

**Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie
der Universität Tübingen Abteilung Immunologie
Abteilungsleiter: Professor Dr. rer. nat. H.-G. Rammensee**

**Untersuchung der Lymphozyteninfiltrate in implantierte
PVA-Schwämme nach der Therapie infizierter Wunden mit
Vakuumversiegelung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen**

**vorgelegt von
MELANIE JUDITH EBERLE
aus Urach, jetzt Bad Urach**

2004

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. C. Müller

Meiner lieben Grossmutter Marianne

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Physiologie der Wundheilung	1
1.2	Pathophysiologie der Wundheilung	5
1.3	Vacuum-Assisted Closure Therapie	10
1.4	Zielsetzung	13
2	Material und Methoden	17
2.1	Patienten und Schwammmaterialien	17
2.2	Immunhistochemie	20
2.3	Isolierung der mononukleären Zellen aus den Schwämmen und dem peripheren Blut	20
2.4	Durchflusszytometrie	21
2.5	Hitzeinaktivierte Bakterien	21
2.6	Funktionelle Analysen der SMZ	22
2.6.1	Analyse der Lebensfähigkeit der Schwamm-T-Lymphozyten	22
2.6.2	Funktionelle Analyse und Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten	22
2.6.2.1	Prinzip des Zellproliferations-ELISA	23
2.6.2.2	Experimente zur Vorbereitung des Zellproliferations-ELISA	23
2.6.2.2.1	Zellzahl und Inkubationsdauer	23
2.6.2.2.2	Konzentration der hitzeinaktivierten Bakterien	26
2.6.2.3	Wirkung der angewandten Stimuli	28
2.6.3	Differenzierung von Dendritischen Zellen	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Immunhistochemische Analyse der Schwamm-infiltrierenden Zellen	35
3.2	Vergleich der Schwammmaterialien Coldex und Vacuseal	35
3.3	Isolierung der SMZ	39
3.4	Charakterisierung der SMZ	41

3.4.1	Lymphozytenpopulation	41
3.4.2	Makrophagenpopulation und Dendritische Zellen	42
3.5	Funktionelle Analyse der SMZ	46
3.5.1	Analyse der Lebensfähigkeit der Schwamm-T-Lymphozyten	46
3.5.2	Analyse der SMZ auf aktivierte T-Lymphozyten	48
3.5.3	Funktionelle Analyse und Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten	52
3.5.4	Differenzierung von Dendritischen Zellen	52
4	Diskussion	55
4.1	Zusammensetzung des Zellinfiltrates aus PVA-Schwämmen	55
4.1.1	Neutrophile Granulozyten und Erythrozyten	55
4.1.2	Lymphozyten	57
4.1.3	Makrophagen	59
4.1.4	Dendritische Zellen	61
4.2	Funktionelle Analyse der SMZ	62
4.2.1	Aktivität der Schwamm-T-Lymphozyten	62
4.2.2	Funktionalität der Schwamm-T-Lymphozyten	64
4.2.3	Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten	65
4.2.4	Differenzierung von Dendritischen Zellen	66
4.3	Verbesserungs- und Einsatzmöglichkeiten der VAC-Therapie	67
5	Zusammenfassung	75
6	Abkürzungen	77
7	Literaturverzeichnis	81
8	Veröffentlichung	89
9	Danksagung	115
10	Curriculum Vitae	117

1 Einleitung

1.1 Physiologie der Wundheilung

Die Wundheilung besteht aus einer komplexen Kaskade zellulärer und biochemischer Vorgänge, die sich vereinfacht in drei überlappende Phasen aufteilen lassen:

1. Entzündungsphase, 2. Proliferative Phase und 3. Phase der Zell- und Faserreifung.

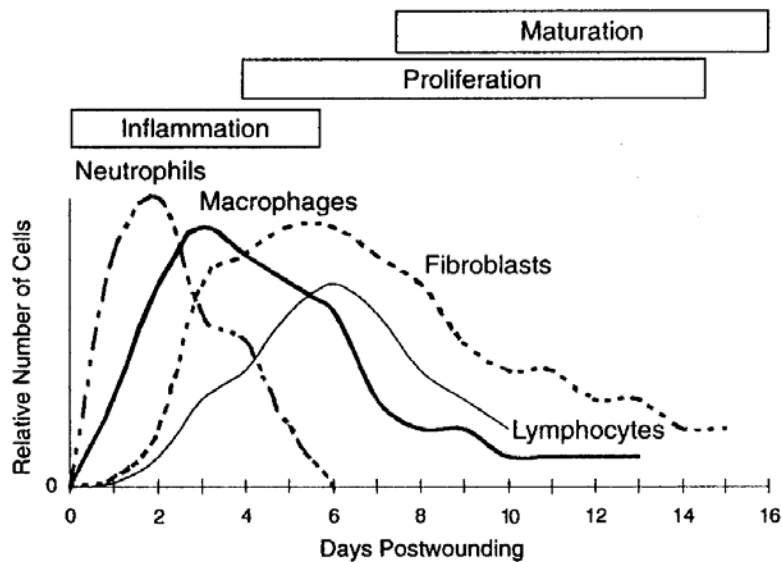


Abb. 1.1: Zeitlicher Ablauf der Infiltration verschiedener Zellarten in physiologisch heilenden Wunden. Neutrophile Granulozyten und Makrophagen sind in der Entzündungsphase, ca. 0.-6. Tag (Syn.: Blutgerinnungsphase, Exsudative Phase, Abräumphase) vorherrschend. Lymphozyten und Fibroblasten immigrieren gegen Ende dieser Phase und dominieren vor allem zu Beginn der Proliferativen Phase, ca. 4.-14. Tag (Syn.: Kollagenphase, Granulationsphase) mit dem Ziel der Neubildung von Granulationsgewebe und erfolgreichem Defektverschluss (Witte und Barbul, 1997).

1. Entzündungsphase, ca. 0.-6. Tag

(Synonyme: Blutgerinnungsphase, Exsudative Phase, Abräumphase)

Nach einer frischen Verletzung setzt unmittelbar eine Blutung und Gerinnung mit dem Ziel der Wundabdichtung ein. Diese wird durch Fibrinausfällung und Thrombozytenaggregation bewirkt. Das vernetzte Fibrin dient unter anderem als Gerüst für infiltrierende Zellen wie Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Fast zeitgleich mit der Blutgerinnung beginnt die für die Wundheilung unentbehrliche Phase der Entzündung. Sie ist charakterisiert durch die lokale Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren mit nachfolgender Verstärkung der Durchblutung, der Gefässpermeabilität, der Zelleinwanderung und der Aktivierung infiltrierter Zellen. Neutrophile Granulozyten wandern, angezogen durch chemotaktisch wirksame Substanzen (Komplementfaktoren, Zytokine, Wachstumsfaktoren), als erste in die Wunde ein (Abb. 1.1). Die grösste Zahl an Neutrophilen Granulozyten findet man am zweiten Tag nach der Zellschädigung. Ihnen folgen die Makrophagen mit einem Maximum am dritten Tag, die Fibroblasten mit einem Maximum am fünften Tag und schliesslich die T-Lymphozyten mit einem Maximum am sechsten Tag (Ross und Benditt, 1962), (Witte und Barbul, 1997). Neutrophile Granulozyten spielen für die Heilung einer nicht infizierten Wunde nur eine untergeordnete Rolle (Simpson und Ross, 1972). Sie werden aber unersetzlich, wenn es darum geht, infizierte Wunden zu reinigen. Ihre hauptsächliche Aufgabe ist die Phagozytose von Bakterien und zerstörtem Zellmaterial (Singer und Clark, 1999). Zerfallen die Neutrophilen Granulozyten, führt dies zur Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, die den weiteren Abbau von untergegangenem Gewebe fördern (Thiede und Eckert, 1994). Interessanterweise wurde den Neutrophilen Granulozyten in jüngster Zeit eine Beteiligung an der Angiogenese nachgewiesen (McCourt et al., 1999). Makrophagen sind für die Wundheilung absolut unentbehrlich. Dies konnte bereits 1975 durch Leibovich und Ross an einem Tiermodell (Schwein) gezeigt werden. Sie verhinderten die Infiltration der Makrophagen in induzierte Wunden, was eine deutlich gestörte Wundheilung zur Folge hatte (Leibovich und Ross, 1975). Weitere *in vitro* Analysen mit Schweine-Makrophagen bestätigten deren Beteiligung an der Regulation der Kollagenmatrixsynthese (Leibovich und Ross, 1976). Heute weiss man, dass

Makrophagen sowohl im Tier, als auch im Menschen Fibronectin, Kollagen, Zelltrümmer und unerwünschte Eindringlinge aus der Wunde entfernen und dass sie Wachstumsfaktoren wie z. B. Transforming growth factor- α (TGF- α) oder Transforming growth factor- β (TGF- β) freisetzen, deren Aufgabe es ist Fibroblasten, Endothelzellen und Lymphozyten zu rekrutieren und zu aktivieren (Rappolee et al., 1988), (Witte und Barbul, 1997), (Cooper, 1999), (Thiede und Eckert, 1994). Bellingan konnte in einem Modell peritonealer Entzündung an Mäusen zeigen, dass Makrophagen in den nächstgelegenen Lymphknoten drainiert werden, vermutlich um den dort vorhandenen T-Lymphozyten Antigene zu präsentieren (Bellingan et al., 1996). Die Rolle der T-Lymphozyten an der Wundheilung ist wenig untersucht. In einem experimentellen Modell an Mäusen konnte gezeigt werden, dass nach der Entfernung aller T-Zellen sowohl die Kollagensynthese als auch die Wundreissfestigkeit stark gestört ist (Peterson et al., 1987), (Efron et al., 1990). Die alleinige Ausschaltung der CD4⁺ T-Zellen hatte keinen Effekt auf die Kollagensynthese und die Reissfestigkeit, während die Entfernung der CD8⁺ T-Zellen zu einer Verbesserung dieser Wundheilungsparameter führte (Barbul et al., 1989). Entfernte man alle CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, so ergab sich eine verbesserte Kollagensynthese und eine stärkere Reissfestigkeit im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Dies lässt auf einen positiven Einfluss der CD4⁻/CD8⁻ T-Lymphozyten (vermutlich γ/δ -T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)) bezüglich der Wundheilung schliessen (Efron et al., 1990). Desweiteren weiss man über T-Lymphozyten, dass sie Wachstumsfaktoren und Zytokine wie z. B. TGF- β , Fibroblast activating factor (FAF), Tumor necrosis factor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ) sezernieren, denen wichtige regulatorische Funktionen bei der Wundheilung, insbesondere bei der Kollagenneusynthese, zugeschrieben werden konnten (Schaffer und Barbul, 1998), (Thiede und Eckert, 1994). B-Lymphozyten scheinen keinen Einfluss auf die Wundheilung zu nehmen, da es bisher nicht gelungen ist, sie in Wunden nachzuweisen (Martin und Muir, 1990). Fibroblasten sind vor allem in der Proliferativen Phase der Wundheilung von essentieller Bedeutung.

2. Proliferative Phase, ca. 4.-14. Tag

(Synonyme: Granulationsphase, Kollagenphase)

Während der Proliferativen Phase vermehren sich besonders Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen mit dem Ziel der Ausbildung von Granulationsgewebe und dem Verschluss der Wunde. Der Stimulus zur Proliferation und Gewebsneubildung wird durch Wachstumsfaktoren und Zytokine gegeben, die unter anderem von aktivierten Thrombozyten, Makrophagen und Lymphozyten stammen. Granulationsgewebe dient als primärer Ersatz von untergegangenem Gewebe, als Grundlage für eine Reepithelialisierung und als Barriere gegen eindringende Erreger. Es entsteht aus ortsständigen Mesenchymzellen, eingewanderten Fibroblasten und Endothelzellen, die von intakten Gefäßen nahe der Wunde einsprossen, um neue Kapillaren zu bilden. Typisch für Granulationsgewebe ist die starke Durchblutung (verbesserte Sauerstoffsituation, tieferer Wundgrund) und die noch ungeordnete und instabile Gewebsstruktur, die mit einer geringen Reißfestigkeit verbunden ist. Epithelzellen bedecken, von den Wundrändern oder unverletzten Epithelinseln aus, die Wundoberfläche mit neuem Epithel. Im Verlauf der Proliferativen Phase beginnt die Reorganisation und Reifung des neuentstandenen Gewebes mit dem Ziel der Festigung der Wunde (Witte und Barbul, 1997), (Thiede und Eckert, 1994).

3. Phase der Zell- und Faserreifung, ca. 8.-20. Tag und länger

(Synonyme: Reparative Phase, Differenzierungsphase)

In der Phase der Zell- und Faserreifung liegt der Schwerpunkt auf der Umorganisation des Granulationsgewebes. Sie dauert auch dann noch an, wenn die Verletzung nach aussen hin schon längst verheilt erscheint. Die Anzahl der Zellen (Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen, Lymphozyten) nimmt ab, der Kollagenfasergehalt steigt deutlich an. Die Kollagenmatrix wird in der folgenden Zeit durch die verbleibenden Fibroblasten und einer Vielzahl von Enzymen (Matrix metalloproteinases (MMPs)), Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)) intensivst umgebaut. Das weniger stabile Kollagen Typ III wird durch das in gesunder Haut vorherrschende, besonders

strapazierfähige Kollagen Typ I ersetzt, welches sich zugleich entsprechend den Hautspannungslinien innerhalb der Wunde anordnet. Diese Differenzierungsvorgänge erfordern eine genau regulierte Balance zwischen Kollagenmatrixsynthese und Kollagenmatrixabbau. Eine mangelhaft kontrollierte Matrixsynthese führt zu gesteigerter Narbenbildung, ein verstärkter Matrixabbau zu verzögerter, insuffizienter Heilung. Im weiteren Verlauf nimmt der Wassergehalt der Wunde ab und es kommt zur Wundkontraktion mit Annäherung der Wundränder. Die Wunde wird unter Kollagenfaserzunahme belastungs- und widerstandsfähiger und geht mit der Zeit von einer gefässreichen, roten in eine gefässarme, blasse Narbe über (Witte und Barbul, 1997), (Cooper, 1999), (Nwomeh et al., 1998). Trotz dieser intensiven Phase der Zell- und Faserreifung gelingt es nicht, die alte Struktur der Haut herzustellen, weswegen die entstandene Narbe maximal 80% der Stärke unbeschädigter Haut erreicht (Witte und Barbul, 1997).

Akute Verletzungen unterliegen einem komplexen Heilungsprozess, der aus einem engen Zusammenspiel von Entzündungs- und Bindegewebszellen sowie deren Mediatoren reguliert wird. Der Zeitraum der ungestörten, physiologischen Wundheilung hängt vor allem von der Grösse des Defektes ab. Kann man nach einer Verletzung die Wundränder wieder direkt aneinander nähen, so muss in der Tiefe der Wunde kein neues Granulationsgewebe gebildet werden. Es kommt zur primären Wundheilung bei der in 95-98% die Wundränder nach durchschnittlich 8 Tagen miteinander verwachsen sind. Grössere Defekte, die keinen direkten Zusammenschluss der Wundränder ermöglichen, erfordern zunächst einen Ersatz des untergegangenen Zellmaterials durch Granulationsgewebe. Der nachfolgende Wundverschluss erfolgt sekundär und kann je nach Ausmass der Wunde 1-2 Wochen oder mehr in Anspruch nehmen (Thiede und Eckert, 1994). Kommt es innerhalb der drei Wundheilungsphasen zu Komplikationen so bringt dies grundsätzlich eine verzögerte Heilung mit sich.

1.2 Pathophysiologie der Wundheilung

Vom klinischen Standpunkt aus werden Gewebsdefekte in akute und chronische Wunden unterteilt. Der Unterschied liegt in der Zeitspanne in der die Wunde heilt, auch

wenn es wegen der verschiedenen Wundgrößen nur annähernde Zeitangaben für die Wundheilung gibt (siehe 1.1 Physiologie der Wundheilung). Eine akute Wunde ist eine frische Gewebsschädigung in der die physiologischen Phasen der Wundheilung ohne Komplikationen ablaufen. Hierdurch kann die anatomische und funktionelle Struktur des Gewebes ohne Verzögerung wieder hergestellt werden. Ist die Heilung einer Wunde unvollständig und unkoordiniert oder bricht eine bereits geheilte Wunde ohne äusseren Einfluss wieder auf, so nennt man das deswegen eine chronische Wunde, weil all diese Prozesse zu einer verzögerten Heilung führen (Cooper, 1999). Es gibt in jeder der drei Heilungsphasen (1. Entzündungsphase, 2. Proliferative Phase und 3. Phase der Zell- und Faserreifung) unzählige Möglichkeiten, wodurch ein erfolgreicher Wundverschluss gestört werden kann. Hypoxie ist zu Beginn der Verletzung ein starker Stimulus für die Proliferation der Fibroblasten und für die Angiogenese. Hält der Sauerstoffmangel jedoch länger an, so wird die Entstehung von Infektionen begünstigt, ausserdem wird jetzt die Fibroblastenproliferation und Kollagensynthese gehemmt. Nährstoff-, Vitamin- und Mineralstoffmangel tragen erheblich zur Verzögerung der Wundheilung bei. Umgekehrt verbrauchen chronische Wunden verstärkt wertvolle Vitamine, Nähr- und Mineralstoffe. Ungeeignete Diäten, einseitige Ernährung, schlechte soziale Umstände, Übelkeit, Schwäche, Chemotherapie und Tumorerkrankungen sind Faktoren, die zu solchen Mangelzuständen führen können. Ebenfalls störend auf die Wundheilung wirken sich verschiedene äussere Faktoren aus. Zu diesen gehören unter anderem unphysiologische Temperaturen, Druck, Scherkräfte, Austrocknen der Wunde, sowie Kontamination durch Speichel, Urin oder Stuhl. Tumoren sollten grundsätzlich bis zu ihrem sicheren Ausschluss als mögliche Differentialdiagnose einer unklaren chronischen Wunde in Betracht gezogen werden, da eine chronische Wunde auch durch Exazerbation z. B. eines malignen Melanoms, eines Mammakarzinoms oder eines Lymphoms zustande kommen kann. Ausserdem haben chronische Wunden aufgrund ihres hohen Zellumsatzes ein erhöhtes Risiko für maligne Entartungen (z. Bsp.: Marjolin's ulcer). Hat der Patient neben der Wunde zusätzliche, systemische Erkrankungen der Niere, der Leber oder des Herzens, so kann dies zu einem ausgiebigen Wundödem führen, welches vor allem die Reepithelialisierung behindert. Dadurch wird die Wunde wiederum empfänglicher für Infektionen. Diabetes mellitus ist eine der häufigsten Krankheiten, die man bei Patienten mit chronischen Wunden findet.

Sie führt unter anderem zu einer schlechteren Sauerstoffversorgung, zu reduzierter Wundreissfestigkeit und zu geschwächter Funktion der Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Immunsupprimierende Erkrankungen wie das Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), Leukämien oder Lymphome reduzieren ebenfalls die Fähigkeit des Immunsystems, Infektionen erfolgreich abzuwehren. Nimmt der Patient regelmässig Medikamente (Steroide, nichtsteroidale Antiphlogistika, Chemotherapeutika) oder raucht er, so trägt auch dies, je nach Menge der aufgenommenen Substanzen und seinem sonstigem Allgemeinzustand, zur Entstehung einer chronischen Wunde bei (Stadelmann et al., 1998), (Cooper, 1999).

Die Wundinfektion ist eine besonders schwerwiegende Störung der Wundheilung. Sie wird durch alle bisher genannten Faktoren begünstigt und stellt nach der Harnwegsinfektion die zweithäufigste im Krankenhaus erworbene (nosokomiale) Infektion dar. Circa 25% aller nosokomialen Infektionen sind Wundinfektionen. Sie werden in der Regel durch Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilze verursacht (Broll, 1994). Allerdings muss betont werden, dass nicht jede mikroorganismische Kontamination gleichzeitig auch einer Infektion entspricht. Das Entstehen einer bakteriellen Infektion zum Beispiel hängt sowohl vom Zustand der Wunde und des Immunsystems des Patienten, als auch von der Virulenz und der Anzahl des Erregers in der Wunde ab. Für die meisten Bakterien beträgt die kritische Anzahl zur Entstehung einer Infektion 10^5 Bakterien pro Gramm Wundgewebe. Findet man mehr als 10^5 Bakterien pro Gramm Gewebe, so sind die Chancen auf eine erfolgreiche Wundheilung ohne geeignete Therapie gering. Nekrotisches oder fremdes Gewebe, Fremdkörper (Gelenkprothesen, Knochenplatten, Knochenschrauben) sowie alle bereits erwähnten Faktoren, die die Entstehung einer chronischen Wunde fördern, senken die Anzahl der für eine Infektion benötigten Bakterien um ein Vielfaches (Stadelmann et al., 1998), (Fry et al., 1998). Das Spektrum der Erreger nosokomialer Wundinfektionen umfasst grampositive, gramnegative und anaerobe Bakterien. Eine 1997 an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen durchgeführte Studie über die Häufigkeit der jeweiligen Erreger nosokomialer Wundinfektionen zeigte, dass beinahe die Hälfte aller untersuchten Wundinfektionen durch *Staphylokokkus aureus* (46,1%) verursacht worden war. *Staphylokokkus epidermidis* machte mit 19,8% den zweitgrössten Anteil aus. Ihm folgten als weitere grosse Erregergruppen Enterokokken

(13,5%), Enterobacteriaceae (11,6%), Streptokokken (10,2%), Anaerobier (10,2%) und *Pseudomonas aeruginosa* (8,3%) (Zabel und Schwab, 1999).

