktion auf das Trauma auftreten. Dabei können SIRS und CARS das Immunsystem schwerwiegend kompromittieren und so Komplikationen verursachen. Heute stellt die wichtigste Komplikation das MOV dar, ausgelöst durch hyperinflammatorische Prozesse im Rahmen eines SIRS. Die Inzidenz schwankt dabei bei einem ISS > 15 je nach *Scoring*-System (Denver Post Injury Multiple Organ Failure Score, Sequential Organ Failure Assessment, Marshall Multiple Organ Dysfunction Score) zwischen beachtlichen 22.8 und 58.5%. [18] Verbunden mit einer Mortalität von 33-36% liegt es damit an erster Stelle der häufigsten späten Todesursachen nach Trauma. [19]

Die wichtigsten Komplikationen der posttraumatischen Immunsuppression stellen dagegen nosokomiale Infektionen beziehungsweise die Sepsis dar. Deren Inzidenz und Mortalität sind bisher nicht in großen Studien umfassend beschrieben. So wurde bei Patienten mit orthopädischen Traumata ohne Angabe eines ISS eine Inzidenz von posttraumatischer Sepsis von 1,6% festgestellt. [29] Alberti *et al.* stellten bei Traumapatienten, ebenfalls ohne Erhebung eines ISS, eine Inzidenz von ambulant erworbener Sepsis (< 48 Stunden nach Aufnahme) von 8,7% fest. Weitere 8,0% entwickelten in dieser Studie im Verlauf eine nosokomiale Sepsis. [79] In einer weiteren Studie erkrankten bei einem ISS > 9 8,2% der Traumapatienten an einer Sepsis. [28] Zhang *et al.* stellten bei Traumapatienten mit ISS > 16 in 30,8% der Fälle eine Sepsis fest. [80] Bei Verbrennungspatienten stellt die Sepsis sogar die führende Todesursache dar und ist verantwortlich für 50 – 60 % der Tode. [81] Die allgemeine Mortalität der Sepsis ist mit 20 – 60 % ebenfalls enorm hoch. [82, 83] Belastbare Zahlen sind hier also noch nicht vorhanden. Trotzdem ist es offensichtlich, dass die Schwere des Traumas und der Traumamechanismus einen entscheidenden Einfluss auf die Inzidenz und die Mortalität der Sepsis haben. In zukünftigen Studien sollten die Schwere eines Traumas (beispielsweise mittels ISS), der Traumamechanismus und die Schwere infektiöser Komplikation erhoben werden, um die Ätiologie und die klinischen Implikationen der posttraumatischen Immunsuppression besser zu beschreiben.

Tiermodelle in der Traumaforschung

Neben immunologischen Analysen von Patientenproben haben auch Traumamodelle in Form von Tierversuchen wichtige Erkenntnisse über die posttraumatische Immunantwort gebracht. Sie ermöglichen die Durchführung von Experimenten unter standardisierten Bedingungen, mit einheitlichen Verfahren, eine weniger eingeschränkte Probengewinnung und eine Veränderung des untersuchten Organismus, die beim Menschen ethisch nicht vertretbar wäre. Tiermodelle an der Maus sind in der Traumaforschung weit verbreitet. Sie sind jedoch für eine mangelnde Übertragbarkeit auf den Menschen kritisiert worden, vor allem in Bezug auf das Immunsystem und posttraumatische Komplikationen wie die Sepsis.[55, 57, 58, 84, 85] Seok *et al.* untersuchten in einer aufsehenerregenden Studie systematisch die Korrelation von Immunreaktionen des Menschen und der Maus auf verschiedene immunologische *Trigger*, wie Verbrennungen, Trauma und die Verabreichung von Endotoxinen.[57] Sie stellten zuerst fest, bei welchen menschlichen Genen eine Änderung der Expression stattfand, jeweils bezogen auf die genannten inflammatorischen Prozesse. Sie verglichen diese genomischen Veränderungen zuerst zwischen den einzelnen Versuchsteilnehmern. Im Anschluss untersuchten sie, bei wie vielen der beim Menschen ausgewählten Gene sich auch in der Maus die Expression veränderte. Zwischen den Versuchstieren wurde ebenfalls verglichen. Die Immunreaktionen und Veränderungen der Genexpression in Immuneffektorzellen ähnelten sich bei menschlichen Versuchsteilnehmern sehr. Im Mausmodell hingegen divergierten die Reaktionen zwischen den Versuchstieren stärker. Zusätzlich unterschieden sich die Änderungen der Expressionsmuster stark von denen beim Menschen.[57] Diesen Ergebnissen wurde von Takao *et al.* widersprochen.[86, 87] Mausmodellen bescheinigten Takao *et al.* auf die gleichen Daten bezogen eine gute Anwendbarkeit. Sie gingen dabei lediglich von den Genen aus, bei denen sich bei beiden Spezies gleichzeitig die Expression änderte. Untersuchte man diese Gene, so ergab sich ein sehr ähnliches Muster an Veränderungen der Expression. Die Autoren schrieben, man müsse gemeinsame Signalwege erst feststellen und dann untersuchen, um Mausmodelle richtig anzuwenden.[86] Aus dieser Auseinandersetzung ergibt sich, dass die Anwendbarkeit des Mausmodells davon abhängt, in welcher Größenordnung man versucht, Inflammation zu verstehen. Experimentiert man beispielsweise isoliert

mit einzelnen Signalwegen, die bei beiden Spezies vorhanden sind, so werden sich mit hoher Wahrscheinlichkeit Gemeinsamkeiten ergeben. Dahingehend liegen Takao *et al.* mit ihrer Kritik richtig. Betrachtet man allerdings eher die gesamte inflammatorische Reaktion auf ein Trauma und vergleicht sie zwischen beiden Spezies, so trifft die Aussage der Studie von Seok *et al.* eher zu. Letzteres ist für immunologische Forschung oft stärker zu gewichten, weil dabei nicht selten komplexe Interaktionen und ein hohes Maß kontextabhängiger Reaktionen auftreten.

Um diese komplizierten Zusammenhänge in einer auf den Menschen übertragbaren Weise zu erforschen, wird es nötig sein, vorhandene Modelle in Frage zu stellen, sie zu verändern und sie für eventuell besser geeignete Modelle zu verlassen.[54, 55] In diesem Sinne fordern Autoren beispielsweise die Einrichtung von Tier-Intensivstationen[88] oder den Einsatz von Mäusen, die während ihrer Züchtung kontrolliert Keimen ausgesetzt werden, weil dies Immunreaktionen realistischer prägt.[54] Es mehren sich aber auch Stimmen, die die Anwendung gänzlich anderer Spezies als Mäusen für Tiermodelle fordern, deren Immunreaktionen eher denen des Menschen entsprechen. Dies trifft beispielsweise auf die Forschung zu Sepsis[58], Verbrennungen[60, 89], Schädelhirntraumata[90, 91] und Wundheilung[60] zu. Um neben einer zielführenden Forschung einen angemessenen Einsatz von Tiermodellen zu gewährleisten, sollte diesen Forderungen nachgegangen werden.

Hunde und Primaten werden als mögliche Spezies für Polytraumamodelle diskutiert. Bei diesen schränken jedoch ethische Aspekte die Durchführung aufwendigerer Experimente ein.

Modelle am Schwein hingegen erfreuen sich in den letzten Jahren für verschiedene Krankheitsentitäten zunehmender Beliebtheit. Sie sind anatomisch[92], physiologisch[58], genetisch[93], metabolisch[94] und immunologisch[84, 95] enger mit Menschen verwandt als Mäuse. Durch die Körpergröße von Schweinen lassen sich bei weitem mehr Proben gewinnen als bei Versuchen mit Mäusen. Etablierte chirurgische Praktiken lassen sich am Schwein wesentlich einfacher durchführen als bei der Maus, weil sie im Maßstab kaum oder gar nicht angepasst werden müssen. Auch Kombinationen aus interventionellen Therapien sind auf Mäuse oft schwer übertragbar. Zudem sind Schweine Nestflüchter, weshalb die Bedingungen bei der Aufzucht von Versuchstieren umfassend kontrolliert werden

können.[96] Dagegen stehen einige Vorteile der Maus als Versuchstier. Der Organismus von Mäusen ist besser erforscht, ihre Haltung preiswerter und Versuche sind aufgrund der geringeren Körpergröße oft leichter durchzuführen. Auch sind Reagenzien, Laborpraktiken und künstliche genetische Veränderungen bei Mäusen besser verfügbar. Diese Umstände spielen in der Auswahl des passenden Versuchstieres eine große Rolle. Hinzu kommt in der medizinischen Forschung jedoch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus. Bezogen auf unsere Studie sind dabei die Eigenschaften der Immunsysteme der drei Spezies Mensch, Schwein und Maus besonders zu gewichten.

Die allgemeine Homologie der Genome wird in der Literatur bei Menschen und Mäusen mit 60 – 70 %, beim Mensch und Schwein dagegen mit 80 – 90 % angegeben.[93] Die Verwandtschaft zeigt sich auch bei inflammatorischen Pathologien. Die kardiovaskulären Parameter im Rahmen einer Sepsis sind beim Schwein denen des Menschen ähnlicher als die der Maus.[84] Mäuse reagieren im Gegensatz zu Menschen und Schweinen auf intravasale Endotoxinfreisetzungen mit Hypothermie anstatt Hyperthermie.[97] Die Toleranz von Endotoxinen ist bei Mäusen sehr viel höher als bei Menschen und Schweinen, was die Nutzung von Mäusen für Sepsismodelle in Frage stellt.[84] Zudem zeigen Menschen wie Schweine eine höhere genetische Variabilität als für Versuchszwecke gezüchtete Mäusenstämme.[84] Dies spielt bei der Übertragung von Ergebnissen vom Modell auf den Menschen eine große Rolle. Dawson *et al.*[98] verglichen die zwischenartliche genetische Gemeinsamkeit von Genen für Immunsignalwege zwischen Menschen, Mäusen und Schweinen. Sie untersuchten dabei Gene, die für eine Vielzahl von *pattern recognition receptors* (PRRs) kodieren. PRRs nehmen eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der angeborenen Immunantwort ein, da sie unter anderem die Erkennung von DAMPs und PAMPs auf Makrophagen und Dendritischen Zellen vermitteln. Die von Dawson *et al.* untersuchten 11 „Familien“ von PRRs beinhalteten neben den membrangebundenen *toll-like receptors* (TLRs) und *C-type lectin receptors* (CLRs) auch zytoplasmatische *NOD-like receptors* (NLRs) und andere. Dabei zeigte sich, dass die genetische Konservierung von Proteindomänstrukturen zwischen Menschen und Schweinen fast doppelt so groß ist, wie zwischen Menschen und Mäusen. Außerdem stellten Dawson *et al.* bei Mäusen wesentlich diversere PRRs als bei Menschen und Schweinen fest. Dies ist

in einer größeren Expansion einer Mehrzahl von Genfamilien bei Mäusen begründet. Die Studie zeigte auch Anteile des Immunsystems von Schweinen, die in ihrer Ähnlichkeit zwischen Menschen und Mäusen liegen, beispielsweise das NLRP1-Inflammasom. Dawson *et al.* beschreiben jedoch auch für das Schwein spezifische Eigenschaften, beispielsweise das Fehlen des NLRC4- und des AIM2-Inflammasoms.[98] Auch zelluläre Bestandteile der Immunantwort scheinen sich bei Schweinen und Menschen mehr zu ähneln, als bei Menschen und Mäusen. Im Folgenden sind nur einige wenige der bekannten Unterschiede beschrieben. Bei Menschen und Schweinen sind 50 – 70% der Leukozyten im peripheren Blut Neutrophile Granulozyten und 30 – 50% Lymphozyten, bei Mäusen hingegen sind es 10 – 25% Neutrophile und 75 – 90% Lymphozyten.[56, 58] Dendritische Zellen tragen als antigenpräsentierende Zellen TLRs auf ihrer Oberfläche. Deren Verteilung und die Art der Reaktionen auf TLR-Stimulation sind zwischen Menschen und Schweinen ähnlicher als zwischen Mäusen und Menschen.[99] Der TLR9 kommt als wichtiger Rezeptor für die Vermittlung der angeborenen Immunantwort beispielsweise auf Monozyten, Dendritischen Zellen, natürliche Killerzellen (NK) und B-Lymphozyten vor. Seine genetische Regulation, die von ihm erkannten Liganden, sowie die Konzentration auf der Zelloberfläche von Makrophagen und Dendritischen Zellen, ähneln sich bei Schweinen und Menschen mehr als bei Mäusen und Menschen.[84] Bei Schweinen und Menschen wird die Produktion der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und der Metabolismus von Tryptophan stark aktiviert, wenn Makrophagen Endotoxinen ausgesetzt werden.[100] IDO ist an einer Vielzahl immunregulatorischer Mechanismen beteiligt. Bei Mäusen ist dieser Mechanismus hingegen weitgehend inaktiv.[84] Auch bei den zellulären Komponenten des Immunsystems sind bei Schweinen eigene Charakteristika beschrieben, die sie vom Menschen unterscheiden. $\gamma\delta$ -T-Zellen machen bei Menschen 1 – 5% der T-Zellen im Blut aus, beim Schwein hingegen 18 – 47%.[66] Außerdem besitzen Schweine ausgeprägte ileale Payer Plaques. Die Funktion dieses lymphatischen Organs ist beim Schwein bisher nicht geklärt.[66, 96]

Im Wissen um das Immunsystem des Schweins klaffen noch immer große Lücken. Zusammenfassend lässt sich aber zu den Homologien zwischen Menschen, Schweinen und Mäusen konstatieren, dass Schweine eine Position zwischen Mäusen und Menschen einnehmen. Zur Erforschung einer so komplizierten

Immunreaktion wie der posttraumatischen könnten sich bei Modellen am Schwein somit entscheidende Vorteile gegenüber Modellen an der Maus zeigen. Dies unterstreichen die zahlreichen angeführten Gemeinsamkeiten der Immunantworten von Menschen und Schweinen. Ebenfalls denkbar ist es, Modelle am Schwein zu nutzen, um die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus anderen Tierversuchen zu verifizieren. So könnte ein Stufenmodell (Maus – Schwein – Mensch) etabliert werden, durch das insbesondere die Trefferquote für beim Menschen erfolgreiche therapeutische Ansätze erhöht wird, was bisher ein Problem darstellt.[57] Bislang haben sehr wenige Studien zur posttraumatischen Immunreaktion am Schwein stattgefunden.[101-106] Dies wird sich in den nächsten Jahren sicherlich ändern. Letztendlich bleibt aber abzuwarten, inwieweit Patienten und der wissenschaftliche Fortschritt vom Polytraumamodell am Schwein profitieren werden.

Dynamik Regulatorischer T-Zellen und die posttraumatische Immunreaktion

Wie zuvor in der Einleitung dargelegt, stellen Treg einen vielversprechenden Fokus in der Erforschung der posttraumatischen Immunreaktion dar. Sie koordinieren maßgeblich die immunologische Selbsttoleranz und haben bedeutenden Einfluss auf die adaptive sowie die angeborene Immunreaktion.[107] Ihre Funktionalität trägt damit entscheidend zur immunologischen Homöostase bei. Dies wird durch ihre entscheidende Rolle bei der Heilung verschiedener Arten von Gewebe[108, 109] oder bei der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten[51] unterstrichen.