Schafft es der Körper nicht, eine bestehende Wundinfektion zu bekämpfen, so kann es zu einem Übertritt der Erreger in die Blutbahn (Bakteriämie) kommen. Dieses Ereignis alleine besitzt noch keinen Krankheitswert. Es besteht jedoch die Gefahr, dass die Bakteriämie bei fortdauernd schlechter Abwehrlage und hoher Virulenz des Erregers in eine Sepsis mit schweren Allgemeinsymptomen (hohes Fieber, Schüttelfrost, Tachykardie, Tachypnoe) übergeht. Die Sepsis ist eine gefürchtete Komplikation aller Infektionen. Sie führt, wenn nicht frühzeitig erkannt und korrekt behandelt, schnell zum septischen Schock mit Schädigung der parenchymatösen Organe (Leber, Niere, Lungen, Milz), zum Multiorganversagen und letztlich zum Tode (Broll, 1994). Die Letalität der Sepsis liegt bei etwa 25%, die des septischen Schocks bei 70% (Trautmann, 1999). Alle bisher genannten Störungen der Wundheilung führen zu einem gemeinsamen pathophysiologischen Mechanismus, der letztendlich dafür verantwortlich ist, dass die Wunde nur langsam und schlecht heilt. Abb. 1.2 zeigt schematisch den Heilungsprozess einer akuten und einer chronischen Wunde. Herrschen nach einer frischen Verletzung „optimale“ Wundbedingungen, können die drei Phasen der physiologischen Wundheilung ungestört ablaufen. Sind die Wundbedingungen dagegen unzureichend, so führt dies zunächst zu einer langanhaltenden Entzündung, durch die eine ganze Kaskade an heilungsmindernden Zell- und Gewebsreaktionen ausgelöst wird. Es kommt zur gesteigerten Infiltration von Neutrophilen Granulozyten, die vermehrt reaktive Sauerstoffmoleküle freisetzen und zur Aktivierung von Makrophagen mit nachfolgender, intensiver Sekretion von Zytokinen wie TNF- α und Interleukin-1- β (IL-1- β). Die erhöhte Menge an Zytokinen und reaktiven Sauerstoffmolekülen verstärkt einerseits die Produktion der Kollagenmatrix abbauenden MMPs und reduziert andererseits die Produktion der Enzyme, die für die Inhibition der MMPs verantwortlich sind (TIMPs). Die physiologische Balance zwischen Matrixsynthese und Matrixabbau wird zugunsten des Matrixabbaus verschoben, was letztendlich zur nichtheilenden, chronischen Wunde führt (Nwomeh et al., 1998).

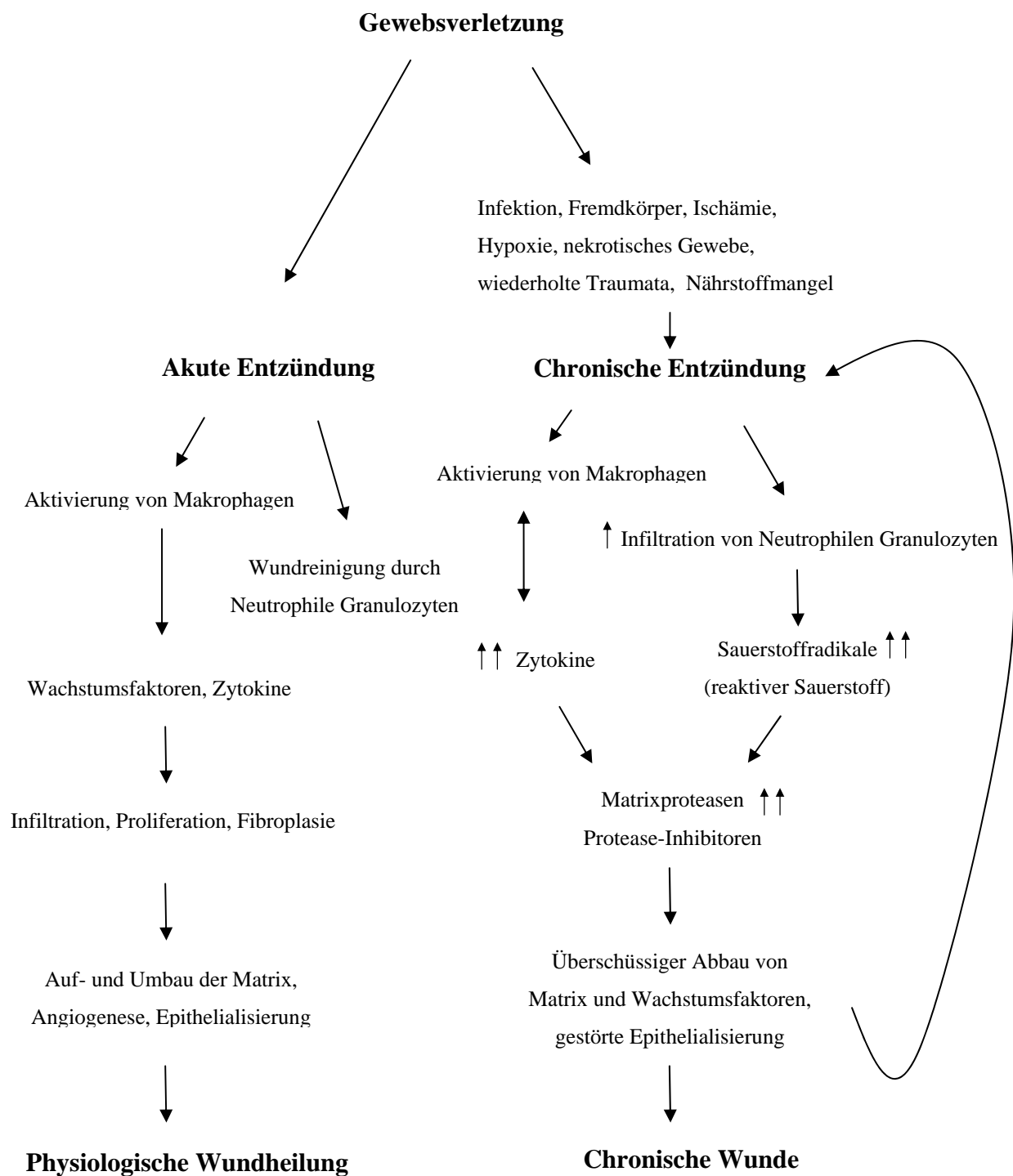


Abb. 1.2. Störungen der Wundheilung und ihre Auswirkungen auf die Entstehung von chronischen Wunden. (Nwomeh et al., 1998)

Solange die Ursache für eine chronische Entzündung nicht behoben wird, sind die Chancen auf eine erfolgreiche Wundheilung nahezu aussichtslos. Eine optimale Wundversorgung erfordert eine ausreichende Versorgung des Patienten mit Vitaminen, Mineral- und Nährstoffen, eine gute Therapie der zusätzlich bestehenden Erkrankungen und die regelmässige klinische Untersuchung der Wunde, damit Veränderungen frühzeitig erkannt und behandelt werden können. Die Beurteilung der Wunde erfolgt dabei nach den allgemein gültigen Parametern der Entzündung: Tumor, Dolor, Calor, Rubor und Functio laesa. Handelt es sich ausschliesslich um eine leichte Rötung und Erwärmung, so kann man nicht mit Sicherheit von einer Wundinfektion ausgehen. Tritt jedoch Eiter aus der Wunde, so handelt es sich eindeutig um eine Infektion. Schwieriger wird die Beurteilung tieferer Wundregionen bzw. implantierter Prothesen. Ist der gesamte Bereich über dem Implantat empfindlich und gerötet, so kann dies ein Hinweis auf eine Infektion des Implantates sein. Zur genaueren Abklärung sollten weitere diagnostische Mittel wie Wundabstriche, Sonographie, Röntgen oder Computertomographie hinzugezogen werden. Wichtige Massnahmen zur Behandlung einer chronisch infizierten Wunde sind die Entfernung des Fremdkörpers (Prothesen, Knochenplatten), aggressives Wunddébridement (bis blutendes und damit gut durchblutetes Gewebe angetroffen wird), intraoperative Wundlavage mit selektiv desinfizierenden Substanzen, gezielte systemische und lokale Antibiose, sowie die Drainage von Eiter und Wundflüssigkeit (Fry et al., 1998).

1.3 Vacuum-Assisted Closure Therapie

Eine neuentwickelte Form der Drainage ist die Vacuum-Assisted Closure (VAC) Therapie (Argenta und Morykwas, 1997), (Morykwas et al., 1997). Sie wird sowohl in akuten, als auch in chronischen Wunden eingesetzt (Fleischmann et al., 1993), (Fleischmann et al., 1997). Zur VAC-Therapie gehört ein poröser Polyvinylalcohol-(PVA)-Schwamm, in dessen Mitte ein Redonschlauch eingebettet ist und eine Vakuumflasche. Der Redonschlauch ist an seinem im Schwamm befindlichen Ende mit kleinen Löchern durchsetzt und am anderen Ende mit der Vakuumflasche verbunden (Abb. 1.3).



Abb. 1.3: Benötigte Materialien zur VAC-Therapie. PVAS, PVA-Schwamm. RS, Redonschlauch. VF, Vakuumflasche. (Bild: www.coloplast.de)

Nach Wunddébridement und Wundlavage wird der PVA-Schwamm entsprechend der Wundhöhle angepasst und nach Ausleitung des Redonschlauches im Wundbereich plaziert. Bei sehr grossen Wunden werden mehrere PVA-Schwämme gleichzeitig verwendet. Der Hautverschluss erfolgt spannungsfrei mit durchgreifenden Rückstichnähten. Kann kein spannungsfreier Verschluss durchgeführt werden, wird die Wunde mit einer transparenten, selbstklebenden und wasserdampfdurchlässigen Polyurethanfolie verschlossen. Das Öffnen der Vakuumflasche erzeugt einen kontinuierlichen, gleichmässigen Sog auf die gesamte Wunde, wodurch anfallende Wundflüssigkeit, Zelltrümmer und Eiter drainiert werden. Nach ungefähr einer Woche wird das Schwamm-/Drainagesystem wieder aus der Wunde entnommen und üblicherweise durch ein neues ersetzt. Die VAC-Therapie erstreckt sich in der Regel über zwei Wochen, kann aber den Bedürfnissen der Wunde entsprechend um ein Vielfaches verlängert werden (Fleischmann et al., 1997). Sowohl das Einlegen des

Schwamm-/Drainagesystems, als auch die Entnahme ist ein unkomplizierter und schnell durchführbarer Eingriff. Das Ziel der VAC-Therapie ist es, einen möglichst schnellen Verschluss der Wunde zu erreichen (Fleischmann et al., 1997). Zusätzliche Anforderungen an die VAC-Therapie sind eine vereinfachte Wundbehandlung, reduzierte Patientenbelastung, kürzerer Krankenhausaufenthalt und die Senkung der Kosten (Argenta und Morykwas, 1997), (Mullner et al., 1997). In einer prospektiven klinischen Studie wurden 45 Patienten, die entweder an sakralen Ulzerationen, akuten traumatischen Weichteilschädigungen oder chronischen Wunden erkrankt waren mit der VAC-Therapie behandelt. Von den 45 Wunden waren zu Beginn der Therapie 43 infiziert. Die Wunden galten dann als erfolgreich behandelt, wenn sich ihre Grösse im Laufe der Therapie um mind. 80% verringert hatte oder aber wenn der Boden der Wunde, ohne klinische Anzeichen einer Infektion, mit frischem Granulationsgewebe bedeckt war. Dieses Ergebniss konnte bei 38 der 45 Patienten festgestellt werden. Es muss hinzugefügt werden, dass alle Patienten zusätzlich einer systemischen Antibiotika-Therapie unterworfen waren, wodurch der Rückgang der Infektionen nicht ausschliesslich der VAC-Therapie zugeschrieben werden kann (Mullner et al., 1997). Eine ähnlich durchgeführte klinische Studie behandelte 300 an chronischen oder akuten Wunden leidende Patienten mit VAC. 296 der Patienten zeigten einen deutlichen Rückgang der entzündlichen Schwellung im Wundbereich und reagierten mit einer guten Bildung des Granulationsgewebes (Argenta und Morykwas, 1997). Weitere Fallberichte bestätigen diese vielversprechenden klinischen Befunde (Zöch, 1998). Um die Gründe der positiven Auswirkung der VAC-Therapie auf die Wundheilung herauszufinden, wurden experimentell induzierte Wunden an Schweinen mit VAC-Therapie behandelt. Untersucht wurde die Durchblutung des umgebenden Gewebes, die Entstehung von Granulationsgewebe und die Reduktion bakterieller Infektionen. Als Kontrollen dienten zusätzliche Wunden am selben Tier, die zur Bewertung des Granulationsgewebes mit feuchten Kompressen und zur Bewertung des Infektionszustandes mit implantierten PVA-Schwämmen ohne Unterdruck versorgt wurden. Die Ergebnisse ergaben eine gesteigerte Durchblutung der Wundumgebung, eine beschleunigte Bildung des Granulationsgewebes und eine beschleunigte Reduktion der infizierenden Bakterien (Morykwas et al., 1997). Als Ursache für diese Resultate werden mehrere Mechanismen diskutiert. Eine gesteigerte Durchblutung wird

hauptsächlich durch die Reduktion der entzündlichen Schwellung um die Wundumgebung erreicht (Argenta und Morykwas, 1997). Der ständige Sog, der zu einer unterdruckvermittelten Kräfteübertragung auf die Wundränder führt, scheint einen stimulierenden Effekt auf die Neubildung des Granulationsgewebes zu haben. Bereits 1989 konnte Ilizarov zeigen, dass Zellen und Gewebe auf genau definierte Dehnungsreize mit einer Steigerung der Proliferationsrate und des Metabolismus reagieren (Ilizarov, 1989). Die kontinuierliche Entfernung der Wundflüssigkeit entzieht den Bakterien einen wichtigen Nährboden. Ausserdem werden dadurch Zelltrümmer, Eiter sowie toxische und immunsupprimierende Bestandteile aus der Wunde drainiert und müssen nicht von körpereigenen Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen abgeräumt werden (Fleischmann et al., 1993). All die erwähnten Mechanismen führen zu einem wesentlich physiologischerem Wundmilieu. Das geschädigte Gewebe wird besser mit Sauerstoff versorgt und auch der Transport von wichtigen Nährstoffen in die Wundgegend ist wesentlich erleichtert. Möglicherweise fördern die gesteigerte Durchblutung, der negative Druck und das saubere Wundmilieu die Infiltration von Fibroblasten, Endothelzellen, Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten in die Wundumgebung. Durch den engen Kontakt mit den Wundrändern ist sogar eine Infiltration in den PVA-Schwamm denkbar.

1.4 Zielsetzung

Da das Schwamm-/Drainagesystem während der VAC-Therapie regelmäßig ausgewechselt wird (siehe: 1.3 Vacuum-Assisted Closure Therapie), bietet der entnommene (und sonst verworfene) PVA-Schwamm eine ausgesprochen einfache Möglichkeit zur Untersuchung der ablaufenden Heilungsprozesse am Menschen. Bisher gibt es allerdings weder am Tiermodell, noch am Menschen Daten über eine Infiltration von Zellen in den PVA-Schwamm während der Therapie mit VAC. In verschiedenen Forschungsmodellen wurde die Infiltration von Zellen in PVA- oder Polyurethan-Schwämme bereits mehrfach nachgewiesen. Fishel et al. implantierten PVA-Schwämme subcutan (s.c.) auf dem Rücken von Ratten, um *in vivo* die Beteiligung der T-Lymphozyten an der Wundheilung zu untersuchen und um die infiltrierte T-

Lymphozyten in Bezug auf ihre Subpopulationen zu charakterisieren. Die Schwämme wurden 5, 7 oder 10 Tage nach Implantation (Verwundung) entnommen, in schmale Stücke geschnitten, mit den jeweiligen Antikörpern gefärbt und schliesslich unter dem Mikroskop ausgewertet. Es konnten an den Tagen 7 und 10 eindeutig T-Lymphozyten nachgewiesen werden, deren Verhältniss von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Lymphozyten 2:1 betrug. Am Tag 5 waren für die Auswertung noch nicht genügend T-Lymphozyten infiltriert (Fishel et al., 1987). Roberts und Häyry entwickelten 1976 in der Transplantationsforschung ein Mausmodell, welches die Isolation und damit die Untersuchung von zytotoxischen T-Lymphozyten ermöglichte, die in s.c. implantierte Schwämme eingewandert waren. Der Stimulus zur Infiltration stammte von allogenen Zellen, die man vor der Implantation in die Schwämme injiziert hatte (Roberts und Häyry, 1976). Dieses Modell wird seither häufig in der Transplantationsforschung eingesetzt (Hopt et al., 1980), (Ford et al., 1991). Zangemeister et al. verwendeten in ihren Studien über tumorspezifische, zytotoxische T-Lymphozyten ein sehr ähnlich aufgebautes Versuchsmodell. Sie implantierten s.c. Polyurethan-Schwämme in Mäuse, die zuvor mit einer sublethalen Dosis an lebensfähigen ESb-Tumorzellen sensibilisiert worden waren. Nach erfolgreicher Vaskularisierung wurden bestrahlte Zellen desselben Tumors in die Schwämme injiziert. Auf diesen Reiz hin erfolgte eine Infiltration der sensibilisierten, zytotoxischen T-Lymphozyten, die in der Lage waren, *in vitro* ESb-Tumorzellen zu lysieren. Injizierte man diese Effektorzellen zusammen mit lebensfähigen ESb-Tumorzellen in die Flanke naiver, nicht ESb-sensibilisierter Mäuse, so ergab sich auch *in vivo* eine tumorprotektive Wirkung (Zangemeister et al., 1989). Die aufgeführten Beispiele lassen auf eine Infiltration von Zellen in den PVA-Schwamm während der VAC-Therapie hoffen. Von besonderem Interesse wäre es, zu erfahren, was für Zellarten in den PVA-Schwamm infiltrieren und welche Funktion sie dort übernehmen. Neue Erkenntnisse könnten zur Verbesserung der VAC-Therapie beitragen und Anregungen für weitere Anwendungen der VAC-Therapie, bzw. des PVA-Schwammes herbeiführen.

Ziel dieser Arbeit war deshalb zunächst der Nachweis von infiltrierten Zellen, insbesondere von Neutrophilen Granulozyten, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen. Dies erfolgte durch immunhistochemische Färbungen und durch die Durchflusszytometrie (engl.: Fluorescence activated cell

sorting (FACS)). Um eine auswertbare Messung mittels FACS zu erhalten, musste ein Isolationsverfahren entwickelt werden, welches die saubere Trennung der mononukleären Zellen (Lymphozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen) von den sehr zahlreich vorhandenen Neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten ermöglichte. Der Schwerpunkt im anschließenden Abschnitt dieser Arbeit lag auf der funktionellen Analyse der aus den PVA-Schwämmen isolierten T-Lymphozyten. Von besonderem Interesse war hierbei die Frage, ob den infiltrierten T-Lymphozyten eine lokale Beteiligung an der Erregerabwehr nachgewiesen werden konnte. Dazu wurde zunächst der Aktivitätszustand der Schwamm-T-Lymphozyten mit dem, der autologen T-Lymphozyten des peripheren Blutes verglichen. Im Anschluss erfolgte dann, innerhalb eines sehr aufwendigen Proliferationsassays, die Untersuchung der Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten gegenüber dem jeweiligen Wunderreger.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Schwammmaterialien

An der Studie waren 63 Patienten der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik und der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen beteiligt. Die Indikation zur VAC-Therapie war bei allen eine postoperative Wundinfektion. Während der Studie wurden zwei verschiedene Schwammmaterialien zur Therapie eingesetzt: Coldex (Mondomed, Hamont, Belgium) und Vacuseal (VacuSeal®, Coloplast, Hamburg, Deutschland). Beide bestehen aus aufgeschäumten Polyvinylalkohol und unterscheiden sich ausschliesslich im Durchmesser ihrer Poren (Coldex: 0.5-1.2 mm. Vacuseal: 0.7-1.5 mm). Die verschiedenen Schwammmaterialien wurden zu Beginn der Studie im Bezug auf ihre Zellinfiltrate verglichen und da kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden konnte, wurden beide für die folgenden Experimente verwendet (siehe: 3.2 Vergleich der Schwammmaterialien Coldex und Vacuseal). Da die Dauer der VAC-Therapie üblicherweise 14 Tage beträgt und einen Wechsel des Schwamm-/Drainagesystems nach 5-10 Tagen beinhaltet, erhielten wir häufig zwei Schwämme pro Patient: einen nach der ersten Therapiewoche (Schwamm N°.1) und einen nach der zweiten (Schwamm N°.2). In seltenen Fällen erhielten wir auch einen dritten Schwamm (Schwamm N°.3). Die Grösse der Schwämme war, wegen der intraoperativen Anpassung an die jeweilige Wunde, sehr variabel und reichte von $\sim 10 \text{ cm}^2$ bis zu $\sim 50 \text{ cm}^2$ bei einer durchschnittlichen Dicke von $\sim 1 \text{ cm}$. Die für die Wundinfektion verantwortlichen Bakterienstämme wurden mittels eines intraoperativ entnommenen Wundabstriches nach den klassischen Methoden im Hygiene-Institut der Universität Tübingen bestimmt. Alle Patienten wurden während der VAC-Therapie mit Antibiotika behandelt. Zur Optimierung der Isolierung der Schwamm mononukleären Zellen (SMZ) und der funktionellen Analyse waren die Schwämme von 41 Patienten nötig. Diese werden hier nicht weiter aufgelistet. Die Schwämme der 22 anderen, an der Studie beteiligten Patienten, wurden zur phenotypischen und funktionellen Analyse verwendet

und sind in Tabelle 2.1 und in *Table 1. Patients involved in the study* (siehe: 8 Veröffentlichung) dargestellt.

Tabelle 2.1: Patienten

Patient	Alter (Jahre)/ Geschlecht	Indikation zur Vakuum-Assisted Closure Therapie	Erreger der Wundinfektion	Schwamm N°	Implantations- zeit (Tage) ^A
5	25/M	Infizierte Plattenosteosynthese mit Fistelbildung nach Oberarmschaftfraktur	<i>E. faecium</i> ^C	5.2	7
6	37/M	Abszedierende chronischer Osteitis, Oberschenkel	<i>S. epidermidis</i> ^C	6.1/6.2	7/7
13	75/M	Infizierte HTP ^B	<i>S. epidermidis</i>	13.1	7
18	83/F	Infizierte HTP	<i>S. aureus</i> ^C	18.1	10
22	78/F	Infizierte HTP	<i>S. aureus</i>	22.2	7
54	64/F	Infizierte Plattenosteosynthese nach HTP-Entfernung	<i>S. aureus</i>	54.1	7
57	68/M	Abszess nach HTP-Entfernung	<i>S. aureus</i>	57.2	7

^ADie PVA-Schwämme wurden nach der angegebenen Zeit aus der Wunde entfernt und anschließend für die Experimente weiterverwendet.