Die posttraumatische Immunreaktion und diejenige im Rahmen von Sepsis zeigen ähnliche Pathomechanismen und Verläufe. Beide haben inflammatorische sowie immunsuppressive Komponenten. Die Komplikationen wie das MOV oder das Auftreten zusätzlicher Infektionen ähneln sich. Außerdem stellt Sepsis eine häufige Komplikation im Verlauf eines schweren Traumas dar, wodurch beides vermischt wird. Es liegt deshalb nahe, Erkenntnisse aus der Sepsisforschung auf die immunologische Reaktion nach einem schweren Trauma zu übertragen. Die Vergleichbarkeit von Ergebnissen ist jedoch nur bedingt gegeben. Sepsis ist mit einem eher schleichenden Beginn verbunden. Im Rahmen eines schweren Traumas sieht sich der Organismus mit einem plötzlichen massiven Zelluntergang konfrontiert und die Aktivierung des Immunsystems gestaltet sich anders. Ebenfalls einen großen Einfluss auf die Schwere und den Verlauf der posttraumatischen Immunreaktion könnte das sogenannte *Priming* spielen. Ein immunologisches

Priming beschreibt das Phänomen einer verstärkten Immunreaktion, wenn bereits eine Stimulation des Immunsystems vorangegangen ist.[110] Nach einem Polytrauma fällt die immunologische Reaktion auf eine aufkommende Infektion demnach anders aus, als dies im Gesunden der Fall wäre. In einem Sepsismodell an Ratten konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Produktion von IL-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF α) höher ausfiel, wenn der Sepsis ein hämorrhagischer Schock voranging.[111] Kupffer-Zellen produzieren unter Behandlung mit Endotoxinen mehr TNF α , wenn dieser Behandlung eine Femurfraktur vorausgegangen ist.[112] Die Rolle eines immunologischen *Primings* wird auch im Hinblick auf Langzeitfolgen eines Traumas beziehungsweise einer Sepsis diskutiert. Durch eine persistierende Inflammation erhöht sich beispielsweise das Risiko für kognitive Einschränkungen, kardiovaskuläre Ereignisse und die Entwicklung eines Nierenversagens.[110] Inwieweit sich die Langzeitfolgen verschiedener Traumata und einer Sepsis ähneln ist bisher unerforscht. Aufgrund der unterschiedlichen Pathophysiologien erscheinen Diskrepanzen hier wahrscheinlich.

Im Vergleich mit unseren Ergebnissen zeigen sich in der Dynamik von Treg bei Sepsis ebenfalls deutliche Disparitäten. In unseren Experimenten war der Anteil aller gemessenen Treg-Phänotypen an CD4⁺ Zellen an allen Messzeitpunkten nach Trauma signifikant reduziert. Wie in unseren Experimenten wurde in den im Folgenden beschriebenen Studien peripheres Blut analysiert. Jiao *et al.*[113] führten zur Induktion einer Sepsis an Ratten eine *cecal ligation and puncture* (CLP) durch. Im Rahmen eines CLP-Sepsismodells wird das Caecum abgebunden und punktiert, sodass Stuhl ins Peritoneum gelangt. Dabei wurde keine signifikante Änderung des Anteils CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg an CD4⁺ Zellen festgestellt. Nach 24 Stunden war dieser Anteil jedoch signifikant erhöht, ebenso nach 7, 14 und 21 Tagen. Tatura *et al.*[114] zeigten in einem CLP-Sepsismodell an Mäusen einen erhöhten Anteil CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg an CD4⁺ Zellen nach 48 Stunden, sowie 4 und 7 Tagen. Hein *et al.*[115] zeigten ebenfalls in einem CLP-Sepsismodell an Mäusen eine signifikante Erhöhung des Anteils von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg an CD4⁺ Zellen nach 24 Stunden. Eine Erhöhung des Anteils CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg an CD4⁺CD25⁺ Zellen konnten auch Leng *et al.*[116] bei Patienten mit septischem Schock zeigen. Blut wurde in dieser Studie innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme abgenommen. In nur einer Studie wurde der Anteil CD4⁺CD25⁺CD127⁻

Treg an CD4⁺ Zellen bei Patienten mit septischem Schock innerhalb von 12 Stunden erfasst und als nicht signifikant verändert beschrieben.[115] Nach 3, 5 und 7 Tagen war jedoch eine signifikante Erhöhung feststellbar. Den angeführten Studien widersprechen lediglich Ergebnisse von Wu *et al.*[117], die innerhalb der ersten 48 Stunden nach Aufnahme, sowie nach 7 Tagen keine signifikante Erhöhung des Anteils von Treg an CD4⁺ Zellen feststellten. Hier wurden Treg allerdings als CD4⁺CD25^{high} charakterisiert, sodass eventuell eine abweichende Zellpopulation analysiert wurde. Die Autoren zweier Studien stellten eine Korrelation der Erhöhung der gemessenen Treg mit der Schwere der Sepsis fest.[116, 118] Sie zeigten zudem, dass Treg beim Vorliegen einer Sepsis (mit festgestellter Infektion) im Vergleich zu einem SIRS ohne Infektion signifikant erhöht sind.[116, 118]

Eine Sepsis ist also mit einer Erhöhung des Anteils zirkulierender Treg assoziiert. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass das graduelle Eintreten eines hyperinflammatorischen Zustandes zur Induktion und Intravasion von pTregs führt. Aus dem Unterschied von Daten aus Sepsismodellen zu Ergebnissen aus reinen Traumamodellen ergibt sich, wie wichtig es ist, die posttraumatische Immunreaktion kontextabhängig zu betrachten. Eine Erfassung des *trauma load*, des Traumamechanismus, des individuellen prä- und posttraumatischen Immunstatus und des Auftretens posttraumatischer Komplikationen sind für eine erfolgreiche Therapie entscheidend. Sepsisverläufe sollten außerdem in Abhängigkeit von eventuell vorangegangenen *Priming* des Immunsystems analysiert werden. So weist eine Sepsis nach alleiniger Infektion vermutlich andere immunologische Charakteristika auf, als nach einem Polytrauma. Zur Interpretation unserer Ergebnisse müssen deshalb Studien herangezogen werden, deren Design der unsrigen möglichst nahekommt.

Solche Experimente machen sich vorwiegend von Patienten stammende Zellen zunutze [46, 50] oder werden im Rahmen von Traumamodellen meist an Nagern durchgeführt.[119-122] Wenig Forschung hat bisher *in vivo* auf andere Art und Weise stattgefunden. Bezüglich der Dynamik von Treg im peripheren Blut nach Trauma wurde bisher lediglich eine kleine Zahl von Studien durchgeführt. Dabei wurden Treg bis 24 Stunden nach Trauma beziehungsweise ab 4 Tagen nach dem Trauma untersucht. Für die Zeitpunkte 48 und 72 Stunden nach Trauma präsentieren wir mit dieser Studie erstmals Daten. Ein Langzeitpolytraumamodell

am Schwein mit Sacrifice nach 48 Stunden ist beschrieben[123], Treg wurden aber in diesem oder einem vergleichbaren Traumamodell noch nie untersucht.

In unserer Studie stellten wir sowohl beim Menschen wie auch beim Schwein einen Abfall des Anteils von Lymphozyten an allen Leukozyten im untersuchten Blut fest. Das Auftreten von Lymphozytopenien nach Trauma wurde bereits vor Jahren beschrieben.[124] Dabei scheint die Schwere der Lymphozytopenie mit dem Schweregrad des Traumas sowie dem Auftreten beziehungsweise der Schwere von Komplikationen wie Sepsis oder MODS einherzugehen.[124, 125] Auch bei Mäusen und Ratten wurden ähnliche Dynamiken beschrieben.[126, 127] Das Auftreten einer Lymphozytopenie könnte durch eine posttraumatische Kortisolfreisetzung zur Eindämmung der proinflammatorischen Antwort auf Polytrauma vermittelt sein. Kortisol bewirkt als stark antiinflammatorisches Hormon eine Freisetzung von neutrophilen Granulozyten vor allem aus dem Knochenmark und induziert bei Lymphozyten Apoptose.[11] Die von uns beobachtete posttraumatische Leukozytose bei Menschen und Schweinen spricht hierbei für eine kortisolabhängige Dynamik. Außerdem könnte eine vermehrte Extravasion der Lymphozyten in lymphoide und nicht-lymphoide Organe, vor allem verletztes Gewebe, diese Daten erklären. Auf ein solches Verhalten weisen beispielsweise Ergebnisse von Yeager *et al.* hin.[128] Hierzu sollten weiterführende Studien durchgeführt und Ergebnisse in Abhängigkeit von verschiedenen Traumamechanismen und Schweregraden erhoben werden. Bemerkenswert ist, dass die Entwicklung eines MODS als immunologische Komplikation mit der Schwere des Traumas sowie einer frühen Veränderung der Dynamik von Lymphozyten in Verbindung gebracht werden kann.

Außerdem beobachteten wir bei allen untersuchten Treg-Subpopulationen eine signifikante Reduktion ($CD4^+CD25^+$ (Abbildung 4), $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (Abbildung 5), und $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen (Abbildung 6) von allen $CD4^+$ Zellen). In der Literatur finden sich zwar vergleichbare Studien, diese weisen jedoch meist sehr verschiedene Traumamechanismen und Versuchszeiträume auf. In allen im Folgenden aufgeführten Studien wurde, wie in unserer Arbeit, der Anteil von Treg an $CD4^+$ Zellen im peripheren Blut untersucht.

Nur eine Studie beschreibt die frühe Dynamik nach Trauma im Tierversuch. In einem Traumamodell an Ratten wurden den Tieren bilaterale Femurfrakturen sowie

ein hämorrhagischer Schock zugefügt.[45] Dort konnte im Vergleich zu Sham-Tieren und einer gesunden Kontrollgruppe 4 Stunden nach Trauma ein signifikant verringerter Anteil $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen gezeigt werden. Dies deckt sich also mit unseren Ergebnissen. In nur einer weiteren Studie wurde die Dynamik des prozentualen Anteils von Treg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) im Tiermodell beschrieben.[129] Das Trauma stellte dabei singuläre Lungenkontusion beziehungsweise eine Lungenkontusion kombiniert mit einem hämorrhagischen Schock dar. Der ISS betrug somit ≤ 16 . Der einzige Messzeitpunkt war dabei 7 Tage nach Trauma. Hier wurden weder signifikante Unterschiede zwischen einer der Traumagruppen, noch im Vergleich mit der Kontrollgruppe beschrieben.

Beim Menschen wurde die Dynamik von Treg nach Trauma etwas öfter untersucht. In einer Studie wurden die Blutproben möglichst unmittelbar nach Trauma analysiert.[46] Hier zeigte sich bei Patienten mit Trauma ($ISS = 18.71 \pm 8.48$) und hämorrhagischem Schock nach der Vorstellung in der Notaufnahme keine signifikante Änderung im Prozentsatz von $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg.

Albertsmeier *et al.* beschrieben 2 Stunden sowie 24 Stunden nach chirurgischem Trauma durch große elektive Operationen am Abdomen keine signifikante Änderung der Größe der untersuchten Tregpopulation im Blut verglichen mit präoperativen Zellzahlen.[130] Hier wurden Treg als $CD4^+CD25^+CD127^-$ charakterisiert. Der ISS ist dabei schwer einzuschätzen, da es sich nicht um ein Trauma im klassischen Sinne handelt. Bei Blutentnahmen während der ersten 24 Stunden nach Polytrauma mit einem $ISS \geq 20$ beschrieben auch MacConmara *et al.* keine signifikante Änderung des Anteils humaner $CD4^+CD25^{high}$ Treg an allen $CD4^+$ Zellen.[42] An Tag 7 nach Trauma zeigte sich jedoch ein signifikanter Anstieg. In einer Studie an Patienten nach schwerem Thoraxtrauma ($ISS \leq 16$) wurden die Anteile $CD4^+CD25^+CD127^-$ Treg an $CD4^+$ Lymphozyten untersucht.[50] Diese waren bei der ersten Messung innerhalb der ersten 24 Stunden, sowie nach 7, 14 und 21 Tagen signifikant erhöht.

Eine Studie von Li *et al.*[131] stratifizierte die untersuchten Patienten nach dem *Outcome* (verbesserter Zustand vs. verschlechterter Zustand vs. Tod) am Ende des 21-tägigen Studienzeitraumes. Die Patienten dieser Studie hatten ein SHT erlitten. Ein schlechterer *Outcome* war meist mit schwererem Trauma assoziiert. Die Gruppe mit dem besten Outcome wies innerhalb der ersten 24 Stunden eine Erhöhung des Anteils $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg an $CD4^+$ mononuklearen Zellen

auf. Nach 4 Tagen war ihr Anteil auf das Niveau der Kontrollgruppe gesunken. Nach 7 und 14 Tagen zeigten sich erneut erhöhte Werte, die sich nach 21 Tagen jedoch wieder normalisiert hatten. Bei beiden anderen Gruppen konnte ein Absinken der Treg-Fraktion innerhalb der ersten 24 Stunden beobachtet werden. Nach 4 Tagen zeigte sich weiterhin ein niedriger Wert, der sich nach 7 Tagen wieder dem Kontrollwert angepasst hatte. Bei den Überlebenden mit schlechterem Outcome war der Anteil an Treg nach 14 Tagen weiterhin normwertig, nach 21 Tagen wieder reduziert.

Da die aufgeführten Studien verschiedene Pathomechanismen und sehr unterschiedliche Messzeitpunkte beinhalten, ist ein Vergleich mit unseren Daten möglicherweise nur bedingt aussagekräftig. Trotzdem lassen sich anhand der Literatur gewisse Eigenschaften der Dynamik von Treg nach Trauma im peripheren Blut beschreiben. Die Ergebnisse von Dai *et al.*[45] sowie Li *et al.*[131] legen in Verbindung mit den unsrigen die Vermutung nahe, dass der Anteil von Treg an CD4⁺ Zellen unmittelbar nach Trauma sinkt, wenn dieses ein Schwerwiegendes ist. Die Daten von MacConmara *et al.*[42] widersprechen dem zwar, da dort jedoch lediglich CD4 und CD25 zur Identifikation von Treg verwendet wurden, ist eine Verunreinigung mit aktivierten T-Helferzellen nicht auszuschließen. Die Erkenntnisse von Albertsmaier *et al.*[130] weichen ebenfalls ab. Da das Trauma dort jedoch eine große elektive abdominelle Operation darstellte, ist die Vergleichbarkeit ebenfalls in Frage zu stellen.