^BHTP, Hüfttotalendoprothese. ^C*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*.

2.2 Immunhistochemie

Um histochemische und immunhistochemische Untersuchungen durchführen zu können, wurden kleine PVA-Schwammstücke in 4%iger Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Die histochemische Analyse erfolgte an 5 µm dicken Schnitten durch Färbung mit Hämatoxylin-Eosin. Zur Darstellung der Neutrophilen Granulozyten wurde die Naphtol-ASD-Chloroesterase-Reaktion angewendet. Bei den immunhistochemischen Färbungen wurden die Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC) Methode, sowie verschiedene monoklonale Antikörper (mAk) zur Identifizierung der SMZ eingesetzt. Näheres siehe Kapitel 8 Veröffentlichung, *Materials and Methods, Histological analysis*.

2.3 Isolierung der Schwamm und peripheren Blut mononukleären Zellen

Nach der Entnahme aus den infizierten Wunden wurden die PVA-Schwämme in kleine Stücke geschnitten, mehrmals gespült und vorsichtig ausgepresst. Die erhaltene Zellsuspension wurde einmal gewaschen und zur Isolierung der SMZ mit Hilfe des Ficoll-Dichtegradienten zentrifugiert. Durch dieses Verfahren konnten durchschnittlich 24×10^7 Zellen/Schwamm isoliert werden, die allerdings noch zu einem Grossteil aus Neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten bestanden (siehe 3.3 Isolierung der SMZ). Zur Trennung der Neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten von den SMZ wurde ein zweiter Aufreinigungsschritt, die magnetische Zellsortierung (engl.: Magnetic cell sorting (MACS)), durchgeführt. Die SMZ der Schwämme 5.2, 6.1, 6.2, 13.1, 18.1, 22.2 und 57.1 (Tabelle 2.1) wurden ausschliesslich durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (FDGZ) isoliert. Zur Aufreinigung der SMZ der Schwämme 29.1, 39.3, 43.1 und 47.1 (*Table 1. Patients involved in the study*) war zusätzlich zur FDGZ und MACS die Anwendung der hämolytisch wirkenden Gey's Lösung notwendig. Bei allen anderen in Tabelle 2.1 und *Table 1* aufgelisteten PVA-Schwämmen erfolgte die Isolierung über die zwei Schritte FDGZ und MACS.

Die peripheren Blut mononukleären Zellen (PBMZ) der Patienten erhielten wir jeweils zeitgleich mit den PVA-Schwämmen. Sie wurden mittels FDGZ isoliert und dienten als Kontrolle für die Durchflusszytometrie und die Zellproliferationsversuche.

Eine ausführlichere Beschreibung befindet sich in 8 Veröffentlichung, *Material and Methods, Isolation of foam –infiltrating mononuclear cells and PBMCs*.

2.4 Durchflusszytometrie

Die isolierten SMZ und PBMZ wurden nach einem Standardprotokoll mit den jeweiligen Fluoreszenz-Isothiozyanat-(engl.: fluorescence isothiocyanate (FITC))- oder Phycoerythrin-(PE)-konjugierten mAk gefärbt, mit Hilfe eines Zytometers analysiert und anschliessend ausgewertet. Eine genaue Auflistung der verwendeten mAk, weiterer Materialien und der Analyse ist unter 8 Veröffentlichung, *Material and Methods, Flow cytometric analysis and statistical analysis* zu finden.

2.5 Hitzeinaktivierte Bakterien

Die von den Wundabstrichen der Patienten erhaltenen Bakterienstämme wurden auf Blutagarplatten über 24 h bei 37° C kultiviert und im Anschluss an einen Reinigungsschritt über drei Minuten bei 80° C hitzeinaktiviert. Der Erfolg der Hitzeinaktivierung wurde durch erneute Kultivierung bei 37° C über 48 h getestet und die vollständig inaktivierten Bakterien bis zu Ihrem Gebrauch bei 4° C gelagert. Näheres siehe: 8 Veröffentlichung, *Material and Methods, Heat-killed bacteria*

2.6 Funktionelle Analysen der SMZ

2.6.1 Analyse der Lebensfähigkeit der Schwamm-T-Lymphozyten

Ausschliesslich über FDGZ isolierte SMZ ($2.0-2.5 \times 10^6$ /Well) wurden in 1.5 ml RPMI 1640-Medium, versehen mit: 10% hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, in 24-Well-Platten (Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland) bei 37° C und 7.5% CO₂ inkubiert. Als Stimulus diente entweder die Zugabe von 20 IU/ml rekombinantem, humanem Interleukin-2 (rh-IL-2, Biozol, Eching, Deutschland) oder die Zugabe von 0.5 µg/ml Phytohämagglutinin-L (PHA-L, Böhringer Mannheim, Deutschland) zusammen mit 20 IU/ml rh-IL-2. Zur Kontrolle wurden SMZ ohne weitere Zusätze kultiviert. Die Inkubationsdauer betrug 5-17 Tage. Nach 7 Tagen in Kultur erfolgte eine Restimulierung der SMZ durch Zugabe von rh-IL-2, bzw. PHA-L und rh-IL-2 in den oben angegebenen Konzentrationen. Das Wachstum der SMZ, bzw. der T-Lymphozyten wurde mit einem Durchflusszytometer nachgewiesen.

2.6.2 Funktionelle Analyse und Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten

Zum Erhalt der unter 3.5.3 Funktionelle Analyse und Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten dargestellten Ergebnisse, war eine Anpassung des Standardprotokolls für das Zellproliferations-ELISA an die gegebenen Bedingungen, wie z.B. die sehr geringe Menge der SMZ nach FDGZ und MACS, notwendig. Die exakte Beschreibung des angepassten Protokolls, sowie die jeweils verwendeten Konzentrationen und Inkubationszeiten sind in Kapitel 8 Veröffentlichung, *Material and Methods, Proliferation assays* zu finden. Im folgenden soll statt dessen auf das Prinzip des Zellproliferations-ELISA, die Versuche zur Adaption an die gegebenen Bedingungen und auf die Wirkung der verwendeten Stimuli eingegangen werden.

2.6.2.1 Prinzip des Zellproliferations-ELISA

Die Zellen werden in Gegenwart von Substanzen, die das Zellwachstum stimulieren, bei 37° C inkubiert. In Abhängigkeit von der Stärke der Zellproliferation wird nach 1-6 Tagen 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) zu den Zellen hinzugegeben. BrdU wird anstelle von Thymidin in die neugebildete DNA proliferierender Zellen eingebaut. Dies erfordert, ebenfalls in Abhängigkeit von der Proliferationsstärke, eine weitere Inkubationsphase von 2-24 h. Im nächsten Schritt wird das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit Hilfe von Ethanol am Plattenboden fixiert. Gleichzeitig denaturiert Ethanol die Zell-DNA, wodurch das eingebaute BrdU für die anschließende Färbung mit einem BrdU-spezifischen, Peroxidase-(POD)-gekoppelten monoklonalen Antikörper (mAk) besser zugänglich wird. Nach der Anfärbung wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben, welches in ein weiteres Substrat von blauer Farbe umgesetzt wird. Dieser Farbstoff lässt sich nun durch Messung der Absorption (Wellenlänge: A370nm-A492nm) quantitativ bestimmen. Die entstandene Farbe und damit der Absorptionswert korreliert direkt mit der Menge an neu synthetisierter DNA, bzw. mit der Anzahl an neugebildeten Zellen.

2.6.2.2 Experimente zur Vorbereitung des Zellproliferations-ELISA

In vorbereitenden Experimenten war zur Optimierung des Zellproliferations-ELISA die verwendete Zellzahl/Well, die verwendete Konzentration der hitzeinaktivierten Bakterien und die Inkubationsdauer wie folgt bestimmt worden. Die Experimente wurden, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben, wie unter *Material and Methods, Proliferation assays* (siehe: 8 Veröffentlichung) durchgeführt.

2.6.2.2.1 Zellzahl und Inkubationsdauer

Da die Anzahl der SMZ nach der Isolationsprozedur mit FDGZ und MACS sehr gering war, musste zunächst die niedrigst mögliche Zellzahl/Well bestimmt werden. Dies war

Voraussetzung für die Durchführung des Zellproliferations-ELISA mit all den unter 2.6.2.3 angegebenen Stimuli. 5×10^4 , 7.5×10^4 und 10×10^4 periphere Blut mononukleäre Zellen (PBMZ)/Well (Buffy Coat eines gesunden Probanden) wurden entweder ohne weitere Zusätze (NK, negativ Kontrolle) oder aber mit verschiedenen Stimuli kultiviert.

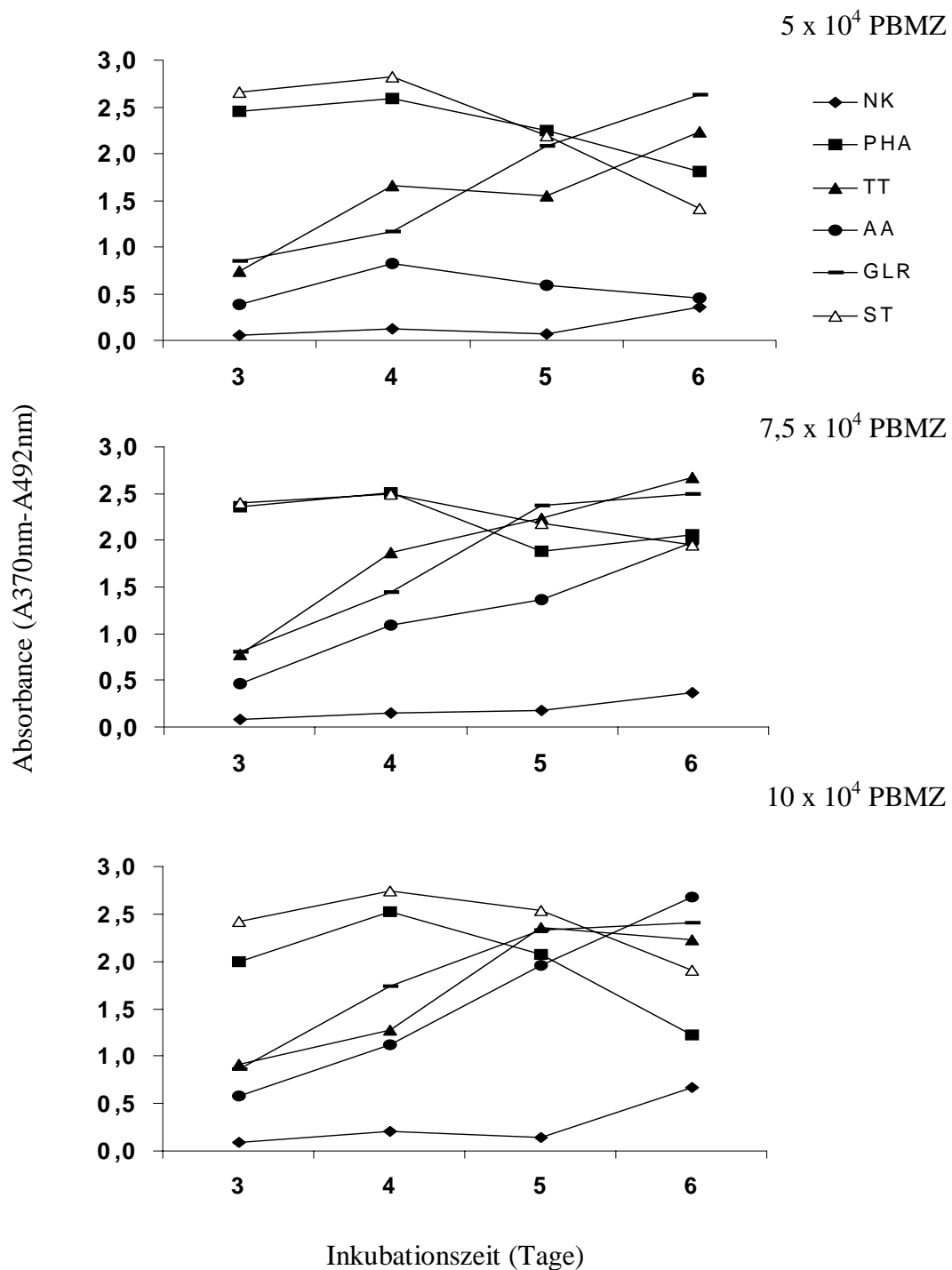


Abb. 2.1: Bestimmung der Zellzahl/Well und der Inkubationsdauer. 5×10^4 , $7,5 \times 10^4$ und 10×10^4 PBMZ/Well (Buffy Coat eines gesunden Probanden) wurden für 3, 4, 5 und 6 Tage mit den angegebenen Stimuli inkubiert und der 5-bromo-2'-deoxyuridine-(BrdU)-Einbau in die DNA nach weiteren 14 h gemessen. NK, negativ Kontrolle. PHA,

Phytohämagglutinin. TT, Tetanus Toxoid. AA, Aspergillus Antigen. GLR, gemischte Lymphozyten-Reaktion. ST, Mischung der Staphylokokken Toxine SEA, SEB und TSST-1.

Als Stimuli dienten PHA-L/rh-IL-2, TT, AA, Staphylokokken Toxine (ST = Mischung aus SEA, SEB und TSST-1) und bestrahlte, allogene PBMZ (in derselben Konzentration der Effektorzellen) für eine GLR. Die Dauer der Inkubation betrug 3, 4, 5 und 6 Tage, plus der zusätzlichen 14 h nach BrdU-Zugabe. Wie Abb. 2.1 zeigt ergab sich, ausser bei der Stimulation durch AA, zwischen den einzelnen Zellkonzentrationen kein wesentlicher Unterschied bezüglich der Vermehrungsrate der Zellen. Aufgrund der geringen Ausbeute an SMZ nach den beiden Isolierungsschritten wurde die Zellkonzentration für die folgenden Experimente auf 5×10^4 Zellen/Well festgelegt. War die Anzahl der SMZ ausreichend für 7.5×10^4 Zellen/Well, so wurde diese genommen, da hierbei die Proliferation auf den Stimulus AA besser messbar war. Die maximale Zellteilung und damit die Dauer der Inkubation lag für PHA und ST bei 4 Tagen, für TT, AA und GLR bei 6 Tagen.

2.6.2.2.2 Konzentration der hitzeinaktivierten Bakterien

Um herauszufinden, welches die beste Konzentration des am häufigsten bei den Patienten dieser Studie diagnostizierten Erregers *S. aureus* und des eher selten diagnostizierten Kontrollerregers *P. aeruginosa* für eine starke Zellvermehrung ist, wurden 5×10^4 PBMZ/Well der Patienten 30 und 36 in 50µl Medium zusammen mit verschiedenen Konzentrationen ihrer hitzeinaktivierten (patienten-spezifischen) Erreger stimuliert. Für Patient 30: SA I (10^6 Bakterien/ml), SA II (5×10^6 Bakterien/ml), SA III (10^7 Bakterien/ml), SA IV (5×10^7 Bakterien/ml) und SA V (10^8 Bakterien/ml). Für Patient 36: PA I (10^7 Bakterien/ml), PA II (5×10^7 Bakterien/ml) und PA III (10^8 Bakterien/ml). Die Inkubationsdauer betrug 5, 6, 7 und 8 Tage, plus der 14 h nach BrdU-Zugabe. Abb. 2.2 zeigt die Ergebnisse der beiden Versuche. Für *S. aureus* liegt die optimale und damit später verwendete Konzentration bei 5×10^6 Bakterien/ml.

Während 10^6 hitzeinaktivierte Bakterien/ml nur eine wesentlich geringere Proliferation verursachen als 5×10^6 Bakterien/ml, führen mehr als 5×10^7 Bakterien/ml zu einer zunehmend verringerten Zellvermehrung. Möglicherweise wirken solch hohe *S. aureus* Konzentrationen toxisch auf die Proliferation der T-Lymphozyten.

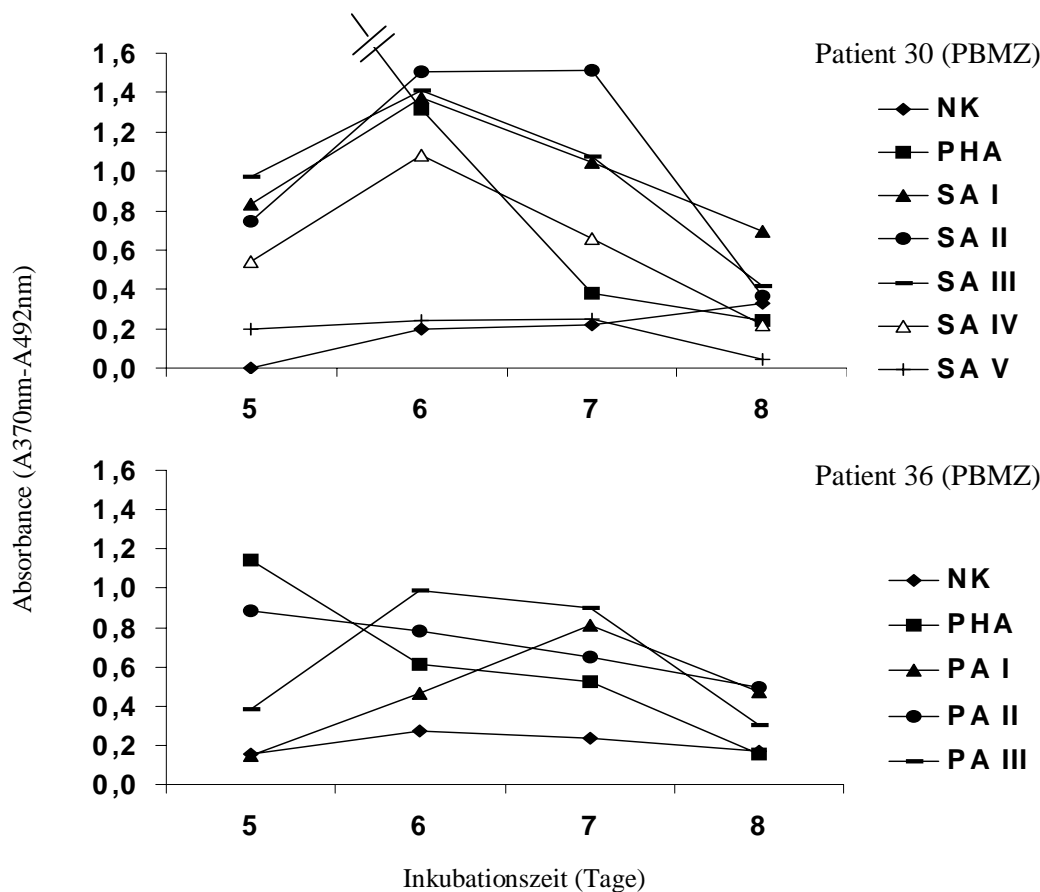


Abb. 2.2: Bestimmung der Konzentration der hitzeinaktivierten Erreger *Staphylokokkus aureus* (SA) und *Pseudomonas aeruginosa* (PA). 5×10^4 PBMZ/Well der Patienten 30 und 36 wurden mit verschiedenen Konzentrationen (siehe Text) ihrer jeweiligen hitzeinaktivierten Erreger (Patient 30: SA und Patient 36: PA) für 5, 6, 7 und 8 Tage inkubiert und der 5-bromo-2'-deoxyuridine-(BrdU)-Einbau in die DNA nach weiteren 14 h gemessen. NK, negativ Kontrolle. PHA, Phytohämagglutinin.

Für *P. aeruginosa* liegt die optimale Konzentration bei 10^8 Bakterien/ml. Die Inkubationsdauer wurde wegen der bereits unter 2.6.2.2.1 (Zellzahl und Inkubationsdauer) erhaltenen Ergebnisse für beide Erreger auf 6 Tage festgelegt. Da für *S. epidermidis* kein solches Experiment durchgeführt wurde, wurden in den folgenden Versuchen zwei verschiedene Konzentrationen eingesetzt (SE I: 5×10^6 Bakterien/ml, SE II: 5×10^7 Bakterien/ml).

2.6.2.3 Wirkung der angewandten Stimuli

Phytohämagglutinin-L (PHA-L, 0.5 µg/ml):

PHA wird aus der roten Feuerbohne (*Phaseolus vulgaris*) extrahiert. Es besteht aus 5 Isolektinen, die als Tetramere vorliegen und von nicht-kovalenten Kräften zusammengehalten werden. PHA-L setzt sich ausschliesslich aus dem Isolektin L₄ (Leukoagglutinin) zusammen. Es bindet unspezifisch an verschiedene Moleküle der Zelloberfläche von T-Lymphozyten und löst damit innerhalb der Zelle eine aktivierendes Signal aus. PHA-L ist besonders gut zur effizienten, polyklonalen Aktivierung von T-Lymphozyten geeignet.

Superantigene:

Staphylokokken Enterotoxin A (SEA, 10ng/ml)

Staphylokokken Enterotoxin B (SEB, 10ng/ml)

Toxisches Schocksyndrom-Toxin-1 (TSST-1, 10ng/ml)

Verschiedene Stämme der Spezies *Staphylokokkus aureus* produzieren eines oder mehrere der gefürchteten Staphylokokken Enterotoxine A-E (SEA, SEB usw.), sowie das toxische Schocksyndrom-Toxin-1 (TSST-1). Alle diese Toxine wirken als Superantigene, welche gleichzeitig an konstante Teile der variablen Region der β-Kette des T-Zell-Rezeptors und, ausserhalb der Peptid-bindenden-Spalte, an MHC-Klasse-II-

Moleküle binden. Superantigene aktivieren alle die T-Lymphozyten, die in ihrer T-Zell-Rezeptor β -Kette eine ganz bestimmte variable Regionen aufweisen. So aktiviert SEB in Mäusen nur T-Lymphozyten, deren T-Zell-Rezeptor eine der variablen Regionen $V_{\beta}3$, $V_{\beta}7$, $V_{\beta}8$ oder $V_{\beta}17$ besitzt. TSST-1 dagegen bindet an T-Zell-Rezeptoren mit einer der variablen Regionen $V_{\beta}3$, $V_{\beta}10$, $V_{\beta}15$ oder $V_{\beta}17$ (Marrack und Kappler, 1990). Die spezifische Bindung an den T-Zell-Rezeptor, in Anwesenheit von MHC-Klasse-II-Molekül exprimierenden Zellen, induziert eine oligoklonale Expansion von bis zu 20% aller vorhandenen T-Lymphozyten (Kaufmann, 1999). Dies führt im folgenden zur massiven Produktion von Zytokinen, welche für die klinischen Symptome des toxischen Schocks verantwortlich sind.

Recall-Antigene:

Als Recall-Antigene werden Antigene von Bakterien, Viren oder Pilzen bezeichnet, die eine sekundäre T-Zell Antwort hervorrufen. *In vitro* werden sie benützt um, präsentiert von Antigen-präsentierenden Zellen (B-Lymphozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen), spezifische T-Lymphozyten zu reaktivieren. Voraussetzung dafür ist, dass die T-Lymphozyten durch einen vorausgegangenen Kontakt des Organismus mit dem Erreger bereits voraktiviert worden sind. Recall-Antigene sind häufig Proteinextrakte oder abgeschwächte Toxine der Erreger. Sie sind nicht fähig, die für den jeweiligen Erreger typische Krankheit auszulösen. In dieser Studie wurde Recall-Antigene von Erregern verwendet, von denen bekannt ist, dass die meisten Menschen schon einmal in Kontakt mit ihnen gewesen sind:

Tetanus Toxoid (TT, 5 μ g/ml):

Toxoide sind durch Formaldehyd und Erwärmung entgiftete Toxine, deren immunisierende Wirkung während des Entgiftungsprozesses nicht verloren geht. Tetanus Toxoid (TT) ist die entgiftete Form des Tetanus Toxins, welches vom Erreger *Clostridium tetanii* gebildet wird und für die Entstehung des Tetanus verantwortlich ist.

Die seit langem angewendete Immunisierung gegen Tetanus wird mit Tetanus Toxoid durchgeführt, da eine Immunisierung mit Tetanus Toxin wegen seiner letalen Wirkung selbst bei geringsten Mengen nicht möglich ist (Dosis letalis minima kleiner als Dosis immunisatoria minima). Durch die Immunisierung werden unter der Hilfestellung von CD4⁺ T-Lymphozyten vom Typ 1 und Typ 2 neutralisierende Antikörper gegen das Tetanus Toxin gebildet. Dadurch sollte jeder, der ausreichend gegen Tetanus geimpft worden ist, *in vitro* eine Proliferation der TT-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten aufweisen (Kaufmann, 1999).

Gereinigtes Tuberkulin (PPD, 5µg/ml):

Tuberkuline sind gelöste Toxine und Zerfallsstoffe aus dem Kulturmedium einer *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tbc.*) Kultur. Isoliert man aus der Tuberkulin Suspension die Proteine, so erhält man gereinigtes Tuberkulin (engl.: Tuberculin purified protein derivative (PPD)). *M. tbc.* Bakterien sind fakultativ intrazelluläre Mikroorganismen, die von Makrophagen phagozytiert werden. Da diese zunächst nicht in der Lage sind, die Erreger abzutöten, persistieren und vermehren sich die Tuberkuloseerreger innerhalb der Makrophagen. Es kommt zur Einwanderung der Erreger in den nächstgelegenen Lymphknoten, in dem *M. tbc.*-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten gebildet werden. Erst die Infiltration dieser T-Lymphozyten in den Infektionsherd führt zur ausreichenden Aktivierung der infizierten Makrophagen, die nun in der Lage sind eine Vermehrung und Ausbreitung der Tuberkuloseerreger zu verhindern. In über 90% der Infektionen bleibt die Erkrankung in dieser Phase (Primär-Tuberkulose) stecken. Der Patient hat weder klinische Symptome, noch ist er ansteckend. Nachweisen lässt sich eine vorangegangene Infektion mit *M. tbc.* mittels eines Tine- oder Mendel-Mantoux-Testes. Hierzu wird PPD unter die Haut injiziert. Tritt nach 48-96 h am Injektionsort eine Induration > 10 mm auf, so ist der Test positiv. Makrophagen und spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten sind dann, aufgrund einer sekundären Immunantwort, bzw. einer allergischen Reaktion vom verzögerten Typ (engl.: Delayed-type hypersensitivity (DTH)), in die Injektionsgegend eingewandert. Ein positives Ergebnis kann ausserdem aus einer Sensibilisierung mit atypischen

Mykobakterien oder aus einer zurückliegenden Tuberkulose-Immunisierung resultieren. *In vitro* wird PPD häufig zur funktionellen Analyse von M. tbc. spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten eingesetzt (Collins und Kaufmann, 2001), (Hahn et al., 1999).

Aspergillus Antigen (AA, 20µg/ml):

Aspergillus Antigen besteht aus extrahierten Proteinen von Schimmelpilzen der Aspergillus Familie. Aspergillen sind die am häufigsten in der Umgebung des Menschen vorkommenden Pilze. Man findet sie unter anderem auf organischen Abfällen (Kompost), Lebensmitteln, wie Getreide oder Nüsse und in der Erde von Topfpflanzen. Eine Infektion erfolgt hauptsächlich durch die Inhalation von Aspergillus sporen, die bis in die Alveolen vordringen können. Immunkompetente Menschen erkranken in der Regel nicht an einer Aspergillose oder einem Aspergillom. Invasive Infektionen entstehen besonders bei leukopenischen Patienten und unter langdauernder, hochdosierter Kortisontherapie. Die Immunabwehr erfolgt zunächst durch Alveolarmakrophagen. Sind diese nicht in der Lage den Aspergillus zu eliminieren und dringt dieser ins umliegende Gewebe ein, so kommt es zur Komplementaktivierung mit nachfolgender Infiltration von Neutrophilen Granulozyten und weiteren Makrophagen. Zusätzlich werden gegen verschiedene Aspergillusantigene Antikörper gebildet (Engelmann, 1999). Hierzu werden unter anderem T-Helferzellen (CD4⁺) benötigt, welche durch die Stimulation mit AA im Proliferationsassay nachgewiesen werden sollen.

Hitzeinaktivierte Bakterien:

Staphylokokkus aureus (SA, 5 x 10⁶ Bakterien/ml)

Staphylokokkus epidermidis (SE I, 5 x 10⁶ Bakterien/ml)

Staphylokokkus epidermidis (SE II, 5 x 10⁷ Bakterien/ml)

Pseudomonas aeruginosa (PA, 10⁸ Bakterien/ml)

S. aureus, *S. epidermidis* und *P. aeruginosa* sind extrazelluläre, bakterielle Erreger, die alle drei sehr häufig für nosokomial erworbene Wundinfektionen verantwortlich sind (siehe: 1.2 Pathophysiologie der Wundheilung). Als extrazelluläre Erreger werden Mikroorganismen bezeichnet, welche die Fähigkeit besitzen, sich im Wirtsorganismus ausserhalb von Zellen zu vermehren. Das Immunsystem kontert einer Infektion mit extrazellulären Erregern auf verschiedene Wege. Neutrophile Granulozyten und auch Makrophagen phagozytieren die Erreger und lysieren sie innerhalb ihrer Vesikel. Der Zerfall der abwehrenden Neutrophilen Granulozyten führt im weiteren Verlauf zur Bildung von Eiter. Zusätzlich werden sowohl gegen die Erreger, als auch gegen deren Virulenzfaktoren oder Toxine neutralisierende und opsonierende Antikörper gebildet. Dazu werden T-Helferzellen ($CD4^+$) vom Typ 1 und Typ 2 benötigt. Zytotoxische T-Lymphozyten ($CD8^+$) spielen bei der Abwehr von extrazellulären Erregern eine untergeordnete Rolle (Kaufmann, 1999), (Hahn, 1983).

Gemischte Lymphozyten Reaktion (GLR):

In einer gemischten Lymphozyten Reaktion (engl.: Mixed lymphocyte reaction (MLR)) untersucht man die Fähigkeit der T-Lymphozyten, allogene periphere Blut mononukleäre Zellen (PBMZ) abzustossen. Dazu bringt man Effektor-T-Lymphozyten mit bestrahlten, nicht mehr reaktionsfähigen PBMZ des Spenders zusammen. In Anwesenheit von Antigen-präsentierenden Zellen erfolgt eine Aktivierung der Effektorzellen gegenüber den fremden MHC-Molekülen der Spenderzellen. $CD4^+$ T-Lymphozyten sind, durch die starke Reaktion auf die allo genen MHC-Klasse-II-Moleküle, für die massive Proliferation verantwortlich. Diese wird mittels eines Proliferationsversuches gemessen. $CD8^+$ T-Lymphozyten reagieren hauptsächlich auf die MHC-Klasse-I-Moleküle der Spenderzellen und können im Chrom-Freisetzung-Versuch (engl.: Chromium (^{51}C)-release-assay) nachgewiesen werden (Janeway und Travers, 1997).

2.6.3 Differenzierung von Dendritischen Zellen

$1.0-1.5 \times 10^7$ SMZ/Well (nach FDGZ) wurden mit 3.0 ml Medium in 6-Well-Platten (Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland) für 2 h zur Adhärenz der Monozyten/Makrophagen bei 37° C und 7.5% CO₂ inkubiert. Die nicht adhärenen Zellen wurden ausgewaschen und die verbleibenden Monozyten/Makrophagen mit 3.0 ml Medium versehen. Als Zytokin-Zusätze dienten: 1000 IU/ml rekombinantes, humanes Interleukin-4 (rh-IL-4, PromoCell, Heidelberg, Deutschland), 100 ng/ml rekombinanter, humaner Granulocyte-makrophage colony-stimulating factor (rh-GM-CSF, Leucomax® 300, Sandoz AG, Nürnberg, Deutschland) und 10 ng/ml rekombinanter, humaner Tumor necrosis factor- α (rh-TNF- α , Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA). IL-4 und GM-CSF stimulieren die Differenzierung unreifer Dendritischer Zellen aus peripheren Blut-Monozyten, TNF- α führt zur endgültigen Reifung der Dendritischen Zellen (Sallusto und Lanzavecchia, 1994), (Morse et al., 1997). Nach 2, 4 und 6 Tagen in Kultur wurde jeweils 1.0 ml Medium aus den Löchern entnommen und dieselbe Menge an frischem Medium mit den dreifach konzentrierten Zytokinen hinzugegeben. Am 7. Tag erfolgte die FACS-Analyse nach Färbung mit mAk, die spezifisch sind für die Oberflächenmarker CD1a und HLA-DR. Beides sind von Dendritischen Zellen exprimierte Oberflächenmoleküle.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Analyse der Schwamm-infiltrierenden Zellen

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse der PVA-Schwämme, direkt nach Entnahme aus der infizierten Wunde, sind ausführlich unter *Results, Immunohistochemical analysis of foam infiltrating cells* und in *Fig. 1. Histochemical and immunohistochemical staining of paraffin-embedded sections from foam 30.2* (siehe: 8 Veröffentlichung) beschrieben. Zusammenfassend liessen sich in allen untersuchten Schwämmen Neutrophile Granulozyten, Makrophagen, sowie CD3⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten darstellen, während B-Lymphozyten nur selten und in sehr geringer Menge zu zeigen waren. Die immunhistochemischen Färbungen der PVA-Schwämme mit mAk, spezifisch für typische Oberflächenmoleküle Dendritischer Zellen (CD1a, S-100 Protein, CD35), blieben ohne Erfolg (Daten nicht gezeigt).

3.2 Vergleich der Schwammmaterialien Coldex und Vacuseal

Zur VAC-Therapie wurden während der Studie zwei verschiedene Schwammmaterialien (Coldex und Vacuseal) verwendet, deren einziger Unterschied in der Porengrösse besteht (siehe: 2.1 Patienten und Schwammmaterialien). Um festzustellen, ob es Unterschiede im Bezug auf die Zusammensetzung ihrer Zellinfiltrate gab, wurden beide Schwämme, nachdem sie gleichzeitig und gleichlang in der Wunde eines Patienten implantiert worden waren, miteinander verglichen. Der Grund für die gleichzeitige Implantation von zwei Schwämmen bzw. zwei Schwamm-/Drainagesystemen lag an der vorliegenden Wundgrösse. Ein Schwamm alleine hätte nicht ausgereicht, um die Wunde vollständig auszufüllen.

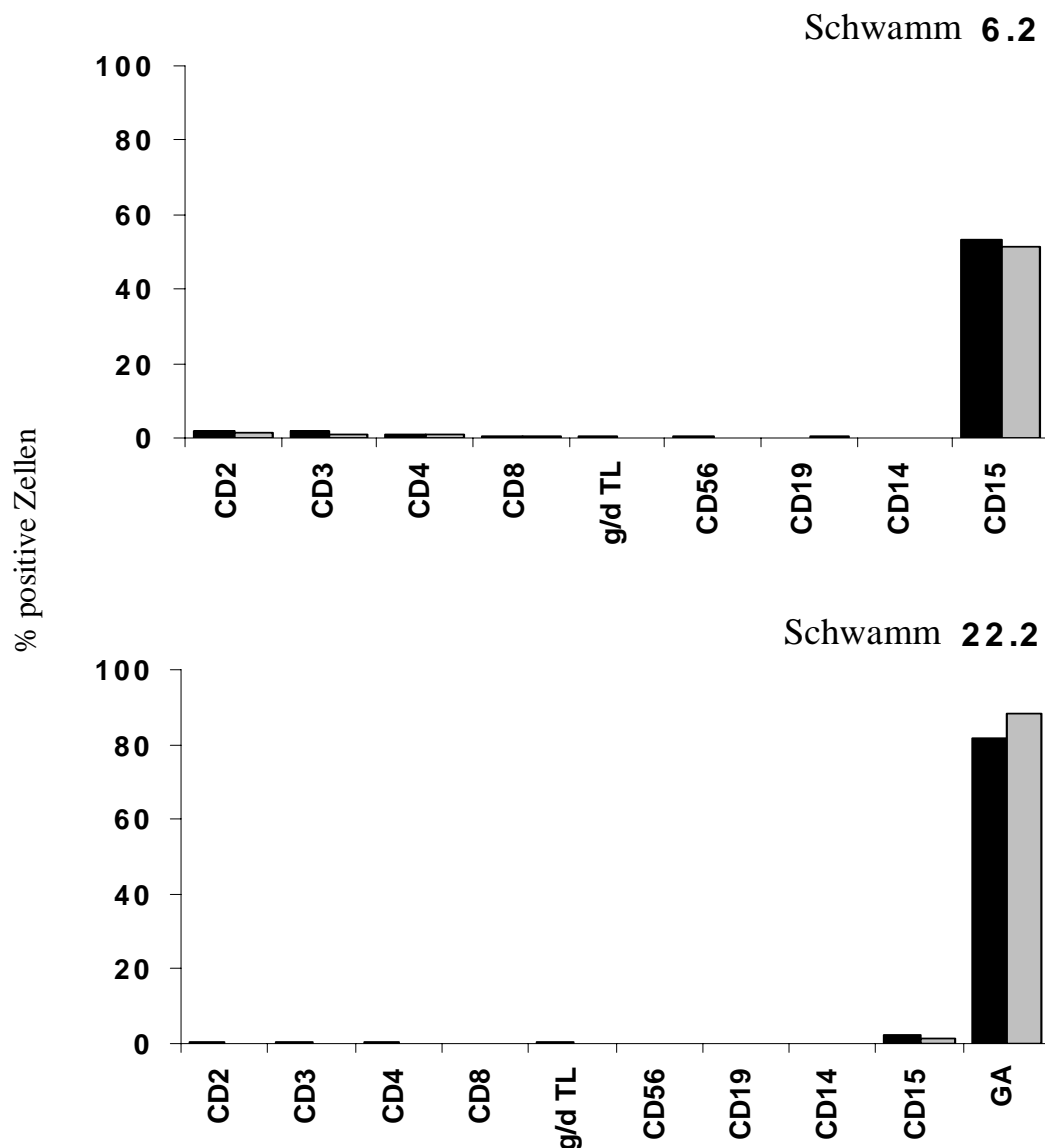


Abb. 3.1: Durchflusszytometrischer Vergleich des Zellinfiltrates aus Coldex- und Vacuseal-Schwämmen der Patienten 6 und 22 nach der zweiten Therapiewoche. Beide Schwämme (Coldex und Vacuseal) waren gleichzeitig und gleichlang (7 Tage) in der Wunde des jeweiligen Patienten implantiert. Die Identifizierung der Zellen erfolgte durch Färbung mit mAk, spezifisch für die angegebenen Oberflächenmarker. Graue Balken: Coldex. Schwarze Balken: Vacuseal. Angaben in % positiver Zellen am untersuchten Zellinfiltrat nach FDGZ. TL, T-Lymphozyten. GA, Glycophorin A.

Nach der Entnahme wurden beide Schwämme unabhängig voneinander vorsichtig ausgepresst, die erhaltenen Zellen durch FDGZ aufgetrennt und anschliessend mittels FACS analysiert. Ein Vergleich bezüglich der erhaltenen Zellzahl war nicht durchführbar, da sich die Schwammmaterialien zum Teil erheblich in ihrer Grösse und damit in der Menge der infiltrierten Zellen unterschieden. Abb. 3.1 zeigt die Ergebnisse der Patienten 6 und 22, jeweils nach der zweiten Therapiewoche. Bei Patient 6 dominierten die Neutrophilen Granulozyten (CD15⁺) mit 50-55% das Zellinfiltrat beider Schwämme, bei Patient 22 waren es die Erythrozyten (Glycophorin A⁺) mit 85-90%. T-Lymphozyten (CD2⁺, bzw. CD3⁺) machten dagegen nur einen kleinen Anteil der Zellen aus (0.1-2.0%), was ihre Analyse deutlich erschwerte. γ/δ -T-Lymphozyten, B-Lymphozyten (CD19⁺), Natürliche Killerzellen (CD56⁺) und Makrophagen (CD14⁺) konnten nur in äusserst geringen Mengen (< 0.7%) oder überhaupt nicht nachgewiesen werden. Weder bei Patient 6, noch bei Patient 22 konnte ein wesentlicher Unterschied in der Zusammensetzung der Zellinfiltrate zwischen den Coldex- und Vacuseal-Schwämmen festgestellt werden. Tab. 3.1 zeigt komplementäre Ergebnisse von fünf verschiedenen Experimenten. Deutlich zu sehen ist der bei jedem Schwamm extrem hohe Anteil an Neutrophilen Granulozyten (CD15⁺), bzw. Erythrozyten (GA⁺) am gesamten Zellinfiltrat. In den Schwämmen der Patienten 18 und 22 dominierten die Erythrozyten das Zellinfiltrat, bei den Patienten 5 und 6 machten die Neutrophilen Granulozyten bis zu 66.5% des Infiltrates aus. Diese Ergebnisse korrelierten mit dem Erscheinungsbild der frisch entnommenen Schwämme. Manche Schwämme waren sehr rot und blutig, andere dagegen eher gelblich und eitrig. In allen untersuchten Schwämmen konnten T-Lymphozyten nachgewiesen werden, was für γ/δ -T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen nicht der Fall war. Da die SMZ nur eine Minderheit des Zellinfiltrates ausmachten, wurde sehr schnell klar, dass neben der FDGZ ein weiterer Aufreinigungsschritt zur genaueren Analyse der SMZ eingeführt werden musste (siehe: 3.3 Isolierung der SMZ). Um festzustellen, ob trotz der unterschiedlichen Porengrösse der beiden Schwämme Coldex und Vacuseal die Zellen gleichermassen aus ihnen isoliert werden, wurden beide direkt nach der Entnahme aus der Wunde immunhistochemisch gefärbt, unter dem Mikroskop analysiert und in Bezug auf die Art und das Verhältniss der infiltrierenden Zellen miteinander verglichen (Daten nicht gezeigt). In allen durchgeführten Versuchen

konnte, wie schon bei den durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnissen, kein Unterschied gesehen werden. Im weiteren Verlauf der Studie wurden damit Coldex- und Vacuseal-Schwämme gleichermaßen verwendet.

Tabelle 3.1: Vergleich der Zusammensetzung des Zellinfiltrates zwischen Coldex- und Vacuseal-Schwämmen

Schwamm	V/C ^A	CD2	CD3	CD4	CD8	γ/δ TL ^B	CD56	CD19	CD14	CD15	GA ^C
5.2	V	3.6 ^D	3.7	2.0	1.1	NB ^E	NB	0.0	0.0	24.8	NB
	C	6.3	6.7	5.2	1.5	NB	NB	0.0	0.1	34.1	NB
6.1	V	1.1	0.9	0.9	0.2	NB	NB	0.0	0.1	55.3	NB
	C	0.6	0.8	0.7	0.2	NB	NB	0.0	0.1	66.5	NB
6.2	V	2.0	1.8	1.1	0.7	0.2	0.3	0.0	0.1	53.5	NB
	C	1.2	1.1	0.9	0.7	0.1	0.0	0.7	0.2	51.4	NB
18.1	V	0.2	0.2	0.2	0.1	0.0	NB	0.0	0.4	1.5	87.7
	C	0.3	NB	0.1	0.1	0.0	NB	0.0	0.1	0.9	83.5
22.2	V	0.3	0.5	0.3	0.0	0.3	0.0	0.0	0.2	2.2	81.7
	C	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	88.1

^AVerwendete Schwammmarken: V, Vacuseal und C, Coldex. ^BTL, T-Lymphozyten.

^CGA, Glycophorin A. ^DAngaben in % positiver Zellen. ^ENB, nicht bestimmt.

3.3 Isolierung der SMZ

Die Ergebnisse der Isolierung der SMZ sind bereits unter *Results, Isolation and characterisation of foam mononuclear cell populations (FMCs)* beschrieben (siehe: 8 Veröffentlichung). Sie werden im folgenden nochmals ausführlich dargestellt, da weitere Daten und Abbildungen zu den Isolierungsexperimenten vorliegen.