Eine Reduktion der Treg im Blut durch Zelltod ist unwahrscheinlich, da sie peripher nach Trauma verringerte Apoptoseraten zeigen.[132] Als Grund für den Abfall ist viel eher die Extravasion der Treg in peripheres Gewebe anzusehen. Dafür sprechen Studien, die eine Anreicherung von aktivierten Treg nach Trauma in geschädigtem[133] beziehungsweise heilendem[134] Gewebe zeigen. Dies könnte auch erklären, wieso bei geringerem *trauma load* kein Abfallen der peripheren Treg im peripheren Blut zu beobachten ist. Möglicherweise fällt aufgrund des geringeren Bedarfs an Treg im Gewebe die Extravasion hierbei so gering aus, dass sie kompensiert werden kann.

Sonst finden sich ausschließlich Ergebnisse, die zu späteren Messzeitpunkten als in unserer Studie erhoben wurden. Die Daten von Zhang *et al.*[50] und Li *et al.*[131] lassen vermuten, dass der Anteil von Treg an CD4⁺ Zellen bei eher niedrigem ISS (≤ 16) ab ungefähr einer Woche nach Trauma erhöht ist. Dem stehen wieder die

Daten von MacConmara *et al.*[42] entgegen, deren Übertragbarkeit aufgrund des verwendeten Phänotyps wie erwähnt infrage zu stellen ist. Ebenfalls widersprechen hier die Daten von Gore *et al.*[129], wobei es sich dort um einen Versuch an Ratten handelte. Ratten und Mäuse erholen sich nach traumatischen Verletzungen im Vergleich zum Menschen teilweise extrem schnell.[89, 129] Deshalb ist Vergleichbarkeit dieser Arbeit mit der unsrigen ebenfalls zu bezweifeln.

Zusammenfassend legen die dargestellten Ergebnisse nahe, dass das Ausmaß eines Traumas sowie das Verletzungsmuster beziehungsweise der Verletzungsmechanismus eine wichtige Rolle in Bezug auf die posttraumatische Dynamik von Treg spielen. Außerdem untermalen die angeführten Studien, wie wichtig es ist, ein adäquates und bestenfalls standardisiertes Traumamodell zu etablieren. So könnten reproduzierbare und auf die zu untersuchenden Fragestellungen ausgerichteten Ergebnisse erhoben werden. In diesem Sinne sollten in zukünftigen Studien außerdem unbedingt ähnliche Phänotypisierungen von Treg verwendet werden. Unsere Daten zeigten bei Menschen und Schweinen ähnliche Verläufe der Treg-Dynamiken nach Trauma. Die Vergleichbarkeit dieser Dynamiken sollte an zusätzlichen Messzeitpunkten untersucht werden. Um die mögliche Überlegenheit des Schweinmodells über Modelle an Nagern im Hinblick auf die posttraumatische Immunantwort zu verifizieren, sollte zusätzlich ein möglichst ähnliches Modell mit Nagern durchgeführt werden.

Wir haben die Dynamik von Treg nur in Blutproben untersucht. Diese Dynamik sollte in zukünftigen Studien mit der Situation in traumatisiertem Gewebe verglichen werden. Dabei lässt jedoch auch eine genaue Charakterisierung der Dynamik von Tregs nach Trauma keinen Rückschluss auf deren Funktionalität zu. Ihre Funktionalität detailliert zu beschreiben ist sicherlich ein aufwändiges Unterfangen, das aber bereits angegangen wird.[135] Treg sind keine homogene Zellpopulation und weisen zusätzlich komplexe Wechselwirkungen mit anderen Zellen auf, die je nach Lokalisation und *trauma load*, Traumamechanismus und Immunstatus eines Patienten unterschiedliche Implikationen haben. Ein Ansatz für Funktionalitätssays ist die Untersuchung von Zytokinen, die für die Funktionalität von Treg bedeutend sind (zum Beispiel IL-2) oder von ihnen sezerniert werden (zum Beispiel TGF β , IL-10, IL-35). Sie könnten im Blut und im traumatisierten Gewebe quantifiziert werden, um Licht in das Zusammenspiel von Treg und anderen Immunzellen zu bringen.

CD127

Seitdem eine geringe Expression von CD127, der α -Untereinheit des IL-7-Rezeptors, in $CD4^+CD25^+$ Treg 2006 erstmals beschrieben wurde, wird es zunehmend für ihre Charakterisierung eingesetzt.[47, 136] Während CD127 beim Menschen seit langem bekannt ist, stellen die hier vorliegenden Ergebnisse dessen erste Charakterisierung beim Schwein dar. Ca. 70% der $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen vom Schwein beziehungsweise 65% der $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen vom Menschen waren in unseren Experimenten $CD127^-$. Seddiki *et al.* beschrieben 84% $CD4^+CD25^+$ Zellen im peripheren Blut des Menschen als $CD127^{low}$. [47] Dabei berücksichtigten sie jedoch nicht die Expression von FoxP3. Der tatsächliche Anteil $CD127^-$ Zellen an den Treg sollte also etwas unter dem von Seddiki *et al.* beschriebenen Anteil liegen. Dass sich in unseren Experimenten der Anteil von $CD127^-$ Zellen an $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen über den Zeitraum unserer Studie bei Mensch und Tier nicht änderte, spricht dafür, dass es sich hierbei um dieselbe Population handeln könnte. Dies sollte in weiterführenden Analysen untersucht werden.

Limitationen

Einschränkungen dieser Studie umfassen einige methodischen Aspekte. So konnten aufgrund technischer Gegebenheiten keine weiterführenden Analysen wie *live/dead cell discrimination* oder Funktionalitätsassays durchgeführt werden. Die Intensitäten der durchflusszytometrisch gemessenen Färbungen waren teilweise verhältnismäßig schwach, obwohl wir Isotypkontrollen und ungefärbte Proben als Kontrollen einsetzten, um den Fehler möglichst gering zu halten. Dies limitiert die Aussagekraft mancher Messergebnisse von Zellpopulationen. Ein weiterer interessanter Punkt sind geschlechterspezifische Unterschiede im Immunphänotyp. Bei den 20 Traumapatienten (15 männlich und 5 weiblich) und 10 gesunden Freiwilligen (7 männlich und 3 weiblich), die in diese Studie eingeschlossen wurden, konnten wir keine dahingehenden Unterschiede finden. Die Teststärke ist jedoch nicht groß genug, um hier endgültige Aussagen treffen zu können.

Ausblick

Treg waren bisher nicht im Fokus ausgiebiger experimenteller Studien in der Traumaforschung. Sie sollten in Zukunft öfter Gegenstand tiefergehender Studien sein, weil sie bei vielen Immunmechanismen eine solch herausragende Schlüsselfunktion einnehmen. Dies sollte nicht nur zu einem besseren Verständnis der Ätiologie pathologischer posttraumatischer Immunreaktionen führen. Auch könnten Treg als Ziel von Therapien herhalten, die gezielt deren Aktivität oder Funktionalität beeinflussen und damit Immunreaktionen auf tiefgreifendem Niveau verändern.[41, 137-141] Mit Biomarkern, die auf den Zustand der Treg eines Patienten zurückschließen lassen, könnten außerdem Aussagen über dessen immunologischen Status getroffen werden, die in der Form bisher nicht möglich sind.

Das Polytraumamodell am Schwein wurde erst vor wenigen Jahren erstmals etabliert. Aufgrund seiner praktischen Vorteile, der großen Menge an zu gewinnendem Probenmaterial, der Übertragbarkeit etablierter Methoden aus der Humanmedizin und der Ähnlichkeit der Immunsysteme des Schweins und des Menschen wird es jedoch in Zukunft sicher eine große Rolle spielen. Unsere Ergebnisse stärken die Signifikanz und Verlässlichkeit dieses Modells.

4 Publikation

4.1 Zur Veröffentlichung angenommene Publikationen

1. **Serve R**, Sturm R, Schimunek L, Störmann P, Heftrig D, Teuben MPJ, Oppermann E, Horst K, Pfeifer R, Simon TP, Kalbas Y, Pape HC, Hildebrand F, Marzi I, Relja B.

Comparative Analysis of the Regulatory T Cells Dynamics in Peripheral Blood in Human and Porcine Polytrauma.

Front Immunol. 2018 Mar 13;9:435.

2. Schimunek L, **Serve R**, Teuben MPJ, Störmann P, Auner B, Woschek M, Pfeifer R, Horst K, Simon TP, Kalbitz M, Sturm R, Pape HC, Hildebrand F, Marzi I, Relja B.

Early decreased TLR2 expression on monocytes is associated with their reduced phagocytic activity and impaired maturation in a porcine polytrauma model.

PLoS One. 2017 Nov 10;12(11):e0187404.

3. Störmann P, Auner B, Schimunek L, **Serve R**, Horst K, Simon TP, Pfeifer R, Köhler K, Hildebrand F, Wutzler S, Pape HC, Marzi I, Relja B; This study was performed within the study consortium of the TREAT Research Group.

Leukotriene B4 indicates lung injury and on-going inflammatory changes after severe trauma in a porcine long-term model.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2017 Dec;127:25-31.

4.2 Darstellung des Anteils an der eigenen Publikation

1. **Serve R**, Sturm R, Schimunek L, Störmann P, Heftrig D, Teuben MPJ, Oppermann E, Horst K, Pfeifer R, Simon TP, Kalbas Y, Pape HC, Hildebrand F, Marzi I, Relja B. Comparative Analysis of the Regulatory T Cells Dynamics in Peripheral Blood in Human and Porcine Polytrauma. Front Immunol. 2018 Mar 13;9:435.

Bei der intellektuellen Vorarbeit zu dieser Publikation inklusive Generierung der Ziele leistete der Erstautor Hr. Rafael Serve einen grundlegenden Beitrag. Darüber hinaus war er ebenfalls an der Rekrutierung der Probanden und der Durchführung der humanen Experimente beteiligt. Seine Hauptverantwortung lag bei der Durchführung von *in vivo* Versuchen, bei der Erhebung und Analyse der Daten, sowie beim Verfassen des Manuskriptes.

2. Schimunek L, **Serve R**, Teuben MPJ, Störmann P, Auner B, Woschek M, Pfeifer R, Horst K, Simon TP, Kalbitz M, Sturm R, Pape HC, Hildebrand F, Marzi I, Relja B. Early decreased TLR2 expression on monocytes is associated with their reduced phagocytic activity and impaired maturation in a porcine polytrauma model. PLoS One. 2017 Nov 10;12(11):e0187404.

Bei der Erstellung dieser Arbeit leistete der Zweitautor Rafael Serve grundlegende Beiträge zur Durchführung der Experimente, Erhebung der Daten und bei der Revision des Manuskriptes.

3. Störmann P, Auner B, Schimunek L, **Serve R**, Horst K, Simon TP, Pfeifer R, Köhler K, Hildebrand F, Wutzler S, Pape HC, Marzi I, Relja B; This study was performed within the study consortium of the TREAT Research Group. Leukotriene B4 indicates lung injury and on-going inflammatory changes after severe trauma in a porcine long-term model. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2017 Dec;127:25-31.

Bei der Erstellung dieser Arbeit leistete der Zweitautor Rafael Serve grundlegende Beiträge zur Durchführung der Experimente, Erhebung der Daten und bei der Revision des Manuskriptes.

4.3 Publikation *Comparative Analysis of the Regulatory T cells Dynamics in Peripheral Blood in human and Porcine Polytrauma*

Comparative Analysis of the Regulatory T Cells Dynamics in Peripheral Blood in Human and Porcine Polytrauma

Rafael Serve¹, Ramona Sturm¹, Lukas Schimunek¹, Philipp Störmann¹, David Heftrig¹, Michel P. J. Teuben², Elsie Oppermann³, Klemens Horst⁴, Roman Pfeifer², Tim P. Simon⁵, Yannik Kalbas², Hans-Christoph Pape², Frank Hildebrand⁴, Ingo Marzi¹ and Borna Relja^{1*}

¹Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, University Hospital Frankfurt, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany, ²Department of Orthopaedic Trauma Surgery, University Hospital Zurich, University of Zurich, Zurich, Switzerland, ³Department of Abdominal and Visceral Surgery, University Hospital Frankfurt, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany, ⁴Department of Orthopaedic Trauma, RWTH Aachen University, Aachen, Germany, ⁵Department of Intensive Care and Intermediate Care, RWTH Aachen University, Aachen, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Satyajit Rath,
Agharkar Research Institute,
India

Reviewed by:

Ana Maria Teixeira,
University of Coimbra,
Portugal
Zsolt J. Balogh,
University of Newcastle,
Australia

*Correspondence:

Borna Relja
info@bornarelja.com

Specialty section:

This article was submitted
to Inflammation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 13 September 2017

Accepted: 19 February 2018

Published: 13 March 2018

Citation:

Serve R, Sturm R, Schimunek L, Störmann P, Heftrig D, Teuben MPJ, Oppermann E, Horst K, Pfeifer R, Simon TP, Kalbas Y, Pape H-C, Hildebrand F, Marzi I and Relja B (2018) Comparative Analysis of the Regulatory T Cells Dynamics in Peripheral Blood in Human and Porcine Polytrauma. *Front. Immunol.* 9:435. doi: 10.3389/fimmu.2018.00435

Background: Severely injured patients experience substantial immunological stress in the aftermath of traumatic insult, which often results in systemic immune dysregulation. Regulatory T cells (Treg) play a key role in the suppression of the immune response and in the maintenance of immunological homeostasis. Little is known about their presence and dynamics in blood after trauma, and nothing is known about Treg in the porcine polytrauma model. Here, we assessed different subsets of Treg in trauma patients (TP) and compared those to either healthy volunteers (HV) or data from porcine polytrauma.

Methods: Peripheral blood was withdrawn from 20 TP with injury severity score (ISS) ≥ 16 at the admittance to the emergency department (ED), and subsequently on day 1 and at day 3. Ten HV were included as controls (ctrl). The porcine polytrauma model consisted of a femur fracture, liver laceration, lung contusion, and hemorrhagic shock resulting in an ISS of 27. After polytrauma, the animals underwent resuscitation and surgical fracture fixation. Blood samples were withdrawn before and immediately after trauma, 24 and 72 h later. Different subsets of Treg, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺CD127⁻, and CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺ were characterized by flow cytometry.

Results: Absolute cell counts of leukocytes were significantly increasing after trauma, and again decreasing in the follow-up in human and porcine samples. The proportion of human Treg in the peripheral blood of TP admitted to the ED was lower when compared to HV. Their numbers did not recover until 72 h after trauma. Comparable data were found for all subsets. The situation in the porcine trauma model was comparable with the clinical data. In porcine peripheral blood before trauma, we could identify Treg with the typical immunophenotype (CD4⁺CD25⁺CD127⁻), which were virtually absent immediately after trauma. Similar to the human situation, most of these cells expressed FoxP3, as assessed by intracellular FACS stain.

Conclusion: Despite minor percental differences in the recovery of Treg populations after trauma, our findings show a comparable decrease of Treg early after polytrauma, and strengthen the immunological significance of the porcine polytrauma model. Furthermore, the Treg subpopulation CD4⁺CD25⁺CD127⁻ was characterized in porcine samples.