Wurden die SMZ nach FDGZ und FACS Analyse in einem Diagramm nach ihrer Grösse und ihrer Granularität aufgetragen, so konnten hauptsächlich Neutrophile Granulozyten und Erythrozyten (Abb. 3.2, Schwamm 56.1, li. Diagramm), bzw. fast ausschliesslich Erythrozyten (Abb. 3.2, Schwamm 54.1, li. Diagramm) nachgewiesen werden. Lymphozyten machten nur einen sehr geringen Anteil des Zellinfiltrates aus und waren kaum oder gar nicht von den Erythrozyten abgrenzbar. Makrophagen konnten nicht erkannt werden. Dies steht im Einklang mit den unter 3.2 (Vergleich der Schwammmaterialien Coldex und Vacuseal) und Tab. 3.1 gewonnenen Ergebnissen und verdeutlicht die Notwendigkeit eines weiteren Aufreinigungsschrittes zur phenotypischen und funktionellen Analyse der SMZ. Wurden die SMZ nach der FDGZ zusätzlich mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung (MACS) von den vielen Neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten getrennt, so zeigten sich bei der durchflusszytometrischen Analyse zwei deutlich voneinander abgrenzbare Leukozytenpopulationen: eine Lymphozytenpopulation und eine Makrophagenpopulation (Abb. 3.2, Schwamm 56.1 und 54.1, jeweils re. Diagramm). Beide Zellpopulationen wurden im Anschluss mittels FACS weiter charakterisiert (siehe: 3.4 Charakterisierung der SMZ). Die Gesamtmenge der SMZ nach FDGZ und MACS betrug im Durchschnitt 1.5×10^6 pro Schwamm, wodurch nochmals bestätigt wurde, dass die SMZ eine Minderheit der Schwamm-infiltrierenden Zellen darstellen. Da das erweiterte Isolierungsprotokoll nun ausreichend reine SMZ lieferte, wurde es in allen nachfolgenden Experimenten (wenn nicht anders angegeben) verwendet.

Abb. 3.2

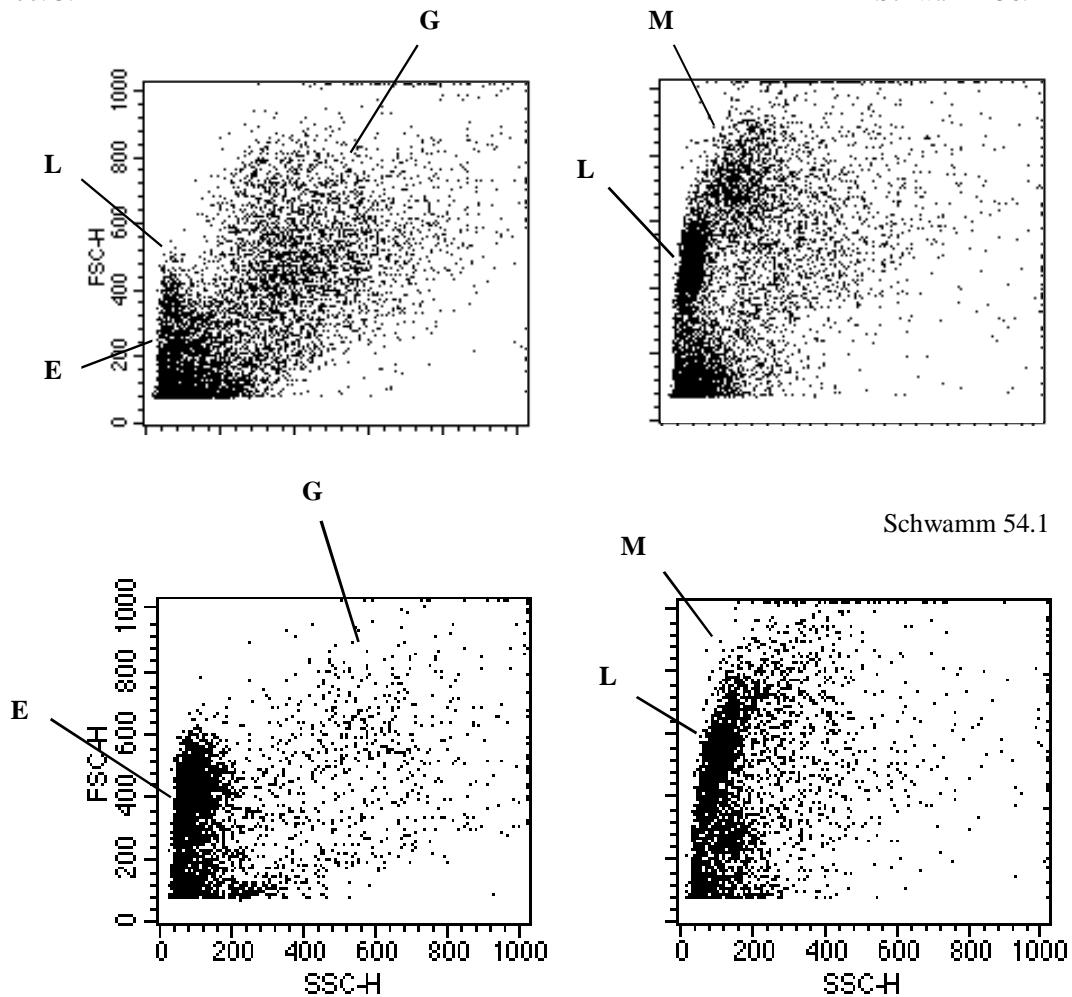


Abb. 3.2: Schwamm-Zellpopulationen nach aufeinanderfolgenden Isolierungsschritten. Durchflusszytometrische Analyse der Grösse (FSC, forward scatter) und der Granularität (SSC, sideward scatter) der SMZ des Schwammes 56.1 und des Schwammes 54.1. Linke Diagramme: SMZ nach FDGZ. Rechte Diagramme: SMZ nach zusätzlicher Isolierung mittels MACS. Die verschiedenen Zelltypen wurden mit spezifischen mAk identifiziert. E, Erythrozyten. G, Neutrophile Granulozyten. L, Lymphozyten. M, Makrophagen.

3.4 Charakterisierung der SMZ

3.4.1 Lymphozytenpopulation

Die Ergebnisse der Charakterisierung der Schwamm-Lymphozyten sind unter *Results, Isolation and characterisation of foam mononuclear cell populations (FMCs)* beschrieben (siehe: 8 Veröffentlichung). Sie werden in dieser Arbeit nochmals ausführlich dargestellt, da weitere Daten und Abbildungen zu den Charakterisierungsexperimenten vorliegen.

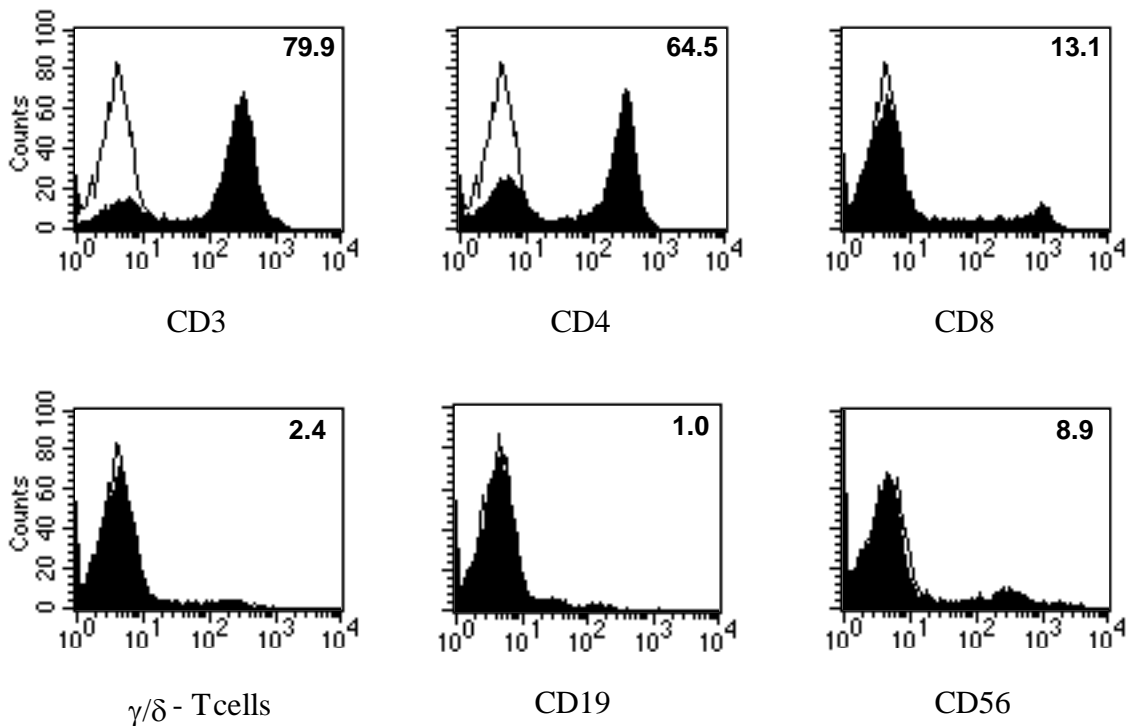


Abb. 3.3: Charakterisierung der Schwamm-Lymphozyten. SMZ des Schwammes 32.2 wurden mit mAk, spezifisch für die Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8, γ/δ -T-Zell-Rezeptor, CD19, CD56 gefärbt und die Lymphozytenpopulation mit FACS analysiert. Schwarze Kurve: Färbung mit mAk. Weisse Kurve: Isotyp Kontrolle. Angaben in % positiver Zellen an der Lymphozytenpopulation.

Um die Lymphozytenpopulation der SMZ zu charakterisieren, wurde eine systematische FACS Analyse durchgeführt. Ein repräsentatives Experiment ist in Abb. 3.3 für Schwamm 32.2 dargestellt. Die Lymphozytenpopulation bestand hauptsächlich aus $CD3^+$ T-Lymphozyten, die zu $\sim 80\%$ $CD4^+$ und zu $\sim 20\%$ $CD8^+$ waren. NK-Zellen, gefärbt mit einem Anti-CD56 mAk, γ/δ -T-Lymphozyten und ein paar wenige B-Lymphozyten ($CD19^+$) konnten ebenfalls nachgewiesen werden. *Table 2. Characterization of foam lymphocyte populations* (siehe: 8 Veröffentlichung) zeigt komplementäre Ergebnisse von sieben verschiedenen Schwämmen. Die Mehrheit der Lymphozyten war $CD2^+$ (Mittelwert, MW: 87%) und $CD3^+$ (MW: 80%). Dazu kam eine kleine Menge an kontaminierenden Makrophagen ($CD14^+$, 1.5-5.3%). $CD4^+$ T-Lymphozyten machten 57-84% und $CD8^+$ T-Lymphozyten 16-36% aller $CD3^+$ T-Lymphozyten aus. NK-Zellen (4.2-15.9%, MW: 9.6%) konnten in allen Experimenten nachgewiesen werden, γ/δ -T-Lymphozyten in sechs von sieben (0.7-3.1%) und B-Lymphozyten in 5 von 7 Experimenten (0.2-2.1%). Diese Ergebnisse zeigen, dass immer, wenn auch in geringer Anzahl, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten, sowie NK-Zellen in die PVA-Schwämme infiltrieren. Ausserdem lassen sich häufig γ/δ -T-Lymphozyten und B-Lymphozyten nachweisen.

3.4.2 Makrophagenpopulation und Dendritische Zellen

Makrophagen und Dendritische Zellen sind äusserst potente Antigen-präsentierende Zellen. Makrophagen dienen in erster Linie der Phagozytose sowie der Reaktivierung bereits sensibilisierter, antigen-spezifischer T-Lymphozyten. Dendritische Zellen sind die einzigen Zellen, die eine primäre Immunantwort auslösen können (Banchereau et al., 2000). Um zu prüfen, ob Antigen-präsentierende Zellen in den SMZ zu finden sind, wurde neben der Lymphozytenpopulation auch die darüberliegende Population charakterisiert (siehe Abb. 3.2, Schwamm 56.1 und 54.1, re. Diagramme). Bei PBMZ gesunder Probanden entspricht diese Population erfahrungsgemäss den Monozyten. Monozyten sind die Vorstufe der Makrophagen. Sie zirkulieren, nach ihrer Entstehung im Knochenmark, 1-2 Tage im peripheren Blut und wandern dann ins Gewebe, bzw. an

den Ort einer bestehenden Infektion, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren. Bei den in die PVA-Schwämme infiltrierte Zellen dürfte es sich aus diesem Grund wohl am ehesten um Makrophagen handeln. Sie werden daher im Text auch als Schwamm-Makrophagen bezeichnet. Sowohl die Monozyten, als auch die Makrophagen sind deutlich grösser und granulöser als die Lymphozyten und zeigen sich, wie bereits erwähnt, im FACS als eigenständige Population. Abb. 3.4 zeigt die histogrammische Auswertung der Makrophagenpopulation des Schwammes 40.2.

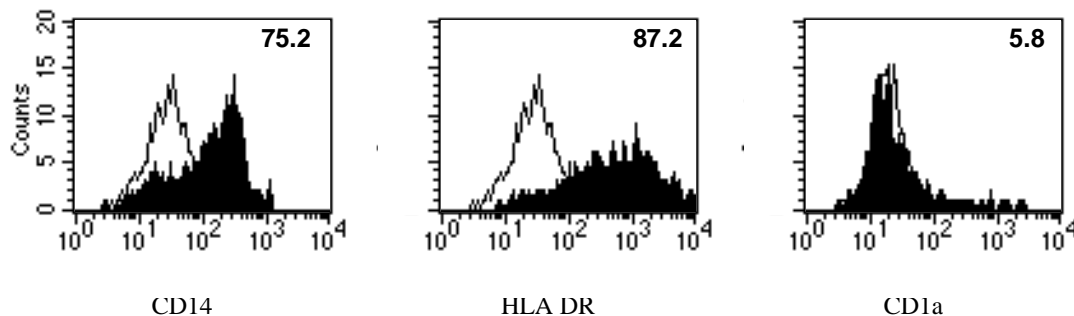


Abb. 3.4: Charakterisierung der Makrophagenpopulation des Schwammes 40.2. Die SMZ wurden mit mAk, spezifisch für die Oberflächenmarker CD14, HLA-DR und CD1a gefärbt und die Makrophagenpopulation im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert. Schwarze Kurve: Färbung mit mAk. Weisse Kurve: Isotyp Kontrolle. Angaben in % positiver Zellen an der Makrophagenpopulation.

Wie im linken Histogramm zu erkennen ist, waren 75.2% der Zellen CD14⁺ Makrophagen. 87.2% der Zellen exprimierten HLA-DR (MHC-Klasse-II-Molekül) an ihrer Zelloberfläche. Dies deutet auf die Anwesenheit weiterer HLA-DR⁺ Zellen hin. Tatsächlich liessen sich bei genauerer Analyse 5.8% CD1a⁺ Zellen in dieser Population finden. Da CD1a (MHC-Klasse-I-ähnliches-Molekül) ein typischer Marker für Antigen-präsentierende Zellen ist, der am stärksten von Dendritischen Zellen exprimiert wird (Collins und Kaufmann, 2001), deutet dies, entgegen der bisherigen Ergebnisse (siehe 3.1 Immunhistochemische Analyse der Schwamm-infiltrierenden Zellen), auf die

Anwesenheit Dendritischer Zellen in den PVA-Schwämmen hin. Betrachtet man dieses Ergebnis im Bezug auf die Gesamtmenge der SMZ, die bei diesem Patienten nach beiden Isolierungsschritten 1.1×10^6 betrug, so waren 9.3% der SMZ CD14⁺ Makrophagen (~ 100.000 Zellen). Ungefähr 6600 Zellen (0.6%) trugen CD1a an ihrer Oberfläche. Tab. 3.2 zeigt komplementäre Ergebnisse von fünf verschiedenen Schwämmen.

Tabelle 3.2: Charakterisierung der Schwamm-Monozytenpopulation

Schwamm	HLA-DR	CD14	CD1a
39.3	83.8 ^C	66.6	2.4
40.2	87.2	75.2	5.8
42.1	85.1	79.4	3.2
42.2	87.2	60.9	4.3
50.1	72.9	46.1	1.1
MW ^A ± STABW ^B	83.2 ± 6.0	63.3 ± 13.8	3.4 ± 1.8

^AMW, Mittelwert. ^BSTABW, Standardabweichung.

^CAngaben in % positiver Zellen an der Monozytenpopulation.

Die Mehrheit der Zellen war HLA-DR⁺ (MW: 83.2%). Makrophagen (CD14⁺) machten 46.1-79.4% der Population aus (MW: 63.3%). CD1a⁺ Zellen konnten, wenn auch in sehr geringer Anzahl (1.1-5.8%), immer nachgewiesen werden. Zur Bestätigung, dass neben den Lymphozyten und Makrophagen auch Dendritische Zellen in die PVA-Schwämme infiltrieren, sollten deshalb weitere Experimente durchgeführt werden, die sich ausschliesslich auf den Nachweis dieser Zellart konzentrieren (siehe: 4.1.4 Dendritische Zellen). Dies könnte sowohl mit Hilfe der Durchflusszytometrie, als auch

anhand eines funktionellen Nachweises durch *in vitro* Aktivierung der Dendritischen Zellen geschehen.

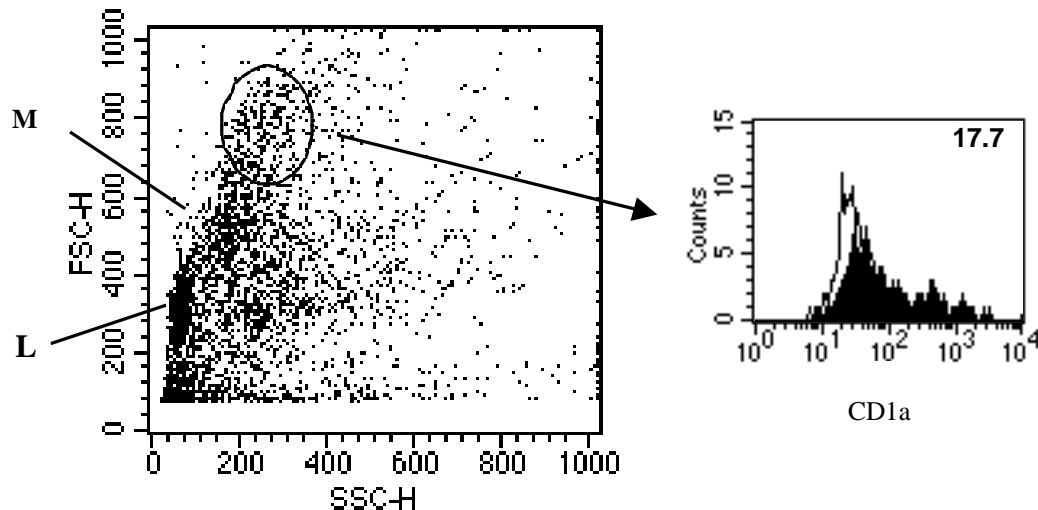


Abb. 3.5: FACS-Analyse einer einmalig auftretenden Zellpopulation. Diagramm: SMZ des Schwammes 40.2, aufgetragen nach der Grösse (FSC) und der Granularität (SSC). Histogramm: Analyse der eingekreisten Zellen des Diagramms nach Färbung mit einem mAk, spezifisch für CD1a. L, Lymphozyten. M, Makrophagen.

Interessanterweise war im isolierten Zellinfiltrat des Schwammes 40.2 eine dritte Zellpopulation zu erkennen. Diese bestand zu 80.4% aus HLA-DR⁺ Zellen. Ausserdem konnten 39% CD14⁺ Makrophagen und 17,7% CD1a⁺ Zellen, möglicherweise Dendritische Zellen, nachgewiesen werden (Abb. 3.5). Es muss erwähnt werden, dass diese Population in keinem der anderen Charakterisierungs-Experimente gesehen werden konnte, was vermutlich auf eine von Patient zu Patient variable Infiltration der SMZ zurückzuführen ist.

3.5 Funktionelle Analysen der SMZ

3.5.1 Analyse der Lebensfähigkeit der Schwamm-T-Lymphozyten

Um die Lebensfähigkeit der Schwamm-T-Zellen nach FDGZ zu untersuchen, wurden sie zusammen mit dem polyklonalen Stimulus PHA-L und rh-IL-2 inkubiert. Abb. 3.6 (ob., li. Diagramm) zeigt die FACS-Analyse des Schwammes 13.1 am Tag 0.