Keywords: regulatory T cell, lymphocyte, polytrauma, pig, porcine

SHORT SUMMARY

Experimental trauma models represent a translational tool for the assessment of post-traumatic management. To verify the applicability of such models, we investigated the dynamics of regulatory T cells (Treg) in an experimental porcine severe multiple trauma (polytrauma) model and compared the findings with clinical data obtained from severely traumatized patients admitted to the emergency department of our institution. Different immunophenotypes of Treg, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺CD127⁻, and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ were characterized by flow cytometry before and immediately after trauma, 24 and 72 h later. The proportion of human Treg in trauma patients (TP) was lower compared to healthy volunteers, without showing significant recovery until 72 h after trauma. Data from the porcine trauma model confirmed the findings obtained in the clinic. In conclusion, Treg kinetics in peripheral blood in the porcine polytrauma model were comparable with the clinical situation in TP.

INTRODUCTION

Trauma causes more than five million deaths annually and is described as the sixth leading cause of death globally and as number one cause of death in individuals under 40 years (1–3). About half of the patients die within the first 24 h after admittance to the emergency department (ED) due to severe traumatic injuries [injury severity score (ISS) ≥ 16 , polytrauma], massive blood loss, serious organ damage, and/or craniocerebral injuries (4, 5). After this early phase, the leading causes of mortality are multiple organ dysfunction syndrome (MODS) and failure (MOF) (6–8). Organ failure is associated with a systemic immune reaction to tissue injury often termed as systemic inflammatory response syndrome (SIRS) (8). Trauma-associated immune response exceeds repair mechanisms and constricts the immunological defense at the site of trauma (9, 10). Hence, organ systems, which were not primarily injured are often affected by a compromised endothelial barrier, disturbed microcirculation, interstitial edema, tissue infiltration with leukocytes, and cell death, which results in the so-called remote organ injury, dysfunction, and/or failure (5, 6). SIRS is paralleled by a compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS), which is characterized by immunosuppression (5, 11). While patients may survive the early post-trauma phase, deaths caused by immunosuppression, e.g., nosocomial infections in the later clinical course are common (11, 12). However, the SIRS-CARS paradigm is rather a simplified concept of post-traumatic inflammation.

Regulating cellular and molecular mechanisms of the post-traumatic immunosuppression are widely unknown. Next to

specific release of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, a shift toward a T-helper 2 lymphocyte-mediated response and/or lymphocyte anergy, regulatory T cells (Treg) contribute to the (post-traumatic) immunosuppression, and thus are strongly suggested to play a protruding role in its course (13–15). Treg play an important role in peripheral immune tolerance, and are able to alter innate and adaptive immune responses due to their ability to modulate and kill target cells, such as antigen-presenting cells and effector T cells, and to influence inflammatory cytokine environments and metabolic pathways (16, 17). So far, no consensus has been reached on the use of a specific set of markers when identifying Treg in human and mice. Since 1995, Treg were mainly characterized by their expression of CD4 antigen and IL-2 receptor α -chain, CD25 (18). Increased CD4⁺CD25⁺ Treg activity in severely injured patients has been found by MacConmara et al. (19) and applied to determine Treg expression profile. Since its discovery, the continuous expression of Treg-specific transcription factor forkhead box protein 3 (FoxP3) has been broadly used to characterize them as well (16, 20, 21). In trauma research, this set of markers has been used in experiments with human samples as well as in animal models (22, 23). Several other markers, such as CD127 (24), CTLA-4 (25), and GARP (26), have been proposed. Zhang et al. showed an increased proportion of CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Treg regarding the overall number of lymphocytes over the course of 3 weeks in thoracic trauma patients (TP) (27). Yet, little is known about Treg dynamics after trauma regarding specific cell subsets. In the present study, expression of CD4, CD25, FoxP3, and/or CD127 were applied as specific markers for Treg to characterize their immunophenotype and dynamics after polytrauma.

Despite improvements in prognosis and survival, there is a lack of validated diagnostic tools for post-traumatic complications, e.g., sepsis (9). Moreover, a profound understanding of underlying immunological pathomechanisms in order to identify reliable diagnostic biomarkers and/or potential therapeutic targets is necessary (6, 9, 28, 29). Despite considerable advances in biomedical sciences and developing important but mostly murine disease and therapeutic models *in vivo*, there are concerning inconsistencies with regard to the interspecies analogy after polytrauma (30–32). These especially concern immunogenetics and immune functions, such as leukocyte subsets or cytokine pathways (33), which are criticized in murine models in the areas of human inflammatory diseases, trauma, and various types of wound healing (31, 34). Therefore, porcine models (most commonly conducted with domestic pigs) are of increasing popularity because of their distinct physiological and anatomical comparability toward humans (34–36). In addition, the porcine immune system

is probably best characterized after the ones of primates and mice (33). Hence, a porcine polytrauma model may contribute to better understanding of the pathophysiology of post-traumatic, e.g., SIRS and/or sepsis. Thus, in a comparative analysis in human and pigs, we have characterized the dynamics of the different Treg subtypes in peripheral blood after polytrauma.

MATERIALS AND METHODS

Ethics

The patient study was performed in the University Hospital Frankfurt, Goethe-University, Germany, with the institutional ethical committee approval (312/10) in accordance with the Declaration of Helsinki and following STROBE-guidelines (37). The signed written informed consent form was obtained from all patients or their legally authorized representatives as well as from all included healthy volunteers. Twenty severely injured TP with an ISS ≥ 16 were enrolled. Exclusion criteria were age (younger than 18 or older than 80 years), acute myocardial stroke, cancer or chemotherapy, immunosuppressive drug therapy, HIV, infectious Hepatitis, acute CMV infection, and/or thromboembolic events. Upon admittance to the ED, vital signs were controlled and the ISS was calculated using the abbreviated injury scale (AIS) as of 2008 (38, 39). Ten healthy volunteers (HV) were included in the control group (ctrl). In total for the human study, the group size was $n = 30$.

All animal experiments were authorized by the responsible government authority ("Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz": LANUV-NRW, Germany: AZ TV-Nr.: 84-02.04.2014.A265) and performed in compliance with the federal German law paying attention to the protection of animals. Animal experiments were performed at the Institute for Laboratory Animal Science & Experimental Surgery, RWTH Aachen University, Germany. Institutional Guidelines and the criteria in "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Eighth Edition The National Academies Press, 2011) were followed (40). All animals were handled in accordance with the ARRIVE guidelines (41). In total for the animal study, the group size was $n = 10$.

Animals Experiments

Ten male German landrace pigs (*Sus scrofa*; 3 months old, 30 ± 5 kg) from a disease-free barrier breeding facility were included in this study and placed in air conditioned rooms for at least 7 days before the experiments. Prior experimentation, all animals were examined by a veterinarian, had free access to water, and were fasted overnight. For the benefit of the principles of the 3Rs (Replacement, Refinement, and Reduction), *in vivo* data presented in this manuscript were collected in the context of a larger study previously described in detail by Horst et al. (42).

Animals were pre-medicated with an intramuscular application of Azaperone (4 mg/kg, StresniTM, Janssen, Germany). Anesthesia was induced (3 mg/kg) and maintained with an intravenous injection of Propofol followed by orotracheal intubation (7.5 ch tube, Hi-Lo LanzTM) as described previously, and the animals were anesthetized during the whole observational

period (42). Ventilated on volume-control mode (Draeger, Evita, Lübeck, Germany) with lung-protective ventilation as described before was applied (42). Catheters were aseptically inserted in the external jugular vein for fluids administration, anesthesia, and continuous monitoring of central venous pressure (CVP, central venous catheter 4-Lumen Catheter, 8.5 Fr., ArrowCatheter, Teleflex Medical, Germany), the right femoral vein to induce hemorrhagic shock (3-Lumen hemodialysis, 12.0 Fr., ArrowCatheter, Teleflex Medical, Germany) and into the femoral artery for blood pressure monitoring (4.0 Fr. arterial line catheter, Vygon, Germany). A urinary catheter in the bladder was used (12.0 Fr, Cystofix, Braun, Melsungen, Germany). For fluid management, crystalloid fluid (Sterofundin ISO[®]) were continuously applied (2 ml kg/BW/h). Prior to experimentation and after instrumentation and calibration all baseline measurements were performed.

Polytrauma was induced as described previously (42). Briefly, the animal was positioned on the right side and a femur fracture was induced with a bolt shot on the right hind leg (Blitz-Kerner, turbocut JOBB GmbH, Germany, 9×17 , Dynamit Nobel AG, Troisdorf, Germany). Placed back in the dorsal position, the animals underwent blunt thoracic trauma with a bolt shot on the right dorsal lower thorax. Thereafter, a midline-laparotomy and a crosswise incision of the caudal liver lobe ($4.5 \text{ cm} \times 4.5 \text{ cm}$) induced an uncontrolled bleeding for 30 s. The liver was packed using sterile gauze-compresses ($10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$). Hemorrhagic shock was induced by withdrawing blood from right the femoral artery until a mean arterial blood pressure of 40 ± 5 mm Hg was reached, and maintained for 90 min. During the shock phase, the animals reached a hypothermic state.

At the end of the polytrauma phase, resuscitation in accordance with established trauma guidelines (43, 44) by adjusting FiO₂ to baseline values, and re-infusing the withdrawn blood and additional fluids (Sterofundin ISO[®]; 2 ml kg/BW/h) followed (45, 46). Rewarming using a forced-air warming system until normothermia ($38.7\text{--}39.8^\circ\text{C}$) was applied (45). Clinical treatment of the open femur fracture was performed according to established trauma guidelines (44). Intensive care and complications management was applied according to the standardized clinical protocols from the latest recommendations of the European Resuscitation Council and Advanced Trauma Life Support (43). After the observational period for 72 h, the animals were euthanized by potassium chloride injection.

Blood Sampling

Blood samples were withdrawn in prechilled ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) in pigs before trauma induction as control (ctrl), immediately after trauma induction (AT), 24 h (D1) and 72 h (D3) later. In TP blood samples were withdrawn in EDTA tubes directly after admission to the ED (AT) and 24 as well as 72 h later. The samples were kept on ice until their staining for flow cytometric analyses. Blood counts were obtained by standard clinical methods using the Sysmex XE-2100 automated blood cell counter (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Germany) and are indicated as mean absolute cell count of leukocyte cells (ACL).

Staining for Flow Cytometry

Human blood samples (100 μ l) were transferred into polystyrene FACS tubes (BD Pharmingen™) and 5 μ l of the mouse anti-human CD4 Brilliant Violet 421 (Clone RPA-T4), mouse anti-human CD25 APC-Cy7 (Clone BC96), and mouse anti-human CD127 PerCP-Cy5.5 (Clone HIL-7R-M21, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) conjugated antibodies were added for 30 min at room temperature. Porcine blood samples were treated according to the same protocol, but other antibodies were used: mouse anti-pig CD4a Alexa Fluor® 647 (Clone 74-12-4, BD), mouse anti-pig CD25 (Mx405-conjugated) (Clone K231.3B2, Bio-Rad Antibodies, formerly known as AbD Serotec, Hercules, CA, USA), and polyclonal anti-IL7R FITC (CD127, antikoerper-online GmbH, Aachen, Germany). After the incubation, 2 ml phosphate buffered saline (PBS) was added and centrifugation at 400 $\times$ g for 5 min followed. Then, supernatants were removed and the samples were incubated 100 μ l Fix & Perm Solution A (FIX&PERM Kit, An Der Grub) for 15 min at room temperature. Two milliliters of PBS were added and centrifugation at 400 $\times$ g for 5 min followed. Supernatants were removed and samples were incubated with 100 μ l Fix & Perm Solution B and 5 μ l of either monoclonal antibody FoxP3 PE-Cy7 (Clone PCH101) in human, or monoclonal antibody FoxP3 PE-Cyanine7 (Clone FJK-16s, Affymetrix eBiosciences, Santa Clara, CA, USA) in porcine samples for 30 min at room temperature. Subsequently, 2 ml of FACS lysing solution (FACS Lysing Solution, BD Pharmingen™) were added for additional 10 min. Centrifugation at 400 $\times$ g for 5 min, resuspension in 4 ml PBS supplemented with 0.5% bovine serum albumin (FACS buffer) and another centrifugation at 400 $\times$ g for 5 min followed. After removing the supernatants, cells were diluted in 500 μ l FACS buffer and subjected to flow cytometric analyses using a BD FACS Canto 2™ and FACSDIVA™ software (BD). Lymphocytes were defined by gating in the corresponding forward and side scatter scan. The percentage of positive cells of the gated was determined.

Statistical Analyses

The power analysis was conducted using an alpha of 0.05, a power of 0.80 for a two-tailed test. GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used to perform the statistical analysis. Data are given as mean and SEM in percentage of gated parent population. Normality distribution was assessed by D'Agostino–Pearson normality test. Then, Mann–Whitney *U* test or the matched-pair statistical analysis by using repeated measures ANOVA (Friedman test) with a Dunn's *post hoc* test were applied to compare the differences between the groups. A *p*-value below 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Study Population

Twenty TP and 10 HV were enrolled. The majority of the study subjects were male (TP: 75% vs. HV: 70%). The mean age was 39.0 $\pm$ 3.5 in TP vs. 35.8 $\pm$ 4.0 in HV. Falls caused 40% of the mechanism of injury. All patients were substantially injured with

a mean ISS of 30.5 $\pm$ 1.8. Within the patient cohort 40.0% had a head AIS $\geq$ 3 and 55.0% a chest AIS $\geq$ 3. Only one patient had an abdomen AIS $\geq$ 3 and 30.0% of patients had severe injuries of extremities. The mean stay in the intensive care unit was 10.8 $\pm$ 4.2 days. The in-hospital stay was 24.7 $\pm$ 5.7 days. Patients included in this study represent the cohort of major TP as shown in our previous studies (47, 48).

Absolute Leukocyte Counts

Absolute cell counts of leukocytes were significantly increased after trauma compared to HV (12.4 $\pm$ 1.2 vs. 7.2 $\pm$ 0.9 cells $\times 10^3/\mu$ l, *p* < 0.05). After 24 h and 3 days, leukocyte counts decreased to levels within the reference area (Figure 1).

Compared to controls, the absolute cell counts of porcine leukocytes significantly increased after trauma. Leukocytes decreased at D1 and D3, while the decrease at D3 was significant compared to ctrl (AT: 24.2 $\pm$ 2.3 and D3: 11.9 $\pm$ 1.3 vs. 16.7 $\pm$ 2.3 cells $\times 10^3/\mu$ l, *p* < 0.05, Figure 1).

CD4⁺ T Cells

The percentage of human CD4⁺ cells of all leukocytes was significantly reduced after trauma compared to HV (6.4 $\pm$ 0.9% vs. 16.5 $\pm$ 1.4%, *p* < 0.05; ACL: 1,181.1 vs. 792.5). A minimum value was reached in TP after 24 h (D1: 4.3 $\pm$ 0.6%, *p* < 0.05 vs. HV; ACL: 418.9 vs. 792.5). At the end of observation period, a significant difference in TP compared to HV was observed (6.1 $\pm$ 0.8% vs. HV, *p* < 0.05, Figures 2A,C; ACL: 567.6 vs. 792.5).