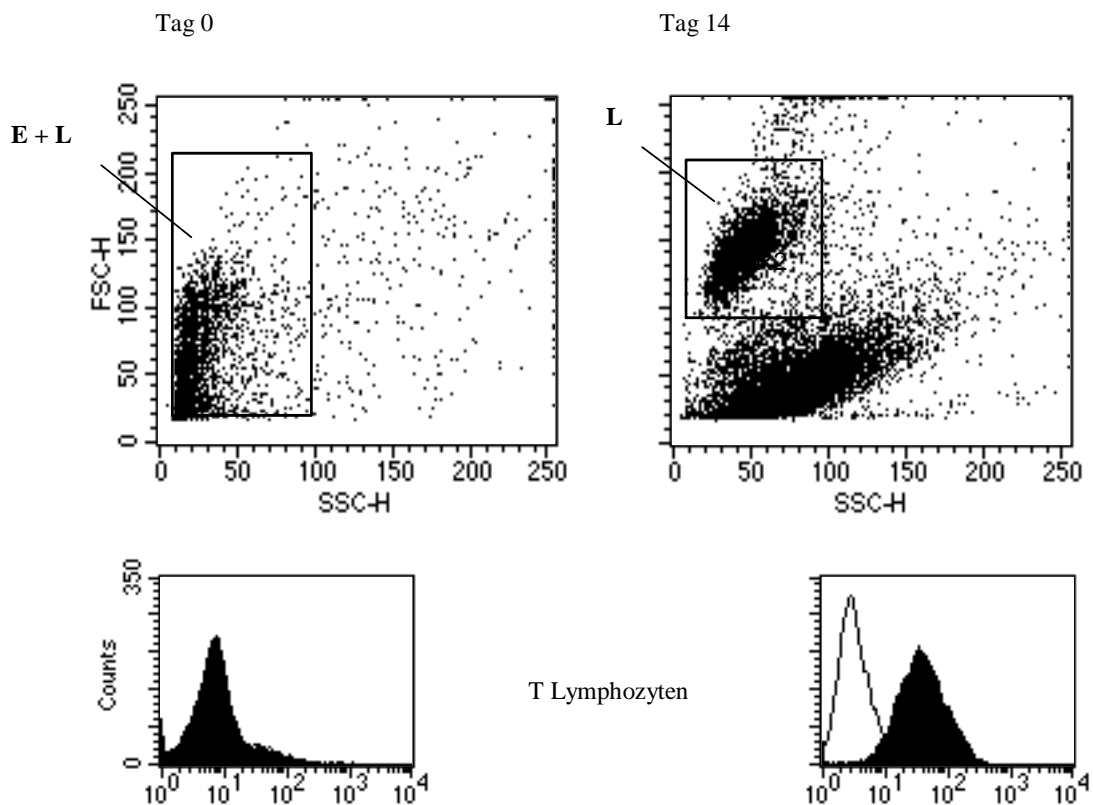


Abb. 3.6: FACS-Analyse der SMZ des Schwammes 13.1 nach der Grösse (FSC) und der Granularität (SSC) am Tag 0 nach FDGZ (ob., li. Diagramm) und am Tag 14 nach Inkubation mit PHA-L und rh-IL-2 (ob., re. Diagramm). Histogramme (u., li. und u., re.): Zeitgleiche Analyse der in den Diagrammen umrandeten Zellen nach Färbung mit einem mAk, spezifisch für den Oberflächenmarker CD3. Schwarze Kurve: Färbung mit mAk. Weisse Kurve: Isotyp Kontrolle. E, Erythrozyten. L, Lymphozyten.

Zur genaueren Charakterisierung wurden die SMZ mit einem mAk spezifisch für CD3 gefärbt und die umrandeten Zellen im darunterliegenden Histogramm ausgewertet. Wie bereits in vorherigen Experimenten mit SMZ nach FDGZ festgestellt (siehe: 3.2 Vergleich der Schwammmaterialien Coldex und Vacuseal und 3.3 Isolierung der SMZ), konnten auch hier die CD3⁺ T-Lymphozyten nicht von den umgebenden Erythrozyten abgegrenzt werden. Im Histogramm sieht man deshalb nur einen sehr ungenauen und damit schwierig auswertbaren Peak CD3⁺ T-Lymphozyten. Analysiert man die Zellen nach 14 Tagen Inkubation bei 37° C, so findet man im ob., re. Diagramm eine deutlich abgrenzbare, grosse Zellpopulation, die zu mehr als 90% aus CD3⁺ Blasten (aktivierte T-Lymphozyten) besteht (u., re. Histogramm). Die zweite Zellpopulation im Diagramm besteht aus wesentlich kleineren Zellen, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um abgestorbene Zellen und Zelltrümmer handelt. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich in den PVA-Schwämmen lebensfähige, stimulierbare T-Lymphozyten befinden, die zur weiteren Analyse der Funktionalität verwendet werden können.

Leider führten weniger als 50% der direkt nach FDGZ durchgeführten T-Zell-Stimulationen mit PHA-L tatsächlich zur Proliferation. Häufig befanden sich nach mehreren Tagen keine lebenden Zellen mehr in der Zellkultur. Vermutlich war in diesen Fällen der Anteil der T-Lymphozyten am Zellinfiltrat zu niedrig. Hinzu kommt die *in vitro* möglicherweise toxische Wirkung abgestorbener Zellen (hämolytierte Erythrozyten, Neutrophile Granulozyten) auf die Zellkultur. In einigen Fällen waren die Kulturen mit bakteriellen Erregern kontaminiert. Da die PVA-Schwämme aus infizierten Wunden entnommen worden waren, galt der Schwamm selber als eine mögliche Kontaminationsquelle. Aus diesem Grund wurde in den Experimenten zur funktionellen Analyse der Schwamm- und peripheren Blut-T-Lymphozyten ein weiteres Antibiotikum (Gentamycin) zum Medium hinzugegeben (siehe: 2.6.2 Funktionelle Analyse und Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten). Zusätzlich war die Inkubationsdauer der erfolgreichen Zellkulturen mit 5-17 Tagen äusserst variabel. Das vorliegende Versuchssystem war damit zur zuverlässigen Analyse der T-Zell-Funktionalität nicht geeignet. Diese Ergebnisse trugen, neben der schwierigen FACS-Analyse des Schwamm-Zellinfiltrates nach FDGZ, zur Entwicklung des unter 3.3 (Isolierung der SMZ) eingeführten, zusätzlichen Isolierungsschrittes mittels MACS bei.

3.5.2 Analyse der SMZ auf aktivierte T-Lymphozyten

Zur weiteren Analyse der Schwamm-T-Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch ihre Expression von typischen Aktivierungsmarkern gemessen und mit der autologer, peripherer Blut-T-Lymphozyten verglichen. Die Ergebnisse sind unter *Results, Activation stage of foam T lymphocytes* (siehe: 8 Veröffentlichung) beschrieben. Sie werden aber, da weitere informative Daten und Tabellen vorliegen, hier nochmals ausführlich dargestellt.

Um die T-Lymphozyten der SMZ genauer zu analysieren, wurden die Zellen mit zwei verschiedenen mAk gleichzeitig gefärbt. Einer der Antikörper war gegen die T-Zell-Marker CD3, CD4, CD8 gerichtet und der andere gegen die, für T-Lymphozyten spezifische, Aktivierungsmarker CD45RO, CD25 und HLA-DR. Wie in *Fig. 2 PVA foam-derived T lymphocytes express activation markers* (siehe: 8 Veröffentlichung) dargestellt, exprimierten die Mehrzahl der CD3⁺ (83.4%), CD4⁺ (92.7%) und CD8⁺ (73.4%) Schwamm-T-Lymphozyten den klassischen Gedächtnis-/Aktivierungsmarker CD45RO. Die α -Kette des IL-2 Rezeptors, die ebenfalls nach T-Zell-Aktivierung exprimiert wird, war auf 28.9% der CD4⁺ T-Lymphozyten und nur auf 3.3% der CD8⁺ T-Lymphozyten zu finden. MHC-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR) konnten auf 54.4% der CD4⁺ und auf der Mehrheit der CD8⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

Um festzustellen, ob die aktivierten T-Lymphozyten aufgrund der vorhandenen Infektion in den PVA-Schwamm einwandern, wurden dieselben Färbungen an Schwamm-T-Lymphozyten weiterer Patienten, an autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten der jeweiligen Patienten und zusätzlich als Kontrolle an peripheren Blut-T-Lymphozyten gesunder Probanden durchgeführt. *Table 3. Comparison of activation stage between FMCs and autologous patient PBMCs* (siehe: 8 Veröffentlichung) zeigt einen schwachen, aber dennoch signifikanten Anstieg (5-27%) in der Expression des Gedächtnis-/Aktivierungsmarkers CD45RO der CD3⁺ Schwamm-T-Lymphozyten, im Vergleich zu den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten. CD3⁺CD25⁺ Zellen waren im Schwamm weniger repräsentiert, als im peripheren Blut. Dennoch lag in zwei Fällen (Patienten 43 und 48) sowohl die Anzahl der CD3⁺CD25⁺ Schwamm-T-Lymphozyten, als auch die der autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten über der gesunder Probanden.

Tabelle 3.3: Analyse der SMZ und autologen PBMZ auf aktivierte CD4⁺ T-Lymphozyten

Patient	Analysierte Zellen	% der CD45RO ⁺ in CD4 ⁺	% der CD25 ⁺ in CD4 ⁺	% der HLA-DR ⁺ in CD4 ⁺
43	SMZ (43.1)	81.0	58.4	29.0
	PBMZ	58.3	71.6	11.1
44	SMZ (44.1)	92.7	28.9	54.4
	PBMZ	73.6	26.4	34.1
45	SMZ (45.2)	89.1	NB ^D	40.0
	PBMZ	83.3	35.5	34.1
47	SMZ (47.1)	52.4	NB	17.1
	PBMZ	56.1	NB	24.5
48	SMZ (48.1)	72.8	36.1	35.3
	PBMZ	67.2	55.2	13.4
MW ^A	SMZ	77.6 ± 16.0	41.1 ± 15.4	35.2 ± 13.8
± STABW ^B	PBMZ	67.7 ± 11.2	47.2 ± 23.9	23.4 ± 11.0
GP1 ^C	PBMZ	73.1	33.6	9.4
GP2	PBMZ	76.7	36.6	11.9

^AMW, Mittelwert, ^BSTABW, Standardabweichung, ^CGP, gesunder Proband, ^DNB, Nicht bestimmt.

Tabelle 3.4: Analyse der SMZ und autologen PBMZ auf aktivierte CD8⁺ T-Lymphozyten

Patient	Analysierte Zellen	% der CD45RO ⁺ in CD8 ⁺	% der CD25 ⁺ in CD8 ⁺	% der HLA-DR ⁺ in CD8 ⁺
43	SMZ (43.1)	25.7	12.0	26.0
	PBMZ	NB ^D	6.1	5.1
44	SMZ (44.1)	73.4	3.3	87.5
	PBMZ	29.3	2.6	53.4
45	SMZ (45.2)	72.7	6.0	66.9
	PBMZ	57.8	7.3	72.5
47	SMZ (47.1)	20.2	NB	35.1
	PBMZ	16.2	NB	43.2
48	SMZ (48.1)	33.6	8.9	43.9
	PBMZ	30.6	5.5	28.8
MW ^A	SMZ	45.1 ± 25.9	7.6 ± 4.5	51.9 ± 25.0
± STABW ^B	PBMZ	33.5 ± 21.3	5.4 ± 2.4	40.6 ± 25.4
GP1 ^C	PBMZ	55.5	7.0	12.6
GP2	PBMZ	47.3	10.4	15.6

^AMW, Mittelwert, ^BSTABW, Standardabweichung, ^CGP, gesunder Proband. ^DNB, Nicht bestimmt.

Ferner konnte ein Anstieg der CD3⁺HLA-DR⁺ Schwamm-T-Lymphozyten im Vergleich zu den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten beobachtet werden. In vier von fünf untersuchten Patienten war der Prozentsatz an CD3⁺HLA-DR⁺ Schwamm-T-Zellen höher als der der peripheren Blut-T-Lymphozyten gesunder Probanden. Tab. 3.3 und Tab. 3.4 zeigen die Ergebnisse der CD4⁺ und CD8⁺ Schwamm-T-Lymphozyten im Vergleich zu den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten und den peripheren Blut-T-Lymphozyten gesunder Probanden. Bei vier von fünf Patienten konnte, im Vergleich zu den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten, ein Anstieg (5.6-22.7%) der Expression des Gedächtnis-/Aktivierungsmarkers CD45RO⁺ auf den CD4⁺ Schwamm-T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Bei drei der Patienten enthielten ausserdem die Schwämme mehr CD4⁺CD45RO⁺ T-Lymphozyten als die peripheren Blut-T-Lymphozyten gesunder Probanden. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Analyse der CD8⁺ T-Lymphozyten. Die Anzahl der CD4⁺CD25⁺ T-Lymphozyten war in zwei von drei untersuchten Schwämmen niedriger als im autologen, peripheren Blut. Dennoch konnte bei einem Patienten (43) ein Anstieg der CD4⁺CD25⁺ Schwamm-T-Lymphozyten und der autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten, gegenüber den gesunden Probanden, beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der CD3⁺ T-Lymphozyten (siehe oben). CD8⁺CD25⁺ Schwamm-T-Lymphozyten unterschieden sich in der Menge weder von denen der autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten noch von denen der peripheren Blut-T-Lymphozyten gesunder Probanden und waren insgesamt in geringer Anzahl (< 12%) vorhanden. Da der IL-2-Rezeptor nur von sehr wenigen CD8⁺ T-Lymphozyten exprimiert wird, entspricht dies dem erwarteten Ergebnis. Bei vier von fünf der Patienten konnte, im Vergleich zu den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten, ein signifikanter Anstieg der CD4⁺HLA-DR⁺ Schwamm-T-Lymphozyten festgestellt werden (5.9-21.9%). Dies war bei den CD8⁺HLA-DR⁺ Schwamm-T-Lymphozyten nur bei drei von fünf Patienten der Fall (15.1-34.1%). Desweiteren wurde auf den CD4⁺ und den CD8⁺ Schwamm-T-Lymphozyten, sowie auf den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten bei vier der fünf Patienten mehr HLA-DR exprimiert, als bei den peripheren Blut-T-Lymphozyten gesunder Probanden. Diese Daten indizieren, dass die Schwamm-T-Lymphozyten eine eigene Zellpopulation ausmachen, die sich von den autologen, peripheren Blut-T-

Lymphozyten unterscheidet und die eine grosse Subpopulation an Aktivierungsmarker exprimierenden Zellen enthält.

3.5.3 Funktionelle Analyse und Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten

Die Ergebnisse der funktionellen Analyse der Schwamm-T-Lymphozyten und der peripheren Blut-T-Lymphozyten sind ausführlich unter *Results, Functional study of patient's foam and peripheral T cells* und in *Fig. 3. Proliferative responses of FMCs and autologous patient PBMCs upon stimulation with various antigens* (siehe: 8 Veröffentlichung) beschrieben. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die PVA-Schwämme nach durchschnittlich siebentägiger Implantation funktionelle T-Lymphozyten enthalten, die fähig sind auf verschiedene Stimuli wie PHA-L, Recall-Antigene oder Superantigene zu proliferieren. Interessanterweise unterschied sich die proliferative Antwort der Schwamm-T-Lymphozyten fast immer von der autologer, peripherer Blut-T-Lymphozyten. Die Untersuchungen zur Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten in Bezug auf den Wunderreger resultierten ebenfalls in einer von den peripheren Blut-T-Lymphozyten völlig abweichenden Antwort. Sie deuten ausserdem auf eine lokale Beteiligung Erreger-spezifischer T-Lymphozyten an der Abwehr der Wundinfektion hin. Gemeinsam mit den Ergebnissen aus 3.5.2 (Analyse der SMZ auf aktivierte T-Lymphozyten) bestätigt dies die Anwesenheit einer T-Zellpopulation innerhalb der PVA-Schwämme, die sich eindeutig von den T-Lymphozyten des autologen, peripheren Blutes unterscheidet und die aktiv an der lokalen Erregerabwehr beteiligt zu sein scheint.

3.5.4 Differenzierung von Dendritischen Zellen

Um die Schwamm-infiltrierenden Makrophagen weiter zu charakterisieren wurde versucht, Dendritische Zellen aus ihnen zu differenzieren. Die verwendeten Makrophagen entstammten den Schwamm-Zellinfiltraten nach FDGZ. In 2/11

untersuchten Schwämmen war es nach 7-tägiger Inkubation mit rh-GM-CSF, rh-IL-4 und rh-TNF- α möglich, eine für die durchflusszytometrische Analyse ausreichende Menge an Zellen zu differenzieren, welche die typischen Oberflächenmarker Dendritischer Zellen (CD1a und HLA-DR) exprimierten. Die geringe Erfolgsquote dieser Experimente lag vermutlich an der sehr begrenzten Anzahl der Schwamm-Makrophagen im Zellinfiltrat nach FDGZ. Abb. 3.7 zeigt die Charakterisierung der Zellen nach der Einzelfärbung mit mAk, spezifisch für CD1a und HLA-DR.

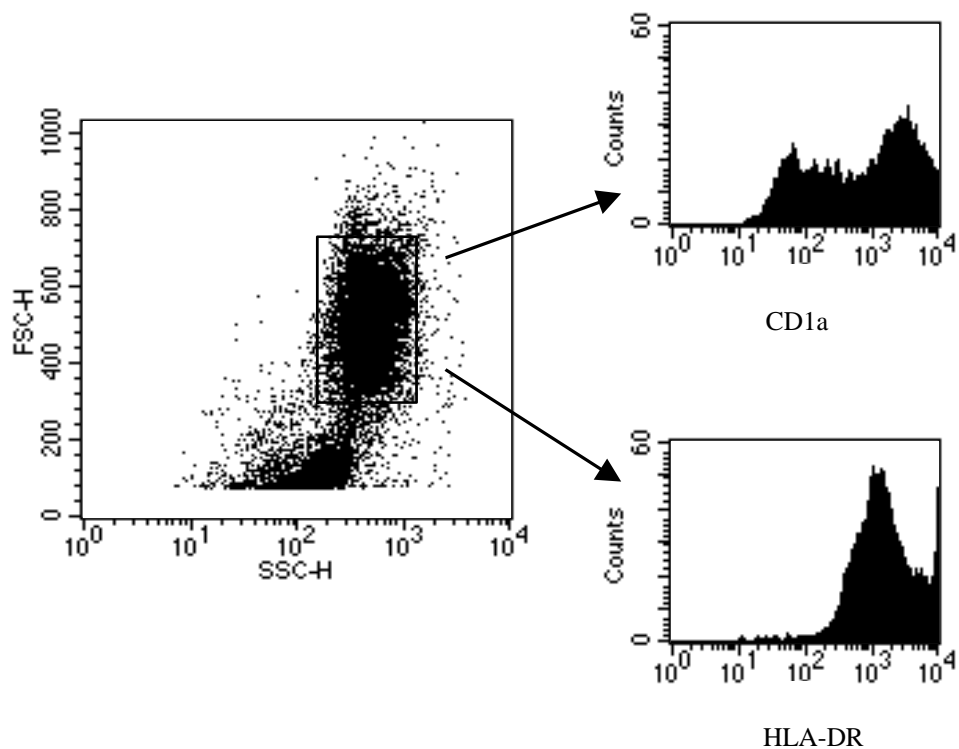


Abb. 3.7: FACS-Analyse Dendritischer Zellen differenziert aus Schwamm Makrophagen des Patienten 57 durch 7-tägige Inkubation mit rh-GM-CSF, rh-IL-4 und rh-TNF- α . Linkes Diagramm: Analyse der Zellen nach der Grösse (FSC) und der Granularität (SSC). Histogramme: Identifizierung der umrandeten Zellpopulation durch Färbung mit mAk, spezifisch für CD1a (ob. Histogramm) und HLA-DR (u. Histogramm). Schwarze Kurve: Färbung mit mAk.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Mehrzahl der Zellen sowohl CD1a⁺ als auch HLA-DR⁺ war. Leider waren für eine Isotyp Kontrolle nicht genügend Zellen vorhanden. Als Kontrolle dienten Dendritische Zellen, die aus peripheren Blut-Monozyten eines gesunden Probanden differenziert worden waren. Sie wurden mit den genannten Markern, sowie den dazugehörigen Isotyp Kontrollen angefärbt und durchflusszytometrisch ausgewertet. Die hierbei verwendeten FACS-Parameter dienten als Grundlage für die Messung und Auswertung der Schwamm-Dendritischen Zellen (Daten nicht gezeigt).

In weiteren Experimenten wurde nach der Methode von Oehler et al. versucht, aus den vielen Neutrophilen Granulozyten nach FDGZ Dendritische Zellen zu differenzieren, was in keinem der 5 Versuche gelang (Oehler et al., 1998).

Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass es möglich ist aus den Schwamm-Makrophagen CD1a⁺/HLA-DR⁺ Zellen zu generieren, bei denen es sich vermutlich um Dendritische Zellen handelt. Weitere Experimente sollten sich, aufgrund der geringen Anzahl an Schwamm-Makrophagen, ausschliesslich mit der Differenzierung und Charakterisierung von Dendritischen Zellen befassen (siehe: 4.2.4 Differenzierung von Dendritischen Zellen).

4 Diskussion

4.1 Zusammensetzung des Zellinfiltrates in PVA-Schwämmen

4.1.1 Neutrophile Granulozyten und Erythrozyten

Die Ergebnisse der Immunhistochemie (siehe: *Fig. 1. Histochemical and immunohistochemical staining of paraffin-embedded sections from foam 30.2* (8 Veröffentlichung)) sowie der FACS-Analyse nach FDGZ (siehe: Abb. 3.1, Abb. 3.2 und Tab. 3.1) zeigen, dass der Grossteil der Zellen, die während der VAC-Therapie infizierter Wunden den implantierten PVA-Schwamm infiltrieren, aus Neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten besteht. SMZ (Lymphozyten und Makrophagen) wandern immer in den PVA-Schwamm ein, machen aber nur einen sehr kleinen Anteil am Zellinfiltrat aus. Das Verhältniss zwischen Neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten variiert von Patient zu Patient. Die Schwämme können bereits nach der Entnahme, entsprechend ihrem Aussehen, in granulozytenreich (gelblicher Schwamm) oder erythrozytenreich (rötlicher Schwamm) unterteilt werden. Wie bereits unter 1.1 (Physiologie der Wundheilung) ausführlich beschrieben, sind Neutrophile Granulozyten die ersten Zellen, die in eine frische, nicht-infizierte Wunde während der Entzündungsphase einwandern. Sie erreichen ihr Maximum nach 48h (Ross und Benditt, 1962). Liegt eine Wundinfektion zum Beispiel durch extrazelluläre, bakterielle Erreger vor, so kommt es zur gesteigerten Produktion von chemotaktisch wirkenden Substanzen, wie TNF- α , IL-1, IL-6, die weitere Neutrophile Granulozyten zum Ort des Geschehens locken. Zusätzlich haben bakterielle Zerfallsprodukte und nekrotisches Gewebe eine stark chemotaktische Wirkung auf Neutrophile Granulozyten (Nwomeh et al., 1998). Die Phagozytose durch Neutrophile Granulozyten und Makrophagen stellt einen der Hauptabwehrmechanismen gegen extrazelluläre, bakterielle Erreger dar. Nach erfolgreicher Zerstörung der phagozytierten Bakterien zerfallen die Neutrophilen Granulozyten. Es bildet sich Eiter, der dem Schwamm seine gelbliche Farbe verleiht

(Kaufmann, 1999). Die Wundinfektionen der in dieser Studie untersuchten Patienten wurden alle durch extrazelluläre Bakterien verursacht (siehe: *Table 1. Patients involved in the study* (8 Veröffentlichung) und Tab. 2.1). Die unterschiedlich starke Infiltration Neutrophiler Granulozyten und damit auch die Farbe des Schwammes steht demnach im Zusammenhang mit dem Ausmass der bestehenden Wundinfektion. Vermutlich waren die Wunden, aus denen die gelblichen PVA-Schwämme entnommen wurden wesentlich stärker infiziert, als die, aus denen die rötlichen entnommen wurden. Letztere könnten allerdings ihre rötliche Farbe auch durch Blutungen während der Implantation oder der Entnahme des PVA-Schwammes erhalten haben. Beide Hypothesen erfordern zur vollständigen Bestätigung die Analyse einer grösseren Anzahl von Patienten, wie sie in dieser Studie nicht durchführbar war. Während man bei granulozytenreichen Schwämmen davon ausgehen kann, dass die vorhandenen Zellen durch chemotaktische Stoffe in den PVA-Schwamm rekrutiert werden, besteht bei erythrozytenreichen Schwämmen zusätzlich die Möglichkeit, dass ein Teil der Neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen im Laufe einer Blutung eingeschwemmt wird. Die Untersuchungen der Schwamm-T-Lymphozyten in Bezug auf ihre Funktionalität, Aktivität und Spezifität (siehe: 3.5.2 Analyse der SMZ auf aktivierte T-Lymphozyten und 3.5.3 Funktionelle Analyse und Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten) zeigen allerdings, dass diese sich deutlich von den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten unterscheiden. Dadurch ist die Einschwemmung von T-Zellen und damit im weiteren Sinne auch die der anderen Zellen in den PVA-Schwamm aufgrund einer Blutung widerlegt.