Compared to controls, the proportion of porcine CD4⁺ cells of all leukocytes showed a significant reduction after trauma and after 24 h (AT: 7.3 $\pm$ 0.6% and D1: 10.1 $\pm$ 1.3% vs. 14.4 $\pm$ 1.1%, *p* < 0.05; ACL: 2,413.4 vs. 1,773.4 and 1,430.4). At D3 after trauma no significant difference compared to ctrl were observed in pigs (Figures 2B,C). However, the mean absolute cell count remained at lower level at D3 (1,745.7).

Total Lymphocytes

The proportion of patients' lymphocytes to all leukocytes significantly decreased after trauma compared to HV (16.3 $\pm$ 2.2

FIGURE 1 | Analysis of absolute cell counts of leukocytes in human and porcine peripheral blood after polytrauma. Control samples were obtained from healthy volunteers (HV) or prior trauma (ctrl). Means and SEM are shown. AT: immediately after trauma; D1: 24 h after trauma; D3: 72 h after trauma; polytrauma patients: *n* = 20, HV: *n* = 10, animals: *n* = 10; *: significantly different (*p* < 0.05) to HV or ctrl, respectively.

vs. $35.7 \pm 2.3\%$, $p < 0.05$; ACL: 2,013.4 vs. 2,556.5), and a significant reduction remained at D1 and D3 in polytrauma patients compared to HV (10.2 ± 1.8 and $12.1 \pm 1.8\%$, respectively, vs. $35.7 \pm 2.3\%$, $p < 0.05$), **Figures 3A,B**; (ACL: 1,006.6 and 1,121.3 vs. 2,556.5).

The proportion of porcine lymphocytes of all leukocytes significantly decreased after trauma and at D1 compared to ctrl (23.8 ± 51.1 and $35.52 \pm 4.8\%$, respectively, vs. $51.1 \pm 3.3\%$, $p < 0.05$, **Figures 3A,B**; ACL: 5,766.7 and 5,015.4 vs. 8,562.7). At D3, the proportion of lymphocytes to leukocytes was comparable in polytraumatized pigs compared to ctrl (**Figures 3A,B**). However, the mean absolute cell count remained at lower level at D3 (6,545.0).

CD4⁺ Lymphocytes

While the proportion of CD4⁺ lymphocytes of all lymphocytes was significantly reduced after trauma and at D1 in patients compared to HV (38.1 ± 2.6 and $35.8 \pm 3.1\%$, respectively, vs. $45.6 \pm 2.2\%$, $p < 0.05$; ACL: 766.5 and 360.2 vs. 1,165.5), no significant difference in percentages was observed at D3 (**Figures 3C,D**). However, the mean absolute cell count remained at lower level at D3 (523.6).

During the complete observational period of time, the proportion of CD4⁺ lymphocytes of all lymphocytes was significantly reduced in polytraumatized pigs compared to ctrl (AT: $27.6 \pm 0.7\%$, D1: $26.4 \pm 0.9\%$, and D3: $25.9 \pm 0.7\%$,

respectively, vs. $29.8 \pm 0.5\%$ in ctrl, $p < 0.05$, **Figures 3C,D**; ACL: 2,591.6, 1,324.1 and 1,693.8 vs. 2,551.6).

CD4⁺CD25⁺ Regulatory to CD4⁺ T Cells-Ratio

The proportion of CD4⁺CD25⁺ to CD4⁺ cells significantly decreased directly after trauma and remained significantly lowered at D1 and D3 in patients compared with HV (AT: $5.7 \pm 0.9\%$, D1: $6.1 \pm 1.6\%$, and D3: $4.8 \pm 0.9\%$, respectively, vs. $10.53 \pm 2.1\%$ in HV, $p < 0.05$, **Figures 4A–D,I**; ACL: 43.5, 21.9, and 25.3 vs. 122.7).

Immediately after trauma, and at D1 and D3 the proportion of CD4⁺CD25⁺ to CD4⁺ cells was significantly lower in pigs compared to ctrl (AT: $6.0 \pm 0.7\%$, D1: $4.6 \pm 1.1\%$, and D3: $3.5 \pm 0.8\%$, respectively, vs. $10.55 \pm 1.5\%$ in ctrl, $p < 0.05$, **Figures 4E–H,I**; ACL: 95.8, 61.5, and 59.8 vs. 269.2).

CD25⁺FoxP3⁺ Regulatory to CD4⁺ T Cells-Ratio

Compared to controls, the percentage of CD25⁺FoxP3⁺ cells of all CD4⁺ cells decreased significantly after trauma and during the complete observational period in patients compared with HV (AT: $1.0 \pm 0.2\%$, D1: $1.5 \pm 0.6\%$, and D3: $0.9 \pm 0.2\%$, respectively, vs. $3.2 \pm 0.7\%$ in HV, $p < 0.05$, **Figures 5A–E,K**; ACL: 7.6, 5.4, and 4.9 vs. 38.9).

The proportion of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells of all CD4⁺ cells was significantly lower at all analyzed time-points after trauma compared to ctrl in pigs (AT: $0.5 \pm 0.1\%$, D1: $0.6 \pm 0.2\%$ and D3: $0.6 \pm 0.3\%$, respectively, vs. $1.5 \pm 0.4\%$ in ctrl, *p* < 0.05, **Figures 5F–J,K**; ACL: 7.7, 7.9, and 10.2 vs. 37.9).

CD25⁺CD127[−] Regulatory to CD4⁺ T Cells-Ratio

After trauma, the proportion of CD25⁺CD127[−] cells of all CD4⁺ cells dropped significantly at all analyzed time-points in patients compared with HV (AT: $3.5 \pm 0.5\%$, D1: $3.5 \pm 0.8\%$ and D3: $3.4 \pm 0.6\%$, respectively, vs. $7.2 \pm 1.6\%$ in HV, *p* < 0.05, **Figures 6A–E,K**; ACL: 26.6, 12.7, and 17.7 vs. 83.9).

The significant decrease of cells with a CD4⁺CD25⁺CD127[−] subset in all CD4⁺ cells was observed in polytraumatized pigs during the whole observational period compared to ctrl (AT: $4.9 \pm 0.7\%$, D1: $4.6 \pm 1.1\%$, and D3: $3.5 \pm 1.0\%$, respectively, vs. $9.1 \pm 1.4\%$ in ctrl, *p* < 0.05, **Figures 6F–J,K**; ACL: 78.8, 60.9, and 60.0 vs. 232.0).

CD127[−] Cells of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatory Cells

No significant changes of the proportion of CD127[−] cells of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ appeared throughout the experiments in

polytrauma patients compared to HV (AT: $60.4 \pm 5.2\%$, D1: $57.0 \pm 8.1\%$, and D3: $58.1 \pm 5.3\%$, respectively, vs. $64.3 \pm 5.0\%$ in HV, *p* < 0.05, **Figure 7**).

The proportion of porcine CD127[−] cells of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ did not change significantly throughout the experiments compared to ctrl (AT: $74.5 \pm 6.0\%$, D1: $70.8 \pm 6.8\%$ and D3: $64.5 \pm 9.0\%$, respectively, vs. $69.6 \pm 6.1\%$ in ctrl, *p* < 0.05, **Figure 7**).

DISCUSSION

In the present study, we characterized a porcine Treg subtype CD4⁺CD25⁺CD127[−] because a better differentiation of Treg from contaminating cell populations with similar expression patterns would allow for more precise and in-depth research. Furthermore, we compared blood kinetics of Treg between polytraumatized patients and a porcine model of polytrauma. It became clear that both the proportion of CD4⁺ cells and lymphocytes of all leukocytes were significantly lowered in peripheral blood samples after trauma. While this effect persisted in polytraumatized patients, a recovery in percentage, but not in absolute cell counts as comparable to patients, has been observed in pigs at 72 h after polytrauma. The proportion of CD4⁺ lymphocytes of all lymphocytes was significantly reduced immediately after trauma and after 24 h in TP, while such reduction was observed

during the complete observational time period in pigs after polytrauma. Here again, absolute cell counts were reduced in both patients and pigs during the complete observational period. With regard to Treg, a significant reduction of each population CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, or CD4⁺CD25⁺CD127⁺ cells was detectable after polytrauma in both patients and animals. Furthermore, no significant changes occurred in the proportion of CD127⁺ cells of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells neither in humans nor in pigs. Therefore, we revealed that the early post-traumatic lymphocyte dynamics appear comparable between human and pigs after polytrauma. Furthermore, the various Treg subsets, which are commonly used for the Treg research, appear to have comparable immunophenotypes as well as dynamics between these two species.

Polytrauma induces a complex host immune response to tissue injury, a parallel pro- and anti-inflammatory state, bearing an elevated risk for infectious complications and/or MOF (5, 11, 49). Regulatory T cells play an important role in the orchestration of self-tolerance and immune reaction. Moreover, they have an important but not yet profoundly characterized role

during the post-traumatic inflammation, and may, therefore, be an important determinant of the extent and/or severity of the post-traumatic immunosuppression as well (14, 50). Our understanding of basic immune mechanisms in hyperinflammatory states has much improved over the last decades, leading to a significant advancement in the clinical management during the first, predominantly hyperinflammatory phase (15). However, the immunosuppression is much less well understood, although it constitutes a severe clinical problem, since most patients dying in septic shock show signs of immunosuppression (51). Consequently, an important step in the treatment of infectious complications such as sepsis after trauma would imply an individualized therapy, considering interpersonal differences regarding long-term and acute immune status as well as the extent of trauma, the so-called trauma load or infection. We might be able to do so once we manage to obtain a detailed characterization of both immunosuppressive and immunostimulatory processes after trauma, as well as of specific clinical signs or immunological markers differentiating the patient's state (11, 28, 51, 52). Therefore, we have characterized and analyzed the dynamics of

currently known subsets of Treg, which may play an important role in the post-traumatic immunosuppression, and thereby the recovery from trauma.

In addition to detailed immune-surveillance data from patients, clinically relevant trauma models are required for this characterization. Also, any clinical intervention may have catastrophic consequences in the complex and critical post-traumatic situation. Therefore, preclinical evidence is essential. Murine models have been criticized for their inaccuracy in representing the human organism, especially regarding the immune system (31, 32, 53). Seok et al. systemically assessed the correlation of immune reactions caused by different insults (burn, trauma, and application of endotoxemia) to the human and the murine immune system (31). While in humans, they found a rather uniform pattern of immune reactions and changes of gene expression in immune effector cells, the patterns in mice were much less uniform and, more importantly, strongly different from the human situation, though there were some promising approaches (31, 54, 55). These demonstrated that gene expression patterns in mouse models closely recapitulated those in human inflammatory conditions and, moreover, strongly argued for the utility of mice as animal models of human disorders (54, 55). Summarized, a profound and specific characterization of models, and of species that are genetically more relevant due to their comparability to human inflammatory responses, is required. Porcine models

not only offer practical clinical advantages over mice, but may also reflect the human situation much more adequately. The size of pigs provides large amounts of samples and allows for surgical procedures that are established in human medicine to be performed in experiments. Regarding anatomy, physiology, and genetics, pigs are more closely related to humans than rodents (32). The conservation of homology and structural motifs from pig, mice, and humans revealed that the similarity to human proteins was significantly higher for pigs (78%) compared to mouse (73%) (56). Data from numerous groups show the advantages of porcine models regarding wound healing (34), infectious diseases including sepsis (32), and immunological mechanisms involved in trauma and inflammation (53). Over the last few years, porcine models have, thus, especially gained the attention of researchers focusing on post-traumatic immunological stress (57–59). By strengthening the comparability of porcine and human immune systems, our findings may have implications for a range of further studies utilizing this model. In the literature, most experiments aimed to describe the post-traumatic immune function are conducted with patient-derived cells and rodent models, while only little work has been performed in other *in vivo* systems (23, 27). Most of these studies were performed with mice or rats (60–63). Thus, increased knowledge of the porcine model may help that specifically studies on the highly clinically relevant immunosuppression and inflammatory reactions after trauma will be

performed in adequate model systems. Therefore, this study was initiated to better characterize Treg in pigs and to perform a comparability analysis with data obtained from patients after polytrauma.

A small number of studies investigated Treg in particular, but never in an experiment lasting longer than 4 h after trauma (22, 64).

The porcine long-term polytrauma model with terminal analyses at 48 h after trauma has been described before, while Treg have never been addressed in a comparable trauma model before (65). In both, human as well as porcine polytrauma scenario, a general decrease in lymphocytes was observed in the present study. This effect may be explained by the post-traumatic cortisol release in order to confine the organism's proinflammatory response to trauma. As a strong anti-inflammatory agent, it causes a discharge of neutrophils especially from the bone marrow and induces apoptosis in lymphocytes (66). In addition an increased extravasation of Treg into both lymphoid and non-lymphoid organs may explain these data. Therefore, further studies dealing with this issue are warranted. Regarding Treg specifically, a significant reduction of each analyzed subset was detected after trauma CD4⁺CD25⁺ (Figure 4), CD25⁺FoxP3⁺ (Figure 5), and CD25⁺CD127⁻ cells (Figure 6), and more importantly, it was visible in both patients and animals, strongly suggesting comparable Treg dynamics in both species after polytrauma. Our data are in line with the results obtained from a trauma model in rats conducted by Dai et al., consisting of a bilateral femur fracture and hemorrhagic shock (22). A significantly lower number of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg could be shown 4 h after trauma, when compared to ctrl and healthy controls (22). Experiments by other groups showed different results. MacConmara et al. reported no

increase in the percentage of CD4⁺CD25⁺ Treg out of all CD4⁺ cells directly after trauma in humans, but a significant increase of their share on day 7 after trauma (19). Despite no changes in the percentage of Treg, the authors found a progressive increase in Treg suppressive activity regarding T cell proliferation in patients after severe trauma. Compared to Treg from healthy controls and patients 1 day after injury, CD4⁺CD25^{high} Treg from 7 days after injury had a significantly higher suppressive potency (19). In a mouse burn injury model, the suppressive potential of Treg from peripheral lymphoid tissues was assessed by examining the proliferation rate of lymph node cells (67). On day 1 after trauma, the Treg suppressive potential did not significantly differ in injured animals, while on day 7 after trauma, CD4⁺CD25⁺ Treg from injured mice exhibited a significantly increased activity compared to sham (67). In a porcine burn injury-induced sepsis model Zu et al. showed significantly decreased CD4⁺CD25⁺ Treg apoptosis rate in intestinal lymph nodes, demonstrating that the intestinal Treg may play an important role in the intestinal immune barrier system after severe burn injuries (68). In the last two studies, only the positive expression of CD4 and CD25 was used to characterize Treg, and due to this study design, it is not assured that specifically pure Treg were evaluated. In our study, we did not evaluate the immunosuppressive activity and functionality of Treg, and this remains to be elucidated in further studies. Gupta et al. found no significant change in the percentage of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg in blood samples collected instantly after admittance to ED from patients suffering from trauma (ISS = 18.71 ± 8.48) and hemorrhagic shock (23). However, we have included only severe polytrauma in both TP and pigs. Trauma load itself may have a significant influence on the Treg kinetics. Albertsmeier et al. found no significant change in the numbers of circulating CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg two and 24 h after surgical trauma as compared to pre-operative cell counts (69). However, this study included a different trauma mechanism as well and, therefore, cannot reflect the polytrauma scenario. Analysis of peripheral blood withdrawn from patients with severe thoracic trauma revealed the percentage of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg in T-helper cells to be significantly higher than in healthy individuals from the first day until 3 weeks after trauma (27). In another study conducted on rats, Gore et al. compared the effects of lung contusion and the combination of lung contusion and hemorrhagic shock on peripheral CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg concentration. Trauma caused no significant difference from control animals and furthermore no significant difference between the two trauma groups was observed (70). Summarized, these studies and our own data underline the importance of the adequate trauma model, and furthermore, they indicate that the trauma load as well as the trauma mechanism may play important roles for the Treg dynamics.

In addition, the comparable phenotyping of Treg is important, and due to differentially phenotyped Treg, the knowledge on this population is currently widely limited in the setting of polytrauma. Since the low expression of CD127 in CD4⁺CD25⁺ Treg was first described in 2006, it is increasingly used for their characterization (24, 71). Approximately 70% of porcine CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, and 65% of human CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells, respectively, were negative for CD127. In comparison,

Seddiki et al. found 84% of CD4⁺CD25⁺ cells to be CD127^{low} in human peripheral blood (71). However, the authors did not stratify for the FoxP3 positive cells. Due to the fact, that no significant changes occurred in the proportion of CD127⁻ cells of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells neither in humans nor in pigs after polytrauma, it appears reasonable, that these cells constitute the identical cell population.

Treg have not been a major focus of trauma research so far, but as they present themselves as a key player in many immune responses, they should be considered for more in-depth research in future. This could not only help to understand the etiology of the pathological post-traumatic immune response, but also, by the potential development of tools to influence the activity and/or functionality of Treg, new therapeutic models may be found to effectively alter immune responses at a profound level in general, as well as during the processes underlying, e.g., SIRS and sepsis (72, 73). Besides, markers to identify their state of action might shed light on the immunological status of polytraumatized patients. As we only assessed Treg in peripheral blood, the comparison to the situation in traumatized tissue might hold promising insights into their behavior after trauma. Cytokines that are important for Treg functionality (e.g., IL-2) or are secreted by them (e.g., IL-10, TGFβ, IL-35), respectively, could be investigated in both peripheral blood and traumatized tissue to further understand the interplay between Treg and other players of the immune response.

Limitations of study certainly include several methodical issues. Also due to the limited hardware settings, we did not include additional analyses, such as the live/dead cell discrimination assay or functional analyses. Furthermore, the intensities of the staining sometimes appear somewhat low, and though the instrumental settings were performed by using isotype controls as well as unstained samples, this fact limits the interpretations of certain cell populations. Another potentially interesting issue may be the gender-based difference in the Treg immunophenotyping. In this study 20 TP (15 males vs. 5 females) and 10 healthy volunteers (7 males vs. 3 females) have been included, and no potential gender-based differences were found. However, the power is not enough to verify any female-vs.-male differences. This certainly remains an interesting point for the future studies.

The porcine polytrauma model has been introduced in recent years, but due to its practical benefits, such as great amounts of samples and applicability of techniques used in human medicine, and the similarity of human and porcine immune systems, it has caused much attention and will surely play an important role in future. Our results strengthen the significance and reliability of the porcine model by characterizing similarities in immunophenotypes between porcine and human Treg after polytrauma.

TREAT RESEARCH GROUP

B. Auner, Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, University Hospital Frankfurt, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany; **L. Egerer**, Department of Trauma Surgery, Technical University Munich, Germany; **M. V. Griensven**, Department of Trauma Surgery, Technical University Munich, Germany; **A. Haug**, Department of Trauma

Surgery, Technical University Munich, Germany; **F. Hildebrand**, Department of Orthopaedic Trauma, RWTH Aachen University, Germany; **K. Horst**, Department of Orthopaedic Trauma, RWTH Aachen University, Germany; **M. Huber-Lang**, Institute of Clinical and Experimental Trauma-Immunology, University of Ulm, Germany; **Y. Kalbas**, Department of Orthopaedic Trauma Surgery, University Hospital Zurich, University of Zurich, Switzerland; **M. Kalbitz**, Department of Orthopedic Trauma, Hand-, Plastic-, and Reconstructive Surgery, University of Ulm, Germany; **G. Marx**, Department of Intensive Care and Intermediate Care, RWTH Aachen University, Germany; **I. Marzi**, Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, University Hospital Frankfurt, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany; **H. C. Pape**, Department of Orthopaedic Trauma Surgery, University Hospital Zurich, University of Zurich, Switzerland; **R. Pfeifer**, Department of Orthopaedic Trauma Surgery, University Hospital Zurich, University of Zurich, Switzerland; **K. Reiss**, Institute of Pharmacology and Toxicology, RWTH Aachen University, Germany; **B. Relja**, Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, University Hospital Frankfurt, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany; **T. P. Simon**, Department of Intensive Care and Intermediate Care, RWTH Aachen University, Germany; **P. Störmann**, Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, University Hospital Frankfurt, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany; **M. Teuben**, Department of Orthopaedic Trauma Surgery, University Hospital Zurich, University of Zurich, Switzerland; **R. Tolba**, Institute for Laboratory Animal Science and Experimental Surgery, RWTH Aachen University, Germany; **S. Uhlig**, Institute of Pharmacology and Toxicology, RWTH Aachen University, Germany.

ETHICS STATEMENT

All information have been provided in the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BR designed the study, obtained the ethical approval for human analyses, established the methods, performed the statistical analysis, and revised the manuscript. RS, the first author collected samples, carried out analyses, and made the first draft of the manuscript. RS, the first author, LS and MT collected the samples from the animal experiments and carried out analyses. RS and DH collected the samples from the human experiments and carried out analyses. EO contributed significantly to the sample analyses. MT, KH, PS, RP, YK, TPS carried out animal experiments. HCP, FH, and IM contributed intellectually to the completion of the study.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the student assistants of the Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, University Hospital Frankfurt, Goethe-University, for their help in obtaining samples from patients. We thank Kerstin Konradowitz and Katrin Jurida for the outstanding technical assistance. Furthermore, the authors thank Hannah Lücken for her assistance in conducting the animal experiments. Project no. S-14-14P was supported by the *Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen* (AO) Foundation. Thanks to all members of the TREAT research group. Parts of this study were performed within the study consortium of the TREAT Research Group.

REFERENCES

- de Munter L, Polinder S, Lansink KW, Cnossen MC, Steyerberg EW, de Jongh MA. Mortality prediction models in the general trauma population: a systematic review. *Injury* (2017) 48(2):221–9. doi:10.1016/j.injury.2016.12.009
- Soreide K. Epidemiology of major trauma. *Br J Surg* (2009) 96(7):697–8. doi:10.1002/bjs.6643
- Peden M, Hyder A. Road traffic injuries are a global public health problem. *BMJ* (2002) 324(7346):1153. doi:10.1136/bmj.324.7346.1153
- Lefering R, Paffrath T, Bouamra O, Coats TJ, Woodford M, Jenks T, et al. Epidemiology of in-hospital trauma deaths. *Eur J Trauma Emerg Surg* (2012) 38(1):3–9. doi:10.1007/s00068-011-0168-4
- Wutzler S, Lustenberger T, Relja B, Lehnert M, Marzi I. [Pathophysiology of multiple trauma: intensive care medicine and timing of treatment]. *Chirurg* (2013) 84(9):753–8. doi:10.1007/s00104-013-2477-0
- Rossaint J, Zarbock A. Pathogenesis of multiple organ failure in sepsis. *Crit Rev Immunol* (2015) 35(4):277–91. doi:10.1615/CritRevImmunol.2015015461
- Ciesla DJ, Moore EE, Johnson JL, Burch JM, Cothren CC, Sauaia A. A 12-year prospective study of postinjury multiple organ failure: has anything changed? *Arch Surg* (2005) 140(5):432–8; discussion 438–40. doi:10.1001/archsurg.140.5.432
- Fröhlich M, Lefering R, Probst C, Paffrath T, Schneider MM, Maegele M, et al. Epidemiology and risk factors of multiple-organ failure after multiple trauma: an analysis of 31,154 patients from the TraumaRegister DGU. *J Trauma Acute Care Surg* (2014) 76(4):921–7; discussion 927–8. doi:10.1097/TA.0000000000000199
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* (2016) 315(8):801–10. doi:10.1001/jama.2016.0287
- Osuka A, Ogura H, Ueyama M, Shimazu T, Lederer JA. Immune response to traumatic injury: harmony and discordance of immune system homeostasis. *Acute Med Surg* (2014) 1(2):6. doi:10.1002/ams2.17
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* (2013) 13(12):862–74. doi:10.1038/nri3552
- Hotchkiss RS, Opal S. Immunotherapy for sepsis – a new approach against an ancient foe. *N Engl J Med* (2010) 363(1):87–9. doi:10.1056/NEJMcibr1004371
- Marik PE, Flemmer M. The immune response to surgery and trauma: implications for treatment. *J Trauma Acute Care Surg* (2012) 73(4):801–8. doi:10.1097/TA.0b013e318265cf87
- Venet F, Chung CS, Monneret G, Huang X, Horner B, Garber M, et al. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol* (2008) 83(3):523–35. doi:10.1189/jlb.0607371
- Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* (2008) 14(1–2):64–78. doi:10.2119/2007-00102.Monneret
- Grant CR, Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D, Longhi MS. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and – yet – unanswered questions. *Autoimmun Rev* (2015) 14(2):105–16. doi:10.1016/j.autrev.2015.05.007
- Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* (1996) 184(2):387–96. doi:10.1084/jem.184.2.387
- Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells – a brief history and perspective. *Eur J Immunol* (2007) 37(Suppl 1):S116–23. doi:10.1002/eji.200737593
- MacConmara MP, Maung AA, Fujimi S, McKenna AM, Delisle A, Lapchak PH, et al. Increased CD4+ CD25+ T regulatory cell activity in trauma patients

- depresses protective Th1 immunity. *Ann Surg* (2006) 244(4):514–23. doi:10.1097/01.sla.0000239031.06906.1f
20. Wing JB, Sakaguchi S. Multiple treg suppressive modules and their adaptability. *Front Immunol* (2012) 3:178. doi:10.3389/fimmu.2012.00178
 21. Bin Dhuban K, Kornete M, Mason ES, Piccirillo CA. Functional dynamics of Foxp3(+) regulatory T cells in mice and humans. *Immunol Rev* (2014) 259(1):140–58. doi:10.1111/imr.12168
 22. Dai H, Sun T, Liu Z, Zhang J, Zhou M. The imbalance between regulatory and IL-17-secreting CD4(+)T cells in multiple-trauma rat. *Injury* (2013) 44(11):1521–7. doi:10.1016/j.injury.2013.03.015
 23. Gupta DL, Bhoi S, Mohan T, Galwnkar S, Rao DN. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with post traumatic sepsis. *Cytokine* (2016) 88:2144–21. doi:10.1016/j.cyto.2016.09.010
 24. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szt GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* (2006) 203(7):1701–11. doi:10.1084/jem.20060772
 25. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzari E, Manetti R, Vanini V, et al. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med* (2002) 196(3):379–87. doi:10.1084/jem.20020110
 26. Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106(32):13445–50. doi:10.1073/pnas.0901944106
 27. Zhang Y, Li XF, Wu W, Chen Y. Dynamic changes of circulating T-helper cell subsets following severe thoracic trauma. *Int J Clin Exp Med* (2015) 8(11):21106–13.
 28. Okeke EB, Uzonna JE. In search of a cure for sepsis: taming the monster in critical care medicine. *J Innate Immun* (2016) 8(2):156–70. doi:10.1159/000442469
 29. Arens C, et al. Sepsis-induced long-term immune paralysis – results of a descriptive, explorative study. *Crit Care* (2016) 20:93. doi:10.1186/s13054-016-1233-5
 30. Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* (2004) 172(5):2731–8. doi:10.4049/jimmunol.172.5.2731
 31. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110(9):3507–12. doi:10.1073/pnas.1222878110
 32. Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerdts V. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol* (2012) 20(1):50–7. doi:10.1016/j.tim.2011.11.002
 33. Summerfield A. Special issue on porcine immunology: an introduction from the guest editor. *Dev Comp Immunol* (2009) 33(3):265–6. doi:10.1016/j.dci.2008.07.014
 34. Seaton M, Hocking A, Gibran NS. Porcine models of cutaneous wound healing. *ILAR J* (2015) 56(1):127–38. doi:10.1093/ilar/ilv016
 35. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen* (2001) 9(2):66–76. doi:10.1046/j.1524-475x.2001.00066.x
 36. Mair KH, Sedlak C, Käser T, Pasternak A, Levast B, Gerner W, et al. The porcine innate immune system: an update. *Dev Comp Immunol* (2014) 45(2):321–43. doi:10.1016/j.dci.2014.03.022
 37. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, et al. The Strengthening of Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol* (2008) 61(4):344–9. doi:10.1016/j.jclinepi.2007.11.008
 38. Rating the severity of tissue damage. I. The abbreviated scale. *JAMA* (1971) 215(2):277–80.
 39. Thomas A, Gennarelli EW. *The Abbreviated Injury Scale 2005. Update 2008*. Des Plaines, IL: American Association for Automotive Medicine (AAAM) (2008). 2008 p.
 40. Worleijn JM, et al. The eighth edition of the guide for the care and use of laboratory animals (2011); implications for behavioral management. *Am J Primatol* (2011) 73:98.
 41. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* (2010) 8(6):e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
 42. Horst K, Simon TP, Pfeifer R, Teuben M, Almahmoud K, Zhi Q, et al. Characterization of blunt chest trauma in a long-term porcine model of severe multiple trauma. *Sci Rep* (2016) 6:39659. doi:10.1038/srep39659
 43. Advanced trauma life support (ATLS(R)): the ninth edition. *J Trauma Acute Care Surg* (2013) 74(5):1363–6. doi:10.1097/01586154-201305000-00026
 44. German-Trauma-Society, S3 – guideline on treatment of patients with severe and multiple injuries: AWMF-Registry No. 012/019. (2016). Available from: <http://www.awmf.org/leitlinien/aktuelle-leitlinien/ll-liste/deutsche-gesellschaft-fuer-unfallchirurgie-ev.html> (accessed July 15, 2017).
 45. Majde JA. Animal models for hemorrhage and resuscitation research. *J Trauma* (2003) 54(5 Suppl):S100–5. doi:10.1097/01.TA.0000064503.24416.F4
 46. Bossaert L, O'Connor RE, Arntz HR, Brooks SC, Diercks D, Feitosa-Filho G, et al. Part 9: acute coronary syndromes: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations. *Resuscitation* (2010) 81(Suppl 1):e175–212. doi:10.1016/j.resuscitation.2010.09.001
 47. Sturm R, Heftrig D, Mörs K, Wagner N, Konradowicz K, Jurida K, et al. Phagocytizing activity of PMN from severe trauma patients in different post-traumatic phases during the 10-days post-injury course. *Immunobiology* (2017) 222(2):301–7. doi:10.1016/j.imbio.2016.09.010
 48. Heftrig D, Sturm R, Oppermann E, Konradowicz K, Jurida K, Schimunek L, et al. Impaired surface expression of HLA-DR, TLR2, TLR4, and TLR9 in ex vivo-in vitro stimulated monocytes from severely injured trauma patients. *Mediators Inflamm* (2017) 2017:2608349. doi:10.1155/2017/2608349
 49. Wafaisade A, Lefering R, Bouillon B, Sakka SG, Thamm OC, Paffrath T, et al. Epidemiology and risk factors of sepsis after multiple trauma: an analysis of 29,829 patients from the Trauma Registry of the German Society for Trauma Surgery. *Crit Care Med* (2011) 39(4):e21–8. doi:10.1097/CCM.0b013e318206d3df
 50. Jiang LN, Yao YM, Sheng ZY. The role of regulatory T cells in the pathogenesis of sepsis and its clinical implication. *J Interferon Cytokine Res* (2012) 32(8):341–9. doi:10.1089/jir.2011.0080
 51. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet E, Debarb AL, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* (2006) 32(8):1175–83. doi:10.1007/s00134-006-0204-8
 52. Skirecki T, Borkowska-Zielińska U, Zlotorowicz M, Hoser G. Sepsis immunopathology: perspectives of monitoring and modulation of the immune disturbances. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* (2012) 60(2):123–35. doi:10.1007/s00005-012-0166-1
 53. Fairbairn L, Kapetanovic R, Sester DP, Hume DA. The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *J Leukoc Biol* (2011) 89(6):855–71. doi:10.1189/jlb.1110607
 54. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) 112(10):E1163–7. doi:10.1073/pnas.1502188112
 55. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) 112(4):1167–72. doi:10.1073/pnas.1401965111
 56. Dawson H. A comparative assessment of the pig, mouse, and human genomes: a structural and functional analysis of genes involved in immunity. In: McNulty PA, Dayan A, Hastings KH, Ganderup NC, editors. *The Minipig in Biomedical Research*. Boca Raton, FL: CRC Press (2011). p. 321–41.
 57. Horst K, Hildebrand F, Pfeifer R, Hübenthal S, Almahmoud K, Sassen M, et al. Impact of haemorrhagic shock intensity on the dynamic of alarmins release in porcine poly-trauma animal model. *Eur J Trauma Emerg Surg* (2016) 42(1):67–75. doi:10.1007/s00068-015-0504-1
 58. Nelson DW, Porta CR, McVay DP, Salgar SK, Martin MJ. Effects of histone deacetylase inhibition on 24-hour survival and end-organ injury in a porcine trauma model: a prospective, randomized trial. *J Trauma Acute Care Surg* (2013) 75(6):1031–9. doi:10.1097/TA.0b013e31829d01bf
 59. Lundeland B, Gundersen Y, Opstad PK, Thrane I, Zhang Y, Olausson RW, et al. Severe gunshot injuries in a porcine model: impact on central markers of innate immunity. *Acta Anaesthesiol Scand* (2011) 55(1):28–34. doi:10.1111/j.1399-6576.2010.02351.x
 60. Osuka A, Hanschen M, Stoecklein V, Lederer JA. A protective role for inflammation activation following injury. *Shock* (2012) 37(1):47–55. doi:10.1097/SHK.0b013e318234f7ff