Da die Isolierung des Schwamm-Zellinfiltrates mit FDGZ die SMZ nicht ausreichend von den Neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten trennen konnte, wurde ein zweiter Isolierungsschritt eingeführt. Mit Hilfe von MACS (siehe: Abb. 3.2) wurden die störenden Neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten erfolgreich entfernt. Von den durchschnittlich 24×10^7 Zellen/Schwamm nach FDGZ blieben durchschnittlich 1.5×10^6 Zellen/Schwamm übrig, die zum Grossteil aus Lymphozyten und Makrophagen bestanden. Die zusätzliche Isolierung mit MACS ermöglichte die genauere phenotypische und funktionelle Analyse der SMZ. Sie waren trotz ihrer geringen Anzahl in jedem PVA-Schwamm nachweisbar. Da die Lymphozyten und Makrophagen wegen ihrer unterschiedlichen Grösse und Granularität im FACS zwei

verschiedene Zellpopulationen darstellen, konnten diese getrennt voneinander untersucht werden.

4.1.2 Lymphozyten

Die Lymphozytenpopulation der SMZ besteht im Mittel zu 87% aus $CD2^+$, bzw. zu 81% aus $CD3^+$ T-Lymphozyten. Die letzteren sind hauptsächlich aus $CD4^+$ T-Lymphozyten und zu einem geringeren Anteil aus $CD8^+$ T-Lymphozyten zusammengesetzt. Zusätzlich wurden in geringer Anzahl NK-Zellen ($CD56^+$), γ/δ -T-Lymphozyten, und manchmal auch B-Lymphozyten ($CD19^+$) nachgewiesen. Für die Einwanderung der T-Lymphozyten in die Wunde, bzw. den PVA-Schwamm sind verschiedene Gründe denkbar. Der Nachweis von T-Lymphozyten in den PVA-Schwämmen während der VAC-Therapie steht im Einklang mit den Ergebnissen von Ross und Benditt, die mit Hilfe der Lichtmikroskopie bereits 1962 Lymphozyten innerhalb von heilenden Wunden am Schwein zeigen konnten. Sie erforschten ausserdem, dass die Lymphozyten ab dem ersten Tag nach der Verletzung in die frische, nicht-infizierte Wunde einwandern, um dort ihr Maximum am sechsten Tag zu erreichen (Ross und Benditt, 1962) (siehe: Abb. 1.1). Eine spätere Studie, die lichtmikroskopisch Biopsien heilender, humaner Wunden untersuchte, konnte hauptsächlich T-Lymphozyten, aber keine B-Lymphozyten nachweisen (Martin und Muir, 1990). Dies korreliert mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die zeigen, dass immer T-Lymphozyten, aber nur manchmal einige wenige B-Lymphozyten in den PVA-Schwämmen zu finden sind. Die Beteiligung der T-Lymphozyten an der Wundheilung ist bislang nur wenig untersucht (siehe: 1.1 Physiologie der Wundheilung). Entfernt man aus Mäusen alle T-Lymphozyten, so führt dies zu einer gestörten Kollagensynthese und nachfolgend zu einer verschlechterten Wundreissfestigkeit (Peterson et al., 1987), (Efron et al., 1990). Die Entfernung der $CD4^+$ T-Lymphozyten zeigt keinerlei Effekt auf die Wundheilung, die der $CD8^+$ T-Lymphozyten verbessert die untersuchten Wundheilungsparameter (Barbul et al., 1989). Dies spricht einerseits für einen negativen Effekt der $CD8^+$ T-Lymphozyten und andererseits für einen positiven Effekt der $CD4^+/CD8^-$ T-Lymphozyten (vermutlich γ/δ -T-Lymphozyten und NK-Zellen) auf

die Wundheilung (Efron et al., 1990). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass T-Lymphozyten zur Regulation der Wundheilung wichtige Wachstumsfaktoren (TGF- β , FAF) und Zytokine (TNF- α , IFN- γ) sezernieren (Schaffer und Barbul, 1998). Um weitere Einsicht in die Beteiligung der T Lymphozyten an der Wundheilung zu bekommen, sind Experimente notwendig, die zum einen die CD4⁻/CD8⁻ T-Zellen genauer charakterisieren und zum anderen herausfinden, auf welche Art und Weise diese Zellen den Heilungsprozess der Wunde fördern. Dies könnte sowohl am Tiermodell, als auch im humanen System mit Hilfe der PVA-Schwämme nach der VAC-Therapie untersucht werden. Allerdings würden sich für diese Fragestellung nur PVA-Schwämme eignen, die in akuten, nicht infizierten Wunden eingesetzt werden, um weitere, die Infiltration der T-Lymphozyten möglicherweise beeinflussende Faktoren zu vermeiden. In dieser Studie hatten, wie bereits erwähnt, alle Patienten eine Wundinfektion mit extrazellulären Bakterien (siehe: *Table 1. Patients involved in the study* (8 Veröffentlichung) und Tab. 2.1). Vor allem CD4⁺ T-Lymphozyten werden im Laufe solch einer Infektion zur Unterstützung der Erregerabwehr an den Ort des Geschehens rekrutiert (Kaufmann, 1999). Daher ist die vorherrschende Wundinfektion ein weiterer möglicher Grund für eine Infiltration, zumindest der CD4⁺ T-Lymphozyten, in die infizierte Wunde, bzw. den PVA-Schwamm. Tatsächlich liessen sich in der Lymphozytenpopulation sehr viele CD4⁺ T-Lymphozyten zeigen. CD8⁺ T-Lymphozyten machten dagegen einen wesentlich kleineren Anteil der CD3⁺ T-Lymphozyten aus (siehe: *Table 2. Characterization of foam lymphocyte populations* (8 Veröffentlichung) und Abb. 3.3). Ob die CD4⁺ T-Lymphozyten aufgrund der vorhandenen Wundinfektion in die PVA-Schwämme infiltrieren, war eine der Hauptfragestellungen dieser Arbeit (siehe: 3.5.2 Analyse der SMZ auf aktivierte T-Lymphozyten und 3.5.3 Funktionelle Analyse und Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten) und wird unter 4.2.3 (Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten) ausführlich diskutiert. Ferner könnte eine Fremdkörperreaktion für die Rekrutierung der T-Lymphozyten verantwortlich sein. Fremdkörperreaktionen sind entzündliche Veränderungen in der Umgebung des körperfremden Materials, wie z. B. des PVA-Schwammes, mit den typischen Entzündungszeichen Tumor, Rubor, Calor, Dolor und Functio laesa. Das Ausmass der Fremdkörperreaktion auf implantierte Schwämme scheint vom verwendetem Schwammmaterial abzuhängen und reicht von einer

schwachen bis zu einer signifikanten Reaktion (Roberts und Hayry, 1976), (Akporiaye et al., 1985). Ob und inwiefern eine Fremdkörperreaktion an der Rekrutierung der T-Lymphozyten in die PVA-Schwämme beteiligt war, ist jedoch unklar.

4.1.3 Makrophagen

Sowohl die Ergebnisse der Immunhistochemie (siehe: *Fig. 1. Histochemical and immunohistochemical staining of paraffin-embedded sections from foam 30.2.* (8 Veröffentlichung)), als auch die der Durchflusszytometrie zeigen, dass sich immer Makrophagen in den Schwämmen befinden. Zum einen war jedesmal eine kleine Anzahl an kontaminierenden Makrophagen in der Lymphozytenpopulation vorhanden (1.5-5.3%, siehe: *Table 2. Characterization of foam lymphocyte populations* (8 Veröffentlichung)), zum anderen konnten in allen durchflusszytometrisch analysierten SMZ separate Makrophagenpopulationen nachgewiesen werden (siehe: Abb. 3.4 und Tab. 3.2). Im Mittel trugen 83% der Makrophagenpopulation HLA-DR. Ausserdem waren 63% der Zellen CD14⁺ und 3.4% CD1a⁺. Wie auch für die T-Lymphozyten, gibt es für die Makrophagen mehrere mögliche Gründe für die Anwesenheit innerhalb des PVA-Schwammes nach der VAC-Therapie infizierter Wunden. Leibovich und Ross zeigten bereits 1975 am Schwein, dass Makrophagen vom ersten Tag ab in die frische Wunden infiltrieren. Wurde dies verhindert, ergaben sich schwere Störungen in der Heilung der Wunde (Leibovich und Ross, 1975). Makrophagen sind an der Regulation der Matrixsynthese beteiligt (Leibovich und Ross, 1976) und zusätzlich verantwortlich für die Reinigung der Wunde von nekrotischem Gewebe und unerwünschten Eindringlingen. Ausserdem produzieren sie Wachstumsfaktoren und Zytokine, die T-Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen rekrutieren und aktivieren (Rappolee et al., 1988), (Witte und Barbul, 1997), (Cooper, 1999). Bei der Immunabwehr von extrazellulären, bakteriellen Erregern haben Makrophagen verschiedene Aufgaben. Zusammen mit den Neutrophilen Granulozyten werden sie zum Infektionsort gelockt, um die Bakterien zu phagozytieren und im Anschluss daran zu eliminieren (Kaufmann, 1999), (Hahn, 1983). Während die meisten Neutrophilen Granulozyten, nach erfolgter Zerstörung der Bakterien, zu Eiter zerfallen, nehmen die Makrophagen ihre Arbeit als

Antigen-präsentierende Zellen auf. Zur Unterstützung der humoralen Immunantwort präsentieren sie den CD4⁺ T-Lymphozyten bakterielle Antigene, die an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden sind. Dies führt zur Reaktivierung und Vermehrung der spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten, die wiederum über die Sekretion verschiedener Interleukine (IL-2, IL-4, IL-5) die Bildung von neutralisierenden und opsonierenden Antikörpern durch spezifische B-Lymphozyten verstärken (Kaufmann, 1999). Wie bereits im Zusammenhang mit den T-Lymphozyten erwähnt, könnten Fremdkörperreaktionen, gegen die implantierten PVA-Schwämme, zur Infiltration von Entzündungszellen beitragen. In dieser Arbeit ist das einzige Zeichen auf eine Fremdkörperreaktion der immunhistochemische Nachweis von Fremdkörperriesenzellen, die durch die Verschmelzung von Makrophagen entstehen und besonders durch ihre Grösse und ihre Mehrkernigkeit auffallen. In *Fig. 1. Histochemical and immunohistochemical staining of paraffin-embedded sections from foam 30.2* (siehe: 8 Veröffentlichung) sind im oberen Teil des Bildes b, welches die spezifische Färbung der Makrophagen (CD68⁺) darstellt, zwei solcher Fremdkörperriesenzellen zu sehen. Ob bei jedem Patienten eine Fremdkörperreaktion stattgefunden hat, welches Ausmass diese angenommen hat und wieviele der Makrophagen aufgrund einer Fremdkörperreaktion in den Schwamm gelangt sind, ist nicht bekannt und sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Vergleicht man in *Fig. 1. Histochemical and immunohistochemical staining of paraffin-embedded sections from foam 30.2* (siehe: 8 Veröffentlichung) die Färbung der Makrophagen (*Fig. 1. b*) mit der Färbung für CD3⁺ T-Lymphozyten (*Fig. 1. c*), so fällt auf, dass um ein vielfaches mehr Makrophagen zu sehen sind, als CD3⁺ T-Lymphozyten. Die Färbungen wurden direkt nach der Entnahme des Schwammes, ohne weitere Manipulation, durchgeführt. Betrachtet man im Gegensatz dazu die FACS-Auswertungen der SMZ nach den Isolierungsschritten mit Hilfe von FDGZ und MACS (siehe: Abb. 3.2, re. Diagramme), so sieht man, dass sich das Verhältniss von Makrophagen zu Lymphozyten deutlich verringert hat. Aktivierte Makrophagen adhärieren gerne an Gewebe oder fremdes Material, z.B. an die Wand von Zellkulturschalen. Haften sie einmal an einem Material, so lassen sie sich nur schwer wieder davon ablösen. Möglicherweise reicht es für die erfolgreiche Isolierung aller Makrophagen aus den PVA-Schwämmen nicht aus, die verkleinerten Schwammstückchen mehrfach

auszuspülen und auszupressen. Eine Verbesserung der Makrophagenisolation könnte unter anderem durch Inkubation der Schwammstückchen in Trypsin-EDTA erfolgen, wodurch die Makrophagen von dem Material, an dem sie haften, abgelöst werden.

4.1.4 Dendritische Zellen

Obwohl bekannt ist, dass Dendritische Vorläuferzellen aus der Blutbahn, sowie unreife Dendritische Zellen aus dem umliegenden Gewebe im Falle einer Infektion unverzüglich zum Ort der Erregerinvasion wandern (Banchereau et al., 2000), ist das Vorhandensein von Dendritischen Zellen in den PVA-Schwämmen weiterhin unsicher. Immunhistochemisch war es nicht möglich Dendritischen Zellen nachzuweisen. Im Gegensatz dazu konnten in der mittels FDGZ und MACS isolierten Makrophagenpopulation immer ein paar wenige CD1a⁺ Zellen dargestellt werden (1.1-5.8%, siehe: Abb. 3.4 und Tab. 3.2), bei denen es sich sehr wahrscheinlich um Dendritische Zellen handelt. CD1a ist ein MHC-Klasse-I-ähnliches Oberflächenmolekül, von dem man inzwischen weiss, dass es mykobakterielle Zellwandglykolipide präsentiert. Es wird von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert und ist auf Dendritischen Zellen am stärksten vertreten (Collins und Kaufmann, 2001). Damit ist CD1a ein Zellmarker, der zwar auf die Anwesenheit Dendritischer Zellen hinweist, aber alleine gemessen nicht zur vollständigen Bestätigung ausreicht. Dendritische Zellen werden üblicherweise über die gleichzeitige Expression von CD1a und dem MHC-Klasse-II-Molekül HLA-DR charakterisiert (Nunez et al., 1998). Da HLA-DR aber ebenfalls auf anderen Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird, sind zur vollständigen Sicherheit weitere Färbungen nötig. Sinnvoll wäre neben der Doppelfärbung von CD1a und HLA-DR z.B. eine Doppelfärbung von CD1a und einem der kostimulatorischen Moleküle CD80 oder CD86. Leider wurde in dieser Arbeit weder eine Doppelfärbung mit mAk spezifisch für CD1a und HLA-DR, noch eine mit mAk spezifisch für CD1a und CD80, bzw. CD86 durchgeführt. Interessanterweise aber war in allen untersuchten Makrophagenpopulationen die Anzahl der HLA-DR⁺ Zellen höher (MW: 83.2%), als die der CD14⁺ Makrophagen (MW: 63.3%), die ja ebenfalls HLA-DR auf ihrer

Oberfläche exprimieren. Dies spricht für die Anwesenheit von weiteren HLA-DR⁺ Zellen, möglicherweise von HLA-DR⁺/CD1a⁺ Dendritischen Zellen. Ob es sich bei den CD1a⁺ Zellen der Makrophagenpopulation tatsächlich um Dendritische Zellen handelt, sollte in FACS-Experimenten nachgeprüft werden, die sich, wegen der geringen Menge an CD1a⁺ Zellen nach FDGZ und MACS, ausschliesslich mit dieser Fragestellung beschäftigen.

4.2 Funktionelle Analyse der SMZ

4.2.1 Aktivität der Schwamm-T-Lymphozyten

T-Lymphozyten haben bei der Abwehr von extrazellulären Erregern hauptsächlich helfende Funktion. Hierbei liegt die Hauptaufgabe bei den CD4⁺ T-Helferzellen, während die CD8⁺ T-Killerzellen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Das Immunsystem reagiert auf eine extrazelluläre, bakterielle Infektion mit Phagozytose durch Neutrophile Granulozyten und Makrophagen, sowie mit Antikörperbildung durch B-Lymphozyten. Die Antikörper dienen zum einen der Neutralisation von sezernierten Toxinen oder Enzymen und zum anderen der Opsonierung von Bakterien, wodurch die Phagozytose um ein vielfaches erleichtert wird (Kaufmann, 1999). Zur Aktivierung einer ausreichenden Antikörperantwort benötigt es neben den B-Lymphozyten, CD4⁺ T-Helferzellen und Antigen-präsentierende Zellen. CD4⁺ T-Helferzellen unterstützen über die Sekretion von Lymphokinen die Differenzierung von Effektor-Vorläuferzellen zu reifen Effektorzellen. Sie werden unterteilt in T-Helferzellen vom Typ 1 (TH1-Zellen) und Typ 2 (TH2-Zellen). TH1-Zellen produzieren und sezernieren hauptsächlich IFN- γ und IL-2. Sie sind für die funktionelle Reifung von zytolytischen Zellen und für die Aktivierung von Makrophagen zuständig. Ausserdem sind sie über die IFN- γ -Sekretion an der Produktion opsonierender Antikörper beteiligt. TH2-Zellen sezernieren die Interleukine 4 und 5 (IL-4, IL-5). Sie kontrollieren die Differenzierung von B-Lymphozyten in antikörperbildende Plasmazellen und die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. Zur Aktivierung der TH1-, bzw. TH2-Zellen werden Antigen-präsentierende Zellen benötigt, die den T-Lymphozyten Antigene in Zusammenhang

mit MHC-Klasse-II-Molekülen präsentieren. Ist eine T-Zell-Aktivierung erfolgt, proliferieren die nun spezifischen Zellen und wandern zum Ort der Infektion, der in dieser Arbeit der Wunde des jeweiligen Patienten entspricht (Kaufmann, 1999). Um die mögliche Beteiligung der CD4⁺ Schwamm-T-Lymphozyten an der Abwehr der Wundinfektionen zu untersuchen, wurde zunächst die Expression von Aktivierungsmarkern analysiert und mit der autologer, peripherer Blut-T-Lymphozyten verglichen. Dazu wurden die SMZ, bzw. die PBMZ sowohl mit den T-Zellmarkern CD3, CD4 und CD8, als auch mit den Aktivierungsmarkern CD45RO, HLA-DR und CD25 gefärbt und anschliessend im FACS gemessen. CD45RO ist ein klassischer Gedächtnis-/Aktivierungsmarker, HLA-DR ein MHC-Klasse-II-Molekül und CD25 die α -Kette des IL-2 Rezeptors. Sie alle sind vermehrt auf der Oberfläche von aktivierten T-Lymphozyten zu finden. Die Anwesenheit von CD45RO und HLA-DR auf vielen der CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Schwamm-T-Lymphozyten weist auf eine aktive Beteiligung dieser Zellen an der lokalen Erregerabwehr hin. Verstärkt wird dies dadurch, dass in den meisten Fällen mehr CD45RO⁺ und HLA-DR⁺ Zellen unter den Schwamm-T-Lymphozyten zu finden waren, als unter den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten der jeweiligen Patienten. Widersprüchlich ist die geringe Anzahl an CD25⁺ T-Zellen in den PVA-Schwämmen. Sie unterscheidet sich kaum von der Anzahl der CD25⁺ autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten und ist in einigen Fällen sogar noch geringer. Ob die Schwamm-T-Lymphozyten tatsächlich an der Abwehr der vorhandenen Wundinfektion teilhaben, ist in den Experimenten zur Spezifität genauer untersucht worden (siehe: 3.5.3 Funktionelle Analyse und Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten) und wird unter 4.2.3 (Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten) ausführlich diskutiert. Deutlich wurde bei der Aktivitätsanalyse mit Hilfe der Aktivierungsmarker CD45RO, HLA-DR und CD25, dass die Schwamm-T-Lymphozyten eine von den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten klar abgrenzbare, eigene Zellpopulation darstellen. Analysen über die Expression von Adhensionsmolekülen und Homing-Rezeptoren dürften hilfreich sein, um weitere phenotypische Unterschiede zu finden und um die Schwamm-T-Lymphozyten genauer zu charakterisieren (Burastero et al., 1998).