61. Hsieh CH, Frink M, Hsieh YC, Kan WH, Hsu JT, Schwacha MG, et al. The role of MIP-1 alpha in the development of systemic inflammatory response and organ injury following trauma hemorrhage. *J Immunol* (2008) 181(4):2806–12. doi:10.4049/jimmunol.181.4.2806
62. Weckbach S, Hohmann C, Braumueller S, Denk S, Klohs B, Stahel PF, et al. Inflammatory and apoptotic alterations in serum and injured tissue after experimental polytrauma in mice: distinct early response compared with single trauma or “double-hit” injury. *J Trauma Acute Care Surg* (2013) 74(2):489–98. doi:10.1097/TA.0b013e31827d5f1b
63. Neunaber C, Oestern S, Andruszkow H, Zeckey C, Mommsen P, Kutter D, et al. Cytokine productive capacity of alveolar macrophages and Kupffer cells after femoral fracture and blunt chest trauma in a murine trauma model. *Immunol Lett* (2013) 152(2):159–66. doi:10.1016/j.imlet.2013.05.012
64. Hanschen M, Tajima G, O’Leary F, Ikeda K, Lederer JA. Injury induces early activation of T-cell receptor signaling pathways in CD4+ regulatory T cells. *Shock* (2011) 35(3):252–7. doi:10.1097/SHK.0b013e3181f489c5
65. Horst K, Eschbach D, Pfeifer R, Hubenthal S, Sassen M, Steinfeldt T, et al. Local inflammation in fracture hematoma: results from a combined trauma model in pigs. *Mediators Inflamm* (2015) 2015:126060. doi:10.1155/2015/126060
66. Lord JM, Midwinter MJ, Chen YF, Belli A, Brohi K, Kovacs EJ, et al. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *Lancet* (2014) 384(9952):1455–65. doi:10.1016/S0140-6736(14)60687-5
67. Ni Cholleain N, MacConnara M, Zang Y, Murphy TJ, Mannick JA, Lederer JA. Enhanced regulatory T cell activity is an element of the host response to injury. *J Immunol* (2006) 176(1):225–36. doi:10.4049/jimmunol.176.1.225
68. Zu H, Li Q, Huang P. Expression of Treg subsets on intestinal T cell immunity and endotoxin translocation in porcine sepsis after severe burns. *Cell Biochem Biophys* (2014) 70(3):1699–704. doi:10.1007/s12013-014-0116-0
69. Albertsmeier M, Quaiser D, von Dossow-Hanfingl V, Winter H, Faist E, Angele MK. Major surgical trauma differentially affects T-cells and APC. *Innate Immun* (2015) 21(1):55–64. doi:10.1177/1753425913516659
70. Gore AV, Bible LE, Song K, Livingston DH, Mohr AM, Sifri ZC. Mesenchymal stem cells increase T-regulatory cells and improve healing following trauma and hemorrhagic shock. *J Trauma Acute Care Surg* (2015) 79(1):48–52; discussion 52. doi:10.1097/TA.0000000000000681
71. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* (2006) 203(7):1693–700. doi:10.1084/jem.20060468
72. Lopez-Pastrana J, Shao Y, Chernaya V, Wang H, Yang XF. Epigenetic enzymes are the therapeutic targets for CD4(+)CD25(+/high)Foxp3(+) regulatory T cells. *Transl Res* (2015) 165(1):221–40. doi:10.1016/j.trsl.2014.08.001
73. Smigiel KS, Srivastava S, Stolley JM, Campbell DJ. Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation. *Immunol Rev* (2014) 259(1):40–59. doi:10.1111/imr.12170

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Serve, Sturm, Schimunek, Störmann, Heftrig, Teuben, Oppermann, Horst, Pfeifer, Simon, Kalbas, Pape, Hildebrand, Marzi and Relja. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

8 Literaturverzeichnis der übergreifenden

Zusammenfassung

1. de Munter, L., et al., *Mortality prediction models in the general trauma population: A systematic review*. Injury, 2016.
2. Soreide, K., *Epidemiology of major trauma*. Br J Surg, 2009. **96**(7): p. 697-8.
3. Sakran, J.V., et al., *Care of the injured worldwide: trauma still the neglected disease of modern society*. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2012. **20**: p. 64.
4. Alberdi, F., et al., *Epidemiology of severe trauma*. Med Intensiva, 2014. **38**(9): p. 580-8.
5. Beck, B., et al., *Differences in the epidemiology of out-of-hospital and in-hospital trauma deaths*. PLoS One, 2019. **14**(6): p. e0217158.
6. Søreide, K., et al., *Epidemiology and Contemporary Patterns of Trauma Deaths: Changing Place, Similar Pace, Older Face*. World Journal of Surgery, 2007. **31**(11): p. 2092-2103.
7. Rauf, R., et al., *Changes in the temporal distribution of in-hospital mortality in severely injured patients-An analysis of the TraumaRegister DGU*. PLoS One, 2019. **14**(2): p. e0212095.
8. Lefering, R., et al., *Epidemiology of in-hospital trauma deaths*. Eur J Trauma Emerg Surg, 2012. **38**(1): p. 3-9.
9. Wutzler, S., et al., *[Pathophysiology of multiple trauma : intensive care medicine and timing of treatment]*. Chirurg, 2013. **84**(9): p. 753-8.
10. Frohlich, M., et al., *Epidemiology and risk factors of multiple-organ failure after multiple trauma: an analysis of 31,154 patients from the TraumaRegister DGU*. J Trauma Acute Care Surg, 2014. **76**(4): p. 921-7; discussion 927-8.
11. Lord, J.M., et al., *The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment*. The Lancet, 2014. **384**(9952): p. 1455-1465.
12. Huber-Lang, M., J.D. Lambris, and P.A. Ward, *Innate immune responses to trauma*. Nat Immunol, 2018. **19**(4): p. 327-341.
13. Vourc'h, M., A. Roquilly, and K. Asehnoune, *Trauma-Induced Damage-Associated Molecular Patterns-Mediated Remote Organ Injury and Immunosuppression in the Acutely Ill Patient*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1330.
14. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 801-10.
15. Sauaia, A., F.A. Moore, and E.E. Moore, *Postinjury Inflammation and Organ Dysfunction*. Crit Care Clin, 2017. **33**(1): p. 167-191.
16. Rossaint, J. and A. Zarbock, *Pathogenesis of Multiple Organ Failure in Sepsis*. Crit Rev Immunol, 2015. **35**(4): p. 277-91.
17. Eppensteiner, J., et al., *Immunothrombotic Activity of Damage-Associated Molecular Patterns and Extracellular Vesicles in Secondary Organ Failure Induced by Trauma and Sterile Insults*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 190.
18. Hutchings, L., et al., *Defining multiple organ failure after major trauma: A comparison of the Denver, Sequential Organ Failure Assessment, and Marshall scoring systems*. J Trauma Acute Care Surg, 2017. **82**(3): p. 534-541.
19. Sauaia, A., et al., *Temporal trends of postinjury multiple-organ failure: still resource intensive, morbid, and lethal*. J Trauma Acute Care Surg, 2014. **76**(3): p. 582-92, discussion 592-3.
20. Hotchkiss, R.S., G. Monneret, and D. Payen, *Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(12): p. 862-74.

21. Hotchkiss, R.S. and S. Opal, *Immunotherapy for sepsis--a new approach against an ancient foe*. N Engl J Med, 2010. **363**(1): p. 87-9.
22. Gentile, L.F., et al., *Persistent inflammation and immunosuppression*. Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 2012. **72**(6): p. 1491-1501.
23. Osuka, A.O., H; Ueyama, M; Shimazu T; Lederer JA., *Immune response to traumatic injury: harmony and discordance of immune system homeostasis*. Acute Medicine & Surgery, 2014. **1**(2): p. 6.
24. Hazeldine, J., et al., *Prehospital immune responses and development of multiple organ dysfunction syndrome following traumatic injury: A prospective cohort study*. PLoS Med, 2017. **14**(7): p. e1002338.
25. Marik, P.E. and M. Flemmer, *The immune response to surgery and trauma: Implications for treatment*. J Trauma Acute Care Surg, 2012. **73**(4): p. 801-8.
26. Lu, H.X., et al., *Development and validation of a novel predictive score for sepsis risk among trauma patients*. World J Emerg Surg, 2019. **14**: p. 11.
27. Fathi, M., N. Markazi-Moghaddam, and A. Ramezankhani, *A systematic review on risk factors associated with sepsis in patients admitted to intensive care units*. Aust Crit Care, 2019. **32**(2): p. 155-164.
28. Park, J.-H., et al., *Risk factors for sepsis in Korean trauma patients*. European Journal of Trauma and Emergency Surgery, 2016. **42**(4): p. 453-458.
29. Lakomkin, N., et al., *Incidence and predictive risk factors of postoperative sepsis in orthopedic trauma patients*. J Orthop Traumatol, 2017. **18**(2): p. 151-158.
30. Venet, F., et al., *Regulatory T cell populations in sepsis and trauma*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(3): p. 523-35.
31. Grant, C.R., et al., *Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and--yet--unanswered questions*. Autoimmun Rev, 2015. **14**(2): p. 105-16.
32. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes*. Immunology, 1970. **18**(5): p. 723-37.
33. Sakaguchi, S., K. Wing, and M. Miyara, *Regulatory T cells - a brief history and perspective*. Eur J Immunol, 2007. **37 Suppl 1**: p. S116-23.
34. Sakaguchi, S., *Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance*. Cell, 2000. **101**(5): p. 455-8.
35. Asano, M., et al., *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation*. The Journal of Experimental Medicine, 1996. **184**(2): p. 387-396.
36. Tadokoro, C.E., et al., *Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+T cells and dendritic cells in vivo*. The Journal of Experimental Medicine, 2006. **203**(3): p. 505-511.
37. Askenasy, N., *Enhanced killing activity of regulatory T cells ameliorates inflammation and autoimmunity*. Autoimmunity Reviews, 2013. **12**(10): p. 972-975.
38. Monneret, G., et al., *Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony*. Mol Med, 2008. **14**(1-2): p. 64-78.
39. Stockis, J., R. Roychoudhuri, and T.Y.F. Halim, *Regulation of regulatory T cells in cancer*. Immunology, 2019. **157**(3): p. 219-231.
40. Panduro, M., C. Benoist, and D. Mathis, *Tissue Tregs*. Annu Rev Immunol, 2016. **34**: p. 609-33.
41. Sakai, R., et al., *Regulatory T Cells: Pathophysiological Roles and Clinical Applications*. Keio J Med, 2020. **69**(1): p. 1-15.

42. MacConmara, M.P., et al., *Increased CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity*. Ann Surg, 2006. **244**(4): p. 514-23.
43. Wing, J.B. and S. Sakaguchi, *Multiple treg suppressive modules and their adaptability*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 178.
44. Bin Dhuban, K., et al., *Functional dynamics of Foxp3(+) regulatory T cells in mice and humans*. Immunol Rev, 2014. **259**(1): p. 140-58.
45. Dai, H., et al., *The imbalance between regulatory and IL-17-secreting CD4(+)T cells in multiple-trauma rat*. Injury, 2013. **44**(11): p. 1521-7.
46. Gupta, D.L., et al., *Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with post traumatic sepsis*. Cytokine, 2016. **88**: p. 214-221.
47. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
48. Annunziato, F., et al., *Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 379-87.
49. Tran, D.Q., et al., *GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3⁺ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13445-50.
50. Zhang, Y., et al., *Dynamic changes of circulating T-helper cell subsets following severe thoracic trauma*. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015. **8**(11): p. 21106-21113.
51. Dominguez-Villar, M. and D.A. Hafler, *Regulatory T cells in autoimmune disease*. Nat Immunol, 2018. **19**(7): p. 665-673.
52. Okeke, E.B. and J.E. Uzonna, *In Search of a Cure for Sepsis: Taming the Monster in Critical Care Medicine*. J Innate Immun, 2016. **8**(2): p. 156-70.
53. Arens, C., et al., *Sepsis-induced long-term immune paralysis – results of a descriptive, explorative study*. Critical Care, 2016. **20**: p. 93.
54. Masopust, D., C.P. Sivula, and S.C. Jameson, *Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice To Understand Human Immunology*. J Immunol, 2017. **199**(2): p. 383-388.
55. Laudanski, K., et al., *Potential Pitfalls of the Humanized Mice in Modeling Sepsis*. Int J Inflam, 2018. **2018**: p. 6563454.
56. Mestas, J. and C.C.W. Hughes, *Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology*. The Journal of Immunology, 2004. **172**(5): p. 2731-2738.
57. Seok, J., et al., *Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(9): p. 3507-12.
58. Meurens, F., et al., *The pig: a model for human infectious diseases*. Trends Microbiol, 2012. **20**(1): p. 50-7.
59. Summerfield, A., *Special issue on porcine immunology: an introduction from the guest editor*. Dev Comp Immunol, 2009. **33**(3): p. 265-6.
60. Seaton, M., A. Hocking, and N.S. Gibran, *Porcine models of cutaneous wound healing*. ILAR J, 2015. **56**(1): p. 127-38.
61. Klein, G.L., et al., *Preliminary evidence of early bone resorption in a sheep model of acute burn injury: an observational study*. J Bone Miner Metab, 2014. **32**(2): p. 136-41.
62. Tang, F.B., et al., *Xuebijing injection treatment inhibits vasopermeability and reduces fluid requirements in a canine burn model*. Eur J Trauma Emerg Surg, 2017. **43**(6): p. 875-882.
63. Sheppard, F.R., et al., *Development of a Nonhuman Primate (Rhesus Macaque) Model of Uncontrolled Traumatic Liver Hemorrhage*. Shock, 2015. **44** Suppl 1: p. 114-22.

64. Frink, M., et al., *Experimental trauma models: an update*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 797383.
65. Sullivan, T.P., et al., *The pig as a model for human wound healing*. Wound Repair Regen, 2001. **9**(2): p. 66-76.
66. Mair, K.H., et al., *The porcine innate immune system: an update*. Dev Comp Immunol, 2014. **45**(2): p. 321-43.
67. von Elm, E., et al., *The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies*. J Clin Epidemiol, 2008. **61**(4): p. 344-9.
68. Worlein, J.M., et al., *The Eighth Edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011); Implications for Behavioral Management*. American Journal of Primatology, 2011. **73**: p. 98-98.
69. Kilkenny, C., et al., *Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research*. PLoS Biol, 2010. **8**(6): p. e1000412.
70. *Rating the severity of tissue damage. I. The abbreviated scale*. Jama, 1971. **215**(2): p. 277-80.
71. Thomas A. Gennarelli, E.W., *The Abbreviated Injury Scale 2005. Update 2008*. American Association for Automotive Medicine (AAAM), Des Plaines, IL 2008. 2008.
72. Horst, K., et al., *Characterization of blunt chest trauma in a long-term porcine model of severe multiple trauma*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 39659.
73. *Advanced trauma life support (ATLS(R)): the ninth edition*. J Trauma Acute Care Surg, 2013. **74**(5): p. 1363-6.
74. German-Trauma-Society, *S3 – Guideline on Treatment of Patients with Severe and Multiple Injuries*. 2016.
75. Majde, J.A., *Animal models for hemorrhage and resuscitation research*. J Trauma, 2003. **54**(5 Suppl): p. S100-5.
76. Bossaert, L., et al., *Part 9: Acute coronary syndromes: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations*. Resuscitation, 2010. **81 Suppl 1**: p. e175-212.
77. Sturm, R., et al., *Phagocytizing activity of PMN from severe trauma patients in different post-traumatic phases during the 10-days post-injury course*. Immunobiology, 2017. **222**(2): p. 301-307.
78. Heftrig, D., et al., *Impaired Surface Expression of HLA-DR, TLR2, TLR4, and TLR9 in Ex Vivo-In Vitro Stimulated Monocytes from Severely Injured Trauma Patients*. Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 2608349.
79. Alberti, C., et al., *Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study*. Intensive Care Med, 2002. **28**(2): p. 108-21.
80. Zhang, H., et al., *The common promoter polymorphism rs11666254 downregulates FPR2/ALX expression and increases risk of sepsis in patients with severe trauma*. Crit Care, 2017. **21**(1): p. 171.
81. Manning, J., *Sepsis in the Burn Patient*. Crit Care Nurs Clin North Am, 2018. **30**(3): p. 423-430.
82. Monneret, G., et al., *How Clinical Flow Cytometry Rebooted Sepsis Immunology*. Cytometry A, 2019. **95**(4): p. 431-441.
83. Brun-Buisson, C., et al., *The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired sepsis*. Intensive Care Medicine, 2003. **29**(9): p. 1464-1471.

84. Fairbairn, L., et al., *The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(6): p. 855-71.
85. Godec, J., et al., *Compendium of Immune Signatures Identifies Conserved and Species-Specific Biology in Response to Inflammation*. Immunity, 2016. **44**(1): p. 194-206.
86. Takao, K. and T. Miyakawa, *Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(4): p. 1167-72.
87. *Correction for Takao and Miyakawa, Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(10): p. E1163-7.
88. Guillon, A., et al., *Preclinical septic shock research: why we need an animal ICU*. Ann Intensive Care, 2019. **9**(1): p. 66.
89. Abdullahi, A., S. Amini-Nik, and M.G. Jeschke, *Animal models in burn research*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(17): p. 3241-55.
90. Xiong, Y., A. Mahmood, and M. Chopp, *Animal models of traumatic brain injury*. Nat Rev Neurosci, 2013. **14**(2): p. 128-42.
91. Vink, R., *Large animal models of traumatic brain injury*. J Neurosci Res, 2018. **96**(4): p. 527-535.
92. Swindle, M.M., et al., *Swine as models in biomedical research and toxicology testing*. Vet Pathol, 2012. **49**(2): p. 344-56.
93. Bailey, K.L. and M.A. Carlson, *Porcine Models of Pancreatic Cancer*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 144.
94. Spurlock, M.E. and N.K. Gabler, *The development of porcine models of obesity and the metabolic syndrome*. J Nutr, 2008. **138**(2): p. 397-402.
95. Dawson, H., *A Comparative Assessment of the Pig, Mouse and Human Genomes*, in *The Minipig in Biomedical Research*. 2011, CRC Press. p. 323-342.
96. Sinkora, M. and J.E. Butler, *Progress in the use of swine in developmental immunology of B and T lymphocytes*. Dev Comp Immunol, 2016. **58**: p. 1-17.
97. Habicht, G.S., *Body temperature in normal and endotoxin-treated mice of different ages*. Mech Ageing Dev, 1981. **16**(1): p. 97-104.
98. Dawson, H.D., et al., *An in-depth comparison of the porcine, murine and human inflammasomes; lessons from the porcine genome and transcriptome*. Vet Microbiol, 2017. **202**: p. 2-15.
99. Mills, K.H. and V. Gerdt, *Mouse and pig models for studies of natural and vaccine-induced immunity to Bordetella pertussis*. J Infect Dis, 2014. **209** Suppl 1: p. S16-9.
100. Kapetanovic, R., et al., *Pig bone marrow-derived macrophages resemble human macrophages in their response to bacterial lipopolysaccharide*. J Immunol, 2012. **188**(7): p. 3382-94.
101. Horst, K., et al., *Impact of haemorrhagic shock intensity on the dynamic of alarmins release in porcine poly-trauma animal model*. Eur J Trauma Emerg Surg, 2016. **42**(1): p. 67-75.
102. Nelson, D.W., et al., *Effects of histone deacetylase inhibition on 24-hour survival and end-organ injury in a porcine trauma model: a prospective, randomized trial*. J Trauma Acute Care Surg, 2013. **75**(6): p. 1031-9.
103. Lundeland, B., et al., *Severe gunshot injuries in a porcine model: impact on central markers of innate immunity*. Acta Anaesthesiol Scand, 2011. **55**(1): p. 28-34.

104. Stormann, P., et al., *Monotrauma is associated with enhanced remote inflammatory response and organ damage, while polytrauma intensifies both in porcine trauma model*. Eur J Trauma Emerg Surg, 2019.
105. Schimunek, L., et al., *Early decreased TLR2 expression on monocytes is associated with their reduced phagocytic activity and impaired maturation in a porcine polytrauma model*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0187404.
106. Kalbitz, M., et al., *Cardiac Depression in Pigs after Multiple Trauma - Characterization of Posttraumatic Structural and Functional Alterations*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 17861.
107. Goschl, L., C. Scheinecker, and M. Bonelli, *Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies*. Semin Immunopathol, 2019. **41**(3): p. 301-314.
108. Boothby, I.C., J.N. Cohen, and M.D. Rosenblum, *Regulatory T cells in skin injury: At the crossroads of tolerance and tissue repair*. Sci Immunol, 2020. **5**(47).
109. Hong, J. and B.S. Kim, *Regulatory T Cell-Mediated Tissue Repair*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1064**: p. 221-233.
110. Denstaedt, S.J., B.H. Singer, and T.J. Standiford, *Sepsis and Nosocomial Infection: Patient Characteristics, Mechanisms, and Modulation*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2446.
111. Suzuki, T., et al., *Androstenediol ameliorates alterations in immune cells cytokine production capacity in a two-hit model of trauma-hemorrhage and sepsis*. Cytokine, 2006. **34**(1-2): p. 76-84.
112. Huynh, T., et al., *Proinflammatory kupffer cell alterations after femur fracture trauma and sepsis in rats*. Shock, 2000. **14**(5): p. 555-60.
113. Jiao, Y., S. Tan, and J. Xiong, *Proteomic changes of CD4(+)/CD25(+)/forkhead box p3(+) regulatory T cells in a 30-day rat model of sepsis survival*. Exp Ther Med, 2017. **14**(6): p. 5619-5628.
114. Tatura, R., et al., *Relevance of Foxp3(+) regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis*. Immunology, 2015. **146**(1): p. 144-56.
115. Hein, F., et al., *The relationship between CD4+CD25+CD127- regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states*. Crit Care, 2010. **14**(1): p. R19.
116. Leng, F.Y., et al., *Increased proportion of CD4(+)/CD25(+)/Foxp3(+) regulatory T cells during early-stage sepsis in ICU patients*. J Microbiol Immunol Infect, 2013. **46**(5): p. 338-44.
117. Wu, H.P., et al., *Associations of T helper 1, 2, 17 and regulatory T lymphocytes with mortality in severe sepsis*. Inflamm Res, 2013. **62**(8): p. 751-63.
118. Huang, H., et al., *High circulating CD39(+) regulatory T cells predict poor survival for sepsis patients*. Int J Infect Dis, 2015. **30**: p. 57-63.
119. Osuka, A., et al., *A protective role for inflammasome activation following injury*. Shock, 2012. **37**(1): p. 47-55.
120. Hsieh, C.H., et al., *The role of MIP-1 alpha in the development of systemic inflammatory response and organ injury following trauma hemorrhage*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2806-12.
121. Weckbach, S., et al., *Inflammatory and apoptotic alterations in serum and injured tissue after experimental polytrauma in mice: distinct early response compared with single trauma or "double-hit" injury*. J Trauma Acute Care Surg, 2013. **74**(2): p. 489-98.

122. Neunaber, C., et al., *Cytokine productive capacity of alveolar macrophages and Kupffer cells after femoral fracture and blunt chest trauma in a murine trauma model*. Immunol Lett, 2013. **152**(2): p. 159-66.
123. Horst, K., et al., *Local inflammation in fracture hematoma: results from a combined trauma model in pigs*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 126060.
124. Cheadle, W.G., et al., *Lymphocyte subset responses to trauma and sepsis*. J Trauma, 1993. **35**(6): p. 844-9.
125. Manson, J., et al., *Early changes within the lymphocyte population are associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in trauma patients*. Crit Care, 2016. **20**(1): p. 176.
126. Bolton, P.M., S.M. Kirov, and K.J. Donald, *The effects of major and minor trauma on lymphocyte kinetics in mice*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1979. **57**(5): p. 479-92.
127. Manson, J., et al., *Innate-Like Lymphocytes Are Immediate Participants in the Hyper-Acute Immune Response to Trauma and Hemorrhagic Shock*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1501.
128. Yeager, M.P., et al., *Trauma and inflammation modulate lymphocyte localization in vivo: quantitation of tissue entry and retention using indium-111-labeled lymphocytes*. Crit Care Med, 2000. **28**(5): p. 1477-82.
129. Gore, A.V., et al., *Mesenchymal stem cells increase T-regulatory cells and improve healing following trauma and hemorrhagic shock*. J Trauma Acute Care Surg, 2015. **79**(1): p. 48-52; discussion 52.
130. Albertsmeier, M., et al., *Major surgical trauma differentially affects T-cells and APC*. Innate Immun, 2015. **21**(1): p. 55-64.
131. Li, M., et al., *Role of regulatory T cell in clinical outcome of traumatic brain injury*. Chin Med J (Engl), 2015. **128**(8): p. 1072-8.
132. Zu, H., Q. Li, and P. Huang, *Expression of Treg subsets on intestinal T cell immunity and endotoxin translocation in porcine sepsis after severe burns*. Cell Biochem Biophys, 2014. **70**(3): p. 1699-704.
133. Zhang, C., et al., *'Repair' Treg Cells in Tissue Injury*. Cell Physiol Biochem, 2017. **43**(6): p. 2155-2169.
134. Nosbaum, A., et al., *Cutting Edge: Regulatory T Cells Facilitate Cutaneous Wound Healing*. J Immunol, 2016. **196**(5): p. 2010-4.
135. Sturm, R., et al., *Regulatory T Cells Modulate CD4 Proliferation after Severe Trauma via IL-10*. J Clin Med, 2020. **9**(4).
136. Seddiki, N., et al., *Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1693-700.
137. Lopez-Pastrana, J., et al., *Epigenetic enzymes are the therapeutic targets for CD4(+)CD25(+/-high)Foxp3(+) regulatory T cells*. Transl Res, 2015. **165**(1): p. 221-40.
138. Smigiel, K.S., et al., *Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation*. Immunol Rev, 2014. **259**(1): p. 40-59.
139. Ge, Y., et al., *Interleukin-38 protects against sepsis by augmenting immunosuppressive activity of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells*. J Cell Mol Med, 2020. **24**(2): p. 2027-2039.
140. Ge, Y., et al., *Interleukin-36 β activates autophagy of CD4+CD25+ regulatory T cells and inhibits its immunosuppressive activity in sepsis*. J Infect Dis, 2020.
141. Nadeem, A., et al., *Blockade of interleukin-2-inducible T-cell kinase signaling attenuates acute lung injury in mice through adjustment of pulmonary Th17/Treg*

immune responses and reduction of oxidative stress. Int Immunopharmacol, 2020.
83: p. 106369.