4.2.2 Funktionalität der Schwamm-T-Lymphozyten

Nach dem ersten Hinweis auf einen möglichen Einfluss der Wunderreger bezüglich der Infiltration von T-Lymphozyten in den PVA-Schwamm, erfolgte im weiteren Verlauf die Untersuchung der funktionellen Eigenschaften. Die ersten Experimente wurden am Schwamm-Zellinfiltrat nach FDGZ durchgeführt (siehe: 3.5.1 Analyse der Lebensfähigkeit der Schwamm-T-Lymphozyten nach FDGZ). Als Stimulus der Schwamm-T-Lymphozyten diente das Mitogen PHA-L, welches zusammen mit rh-IL-2 der Zellkultur zugegeben wurde. Die in Abb. 3.6 wiedergegebene durchflusszytometrische Analyse nach 14-tägiger Inkubation, zeigt den Nachweis auf funktionelle CD3⁺ T-Lymphozyten innerhalb der PVA-Schwämme. Da weniger als 50% der direkt nach FDGZ durchgeführten T-Zell-Stimulationen mit PHA-L tatsächlich zur Proliferation führten, wurden die weiteren Experimente zur Funktionalität und Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten nach der Isolierung mit FDGZ und MACS durchgeführt. Zusätzlich wurden die Schwamm-T-Lymphozyten mit den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten der jeweiligen Patienten verglichen (siehe: *Fig. 3. Proliferative responses of FMCs and autologous patient PBMCs* (8 Veröffentlichung)). Die *in vitro* Stimulation mit PHA-L und rh-IL-2 zeigte, dass die Schwamm- und autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten entweder in gleichem Ausmass (Schwamm 29.1 und Schwamm 52.2) oder aber in völlig unterschiedlicher Stärke proliferierten (Schwämme 30.1, 30.2, 51.2 und 52.1). Superantigen (SEA, SEB, TSST-1) stimulierte Schwamm-T-Lymphozyten reagierten in allen Fällen (Schwamm 29.1, 30.1 und 30.2) schwächer als die autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten. Dasselbe gilt für die Stimulation mit den Recall-Antigenen TT (ausgenommen Patient 51), PPD und AA, sowie für die Stimulation mit allogenen PBMZ zur Induktion einer GLR. Dies bestätigt, dass die Schwamm-T-Lymphozyten eine eigene, funktionelle Population darstellen, die sich, wie bereits durch die Aktivierungsexperimente festgestellt, von den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten unterscheidet. Ferner zeigen die gewonnenen Ergebnisse, dass die Funktionalität der Schwamm-T-Lymphozyten trotz der beiden Isolierungsschritte FDGZ und MACS erhalten bleibt.

4.2.3 Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten

Zur genaueren Untersuchung, ob die Schwamm-T-Lymphozyten Antigen-spezifisch, d.h. aufgrund der vorherrschenden Wundinfektion, in den PVA-Schwamm infiltrieren, wurden sie mit den hitzeinaktivierten Bakterien, aus der Wundhöhle des jeweiligen Patienten, stimuliert und mit dessen autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten verglichen. Die Antwort der Schwamm-T-Lymphozyten gegenüber den Bakterienisolaten unterschied sich in allen Fällen von der der autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten (siehe: *Fig. 3 Proliferative responses of FMCs and autologous patient PBMCs upon stimulation with various antigens* (8 Veröffentlichung)). Die Schwamm-T-Lymphozyten des Schwammes 29.1 proliferierten besonders stark nach der Stimulation mit dem autologen *S. aureus*-Isolat. Die dazugehörigen autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten reagierten hingegen nicht auf diesen Stimulus. Untersuchte man die Zellen aus dem zweiten Schwamm des Patienten 51, so zeigte sich eine schwache, aber dennoch signifikante Vermehrung der Schwamm-T-Lymphozyten, sowie eine etwas kräftigere Vermehrung der peripheren Blut-T-Lymphozyten. Ein völlig anderes Geschehen konnte in den Schwämmen 30.1 und 30.2 beobachtet werden. Hier vermehrten sich die autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten auf den bakteriellen Reiz, während die Schwamm-T-Lymphozyten nur eine äusserst schwache Reaktion zeigten. In Schwamm 52.1 konnte auf die Stimulation mit dem hitzeinaktivierten Erreger *S. epidermidis* keine Proliferation der Schwamm-T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Die autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten liessen dagegen eine schwache Zunahme ihrer Anzahl erkennen. Interessanterweise zeigte sich eine Woche später, im Schwamm 52.2, ein völlig umgekehrtes Bild: nun wiesen die Schwamm-T-Lymphozyten eine Proliferation auf, während die autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten sich nicht vermehrt hatten. Diese Unterschiede deuten darauf hin, dass die lokalen Antigene an der Rekrutierung spezifischer T-Lymphozyten in die Wunde, bzw. den PVA-Schwamm beteiligt sind. Zumindest in den Schwämmen 29.1, 51.2 und 52.2 scheint die Anwesenheit extrazellulärer, bakterieller Erreger die Rekrutierung von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten veranlasst zu haben. Warum es sowohl bei den Schwamm-T-Lymphozyten, als auch bei den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten zu solch unterschiedlichen Reaktionen kam, ist bislang unklar.

Möglicherweise hängt die Kinetik und Qualität der rekrutierten T-Lymphozyten von der Menge des in der Wunde vorhandenen Antigens ab. Sie könnte entweder zu einer Aktivierung der Schwamm-T-Lymphozyten führen, oder aber die Reaktivität hemmen, wie dies bei den Schwamm-infiltrierenden (nicht aber bei den peripheren) T-Zellen der Patienten 30 und 52 (in der ersten Woche der Schwamm-Implantation) beobachtet wurde. Allerdings könnte dieser reaktionslose Zustand auch durch die gleichzeitige Antibiotika-Therapie der Patienten entstanden sein. Trotz der unterschiedlichen Reaktionen auf die bakteriellen Stimuli, bekräftigen die Experimente zur Spezifität der Schwamm-T-Lymphozyten, die bereits bei den Untersuchungen zur Aktivität und Funktionalität gewonnene Feststellung, dass die Schwamm-T-Lymphozyten eine eigene Population darstellen, die sich von den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten unterscheidet. Desweiteren wurde deutlich, dass die Schwamm-T-Lymphozyten durch die, in der Wunde vorhandenen, extrazellulären Bakterien beeinflusst werden.

4.2.4 Differenzierung von Dendritischen Zellen

Mit der Absicht, die in die PVA-Schwämme infiltrierten Makrophagen weiter zu charakterisieren, wurde versucht aus ihnen Dendritische Zellen zu differenzieren. Für diese Experimente wurden Schwamm-Makrophagen des Zellinfiltrates nach FDGZ verwendet. Unter der Zugabe von rh-GM-CSF, rh-TNF- α und rh-IL-4 gelang es *in vitro* zweimal, in nachweisbarer Menge, Zellen zu differenzieren, die einerseits CD1a⁺ und andererseits HLA-DR⁺ waren (siehe Abb. 3.7). Ob es sich dabei tatsächlich um Dendritische Zellen handelt, lässt sich nicht eindeutig nachweisen, da die Färbungen mit den mAk einzeln erfolgten. Wie bereits unter 4.1.4 (Dendritische Zellen) erwähnt, benötigt es zum sicheren Nachweis von Dendritischen Zellen am besten Doppelfärbungen mit den entsprechenden Antikörpern. Leider konnte wegen der geringen Zellausbeute weder eine Doppelfärbung von CD1a und HLA-DR, noch eine von CD1a und den kostimulatorischen Molekülen CD80 oder CD86 durchgeführt werden. Ausserdem fehlte, ebenfalls wegen der mangelnden Zellzahl, eine Färbung mit den entsprechenden Isotyp Kontrollen der verwendeten Anti-CD1a und Anti-HLA-DR mAk. Diese wurden an Dendritischen Zellen durchgeführt, die nach dem gleichen

Protokoll, aus peripheren Blut-Monozyten differenziert worden waren (siehe: 3.5.4 Differenzierung von Dendritischen Zellen). Dennoch weisen die gewonnenen Ergebnisse deutlich darauf hin, dass sich in den PVA-Schwämmen nach VAC-Therapie infiltrierte Makrophagen befinden, aus denen sehr wahrscheinlich Dendritische Zellen differenziert werden können. Zur vollständigen Bestätigung sollten weitere Experimente durchgeführt werden, die sich aufgrund der geringen Zellzahl ausschliesslich mit dieser Fragestellung beschäftigen. Um die Konzentration an Schwamm-Makrophagen im Zellinfiltrat zu erhöhen, sollten sie nach den beiden Isolierungsschritten FDGZ und MACS verwendet werden. Ferner müsste das Differenzierungsprotokoll für Dendritische Zellen aus Monozyten an die geringe Zellzahl nach FDGZ und MACS angepasst werden. Da Dendritische Zellen die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen sind (Banchereau und Steinman, 1998), wäre ihr Einsatz in den Untersuchungen der erregerspezifischen Schwamm-T-Lymphozyten von grosser Hilfe. Möglicherweise würde dies zu einer stärkeren Aktivierung der Schwamm-T-Lymphozyten und damit zu einer gesteigerten Antwort auf das autologe Bakterienisolat führen.

4.3 Verbesserungs- und Einsatzmöglichkeiten der VAC-Therapie

Wie bereits in der Einleitung unter 1.3 (Vacuum-Assisted Closure Therapie) beschrieben, stellt die VAC-Therapie, bis auf seltene Ausnahmen, ein sehr effektives Verfahren zur Behandlung von akuten und chronischen Wunden dar. Ihre wichtigsten Vorzüge sind die gesteigerte Durchblutung der Wundumgebung und die dadurch verbesserte Versorgung der Wunde mit Sauerstoff, die zügigere Bildung des Granulationsgewebes und die beschleunigte Reduktion der infizierenden Bakterien (Morykwas et al., 1997). Die VAC-Therapie bietet durch den luftdichten Verschluss der Wunde einen guten Infektionsschutz. Sie ist einfach anzuwenden, preiswert und sie fördert die frühe Mobilisation des Patienten (Bauer et al., 1998). Ausserdem führt sie bei diabetischen Patienten mit postoperativen Fusswunden, im Vergleich zur Wundversorgung mit feuchten Kompressen, zu einer schnelleren Verkleinerung der Wundoberfläche und zu einem wesentlich früheren Verschluss der Wunde (McCallon et

al., 2000). Neben der Behandlung von stationären Patienten mit akuten oder chronischen Wunden, wird die VAC-Therapie inzwischen auch erfolgreich in der ambulanten Betreuung von Patienten mit chronischen Wunden eingesetzt. Dies ist im Vergleich zum stationären Aufenthalt um ein vielfaches kostengünstiger, die Patienten können ihrem normalen Leben so gut wie möglich nachgehen und erfahren dadurch lange nicht dieselbe Einschränkung Ihrer Lebensqualität, wie bei einem stationären Aufenthalt (Ziegler et al., 2000), (Sposato et al., 2001).

Dennoch beinhaltet die VAC-Therapie viele Möglichkeiten, die die Heilung der jeweiligen Wunde weiter verbessern und beschleunigen könnten. Hierbei ist vor allem an den PVA-Schwamm zu denken, der aufgrund seines direkten Kontaktes mit den Wundrändern dem Ort der Wundheilung am nächsten steht. Eine Wundinfektion erfordert, neben der sorgfältigen Wundversorgung z. B. mit der VAC-Therapie, immer auch eine effektive Antibiose, die bislang fast ausschliesslich über intravenöse (i.v.) Applikation erfolgt. Interessant wäre es, die zusätzliche Wirkung eines Antibiotika-haltigen Schwammes oder der regelmässigen Zugabe von Antibiotika über den Redon-Schlauch zu untersuchen. In einer klinischen Studie an 73 Patienten mit abdominellen Wunden, die durch eine Operation des Gastrointestinaltraktes verunreinigt worden waren, wurde der Effekt eines Kollagen-Gentamicin-Schwammes auf die Wundheilung untersucht. Dazu wurde der Hälfte der Patienten ein Kollagen-Gentamicin-Schwamm (ohne Drainage-System) in die Wunde eingebracht und diese primär verschlossen. Die Wunden der Kontrollgruppe wurden unter regelmässiger lokaler Reinigung offen versorgt. Zusätzlich erhielten alle Patienten eine i.v. Antibiose gleicher Dosierung (Metronidazol, 20-40 mg/kg/Tag). Es zeigte sich, dass die chirurgisch induzierten Wundinfektionen durch die Kollagen-Gentamicin-Schwamm-Behandlung signifikant reduziert werden konnten. Ausserdem ergab sich, gegenüber der offenen Wundbehandlung, eine verkürzte Heilungszeit (Guzman et al., 1999). In einer anderen Studie wurde die übliche VAC-Therapie mehrmals täglich unterbrochen und die Wunden für 30 min. über den Redon-Schlauch mit Antibiotika versehen. Obwohl die Studie gute Heilungsergebnisse zeigt, lässt sich leider nicht feststellen ob sie im Vergleich zur „konventionellen“ VAC-Therapie von Vorteil ist, da keine Kontrollgruppen miteinbezogen wurden (Fleischmann et al., 1998).

Ein anderer Ansatz zur Verbesserung der VAC-Therapie liegt in der Rekrutierung und Aktivierung der in den Schwamm infiltrierenden Zellen. Die wichtigsten Zellen in der Entzündungsphase der Wundheilung und auch im Falle einer Wundinfektion mit extrazellulären Bakterien, sind die Neutrophilen Granulozyten, gefolgt von den Makrophagen und den T-Lymphozyten. Vor allem die Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sorgen zunächst dafür, dass die Wunde von Zelltrümmern und unwillkommenen Erregern oder fremden Partikeln (Staub, Schmutz) befreit wird. Desweiteren obliegt den Makrophagen die Aufgabe, Wachstumsfaktoren (z.B.: $\text{TNF-}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$) zur Aktivierung und Rekrutierung von T-Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen zu sezernieren (Rappolee et al., 1988), (Witte und Barbul, 1997), (Cooper, 1999). Makrophagen sind ausserdem zuständig für die Präsentation von Erregerantigenen (Bellingan et al., 1996). Die Rolle der T-Lymphozyten in der nicht infizierten Wunde ist wenig untersucht und weitgehend ungeklärt (siehe: 1.1 Physiologie der Wundheilung). Im Falle der infizierten Wunde konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Schwamm-T-Lymphozyten sich in ihrer Aktivität, Funktionalität und ihrer Spezifität von den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten unterscheiden. Ferner stehen sie unter dem Einfluss der Bakterien, die die vorherrschende Wundinfektion verursachen. Für eine Verbesserung der VAC-Therapie infizierter Wunden wäre es sicherlich hilfreich, Neutrophile Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten verstärkt in die Wunde und damit den PVA-Schwamm zu rekrutieren und sie dort vermehrt zu aktivieren. Über eine grössere Anzahl von zusätzlich aktivierten Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten könnte eine gesteigerte Phagozytose und damit eine verstärkte Erregerelimination herbeigeführt werden. Zudem wären durch eine gesteigerte Infiltration von Makrophagen mehr Antigen-präsentierende Zellen in der infizierten Wunde vorhanden. Um eine verstärkte Rekrutierung und Aktivierung zu erreichen, könnten dem Schwamm entweder durch Injektion oder über den Redon-Schlauch chemotaktisch wirksame Zytokine und Wachstumsfaktoren hinzugegeben werden. Die physiologischerweise direkt nach einer akuten Verletzung von Thrombozyten sezernierten Wachstumsfaktoren Epidermal growth factor (EGF), Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), Platelet-derived growth factor (PDGF) und $\text{TGF-}\beta$ wären zum Beispiel gut zur Injektion geeignet, da sie sowohl auf Neutrophile Granulozyten,

Makrophagen, T-Lymphozyten, als auch auf Fibroblasten und Endothelzellen eine chemotaktische Wirkung ausüben (Schäffer und Becker, 1999). Desweiteren kämen für Neutrophile Granulozyten die Zytokine TNF- α , Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) in Frage, die vor allem in chronischen Wunden von Neutrophilen Granulozyten selbst, von Makrophagen und von Lymphozyten gebildet werden (Nwomeh et al., 1998), (Kaufmann, 1998). Eine andere Möglichkeit wäre die Zugabe der Granulozyten-stimulierenden Faktoren Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) und Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF). *In vitro* Versuche zeigten die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten nach Zugabe von rekombinantem G-CSF und/oder rekombinantem GM-CSF zu humanen Vollblutproben. *In vivo* führte die Behandlung von infizierten Hautwunden an Mäusen mit rekombinanten G-CSF-haltigen Verbänden zu einer beschleunigten Bakterienreduktion (Grzybowski et al., 1999). Makrophagen könnten durch die Chemokine Macrophage inflammatory protein-1 und -2 (MIP-1, MIP-2), Makrophage chemoattractant and activating factor (MCAF) und durch die Zytokine IL-8 und IFN- γ rekrutiert und aktiviert werden. Dies würde wiederum zu einer gesteigerten Produktion von Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-8, Interleukin-10 (IL-10), TNF- α) und Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF) durch die Makrophagen führen, wodurch sich die Rekrutierung und Aktivierung der anderen Zellen quasi verselbständigt. T-Lymphozyten könnten vermehrt durch die Zugabe von IL-1, IL-6, TNF- α und IFN- γ in die Wunde gelockt werden. Diese Zytokine führen zu einer verstärkten Expression des Integrins LFA-1 auf der T-Zelloberfläche und der dazugehörigen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und ICAM-2 auf der Endothelzelloberfläche. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Interaktion dieser Moleküle bzw. Zellen und folglich zu einer verstärkten Infiltration zum Infektionsort (Schäffer und Becker, 1999). Nachgewiesen wurde dies bereits in einem Versuchsmodell an Schweinen, denen subcutan Polyether-Schwämme implantiert worden waren, um nach Zugabe von chemotaktisch wirksamen Substanzen am Tag zwölf die Infiltration radioaktiv markierter Lymphozyten zu messen: die Injektion des polyklonalen T-Zell-Stimulus PHA, sowie der Zytokine TNF- α oder Interleukin-1 α (IL-1 α) zeigte, im Vergleich zur alleinigen Injektion von Medium, einen deutlichen Anstieg der Lymphozyteninfiltration in den Polyether-Schwamm (Woolley et al., 1995).

Zur Abwehr eines neu eingedrungenen Erregers, werden neben den Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten immer auch Dendritische Zellen benötigt. Dendritische Zellen sind unter den Antigen-präsentierenden Zellen einzigartig. Sie sind die einzigsten, die die Fähigkeit besitzen, eine primäre Immunantwort auszulösen, wodurch die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses erst ermöglicht wird. Dendritische Vorläuferzellen ($CD14^+CD11^+CD1^-$, bzw. $CD14^-CD11c^+CD1^+$, bzw. $CD14^-CD11c^-IL3R\alpha^+$) zirkulieren, nachdem sie das Knochenmark verlassen haben, innerhalb der Blut- und Lymphbahnen. Ein Teil von ihnen wandert ins umliegende Gewebe und verharrt dort im unreifen Zustand. Typische Beispiele für unreife Dendritische Zellen im Gewebe sind die in der Epidermis auffindbaren Langerhans Zellen und die in der Dermis gelegenen interstitiellen Dendritischen Zellen. Unreife Dendritischen Zellen besitzen eine enorme endozytotische und phagozytotische Kapazität. Kommt es zu einer Infektion oder einer Gewebsschädigung, so werden sowohl die Vorläuferzellen aus dem Blut, als auch die unreifen, im Gewebe residierenden Dendritischen Zellen zum Ort der Erregerinvasion rekrutiert (Banchereau et al., 2000). Ein starker Anreiz für die Rekrutierung Dendritischer Zellen sind die von Endothelzellen und Makrophagen sezernierten Chemokine Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), -3 α (MIP-3 α) und RANTES. MIP-3 α bindet an den Chemokinrezeptor CCR6, welcher besonders stark auf der Plasmamembran unreifer Dendritischen Zellen exprimiert ist (Dieu et al., 1998). Am Infektionsort führen sowohl die Phagozytose von Erregerantigenen, als auch verschiedene Mediatoren im Wundmilieu (bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), TNF, IL-1, IL-6, IL-10, TGF- β , Prostaglandine) zum Übergang in die reife, Antigen-präsentierende Dendritische Zelle. Charakteristisch für diese Zellart ist zum einen der Verlust von endozytotischen und phagozytotischen Rezeptoren, sowie des MIP-3 α bindenden Rezeptors CCR6 und zum anderen die verstärkte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen, kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) und des Chemokinrezeptors CCR7 an der Zelloberfläche. CCR7 bindet die Chemokine 6Ckine und MIP-3 β . 6Ckine wird von den Endothelzellen lymphatischer Gefäße, von Zellen der T-Zell reichen Zone im Lymphknoten und von reifen Dendritischen Zellen selbst gebildet. MIP-3 β wird in der T-Zell reichen Zone der Lymphknoten und von Antigen-präsentierenden Zellen sezerniert. 6Ckine und MIP-3 β dirigieren damit die Antigen-präsentierende Dendritische Zelle durch die lymphatischen

Gefäße in die T-Zell reiche Zone des nächstgelegenen Lymphknoten. Hier werden sie zu den interdigitierenden Dendritischen Zellen, die zur Aufrechterhaltung der angelaufenen Immunreaktion und zur weiteren Rekrutierung ebenfalls 6Ckine und MIP-3 β in die Umgebung abgeben. 6Ckine und MIP-3 β wirken ausser auf reife Dendritischen Zellen auch auf naive T-Lymphozyten chemotaktisch (Pulendran, 2001), (Banchereau et al., 2000), (Dieu et al., 1998). Hiermit sorgen diese Chemokine dafür, dass reife Dendritische Zellen mit vielen naiven T-Lymphozyten in Kontakt kommen, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, möglichst bald auf eine Antigen-spezifische T-Zelle zu treffen. In der Regel erfolgt der erste Kontakt einer naiven T-Zelle mit einer reifen Dendritischen Zelle in der T-Zell reichen Zone des drainierenden Lymphknotens. Er kann aber ebenfalls am Ort der Gewebsverletzung stattfinden und ist die Voraussetzung zur Aktivierung einer adaptiven, T- bzw. B-Zell vermittelten Immunantwort (Banchereau et al., 2000).

Für die VAC-Therapie von Wundinfektionen wäre die Anwesenheit von Dendritischen Zellen in der Wunde und damit im PVA-Schwamm sicherlich sehr hilfreich. Da in dieser Studie immer Makrophagen in den PVA-Schwämmen nachgewiesen werden konnten (siehe: 3.4.2 Makrophagenpopulation und Dendritische Zellen, Tab. 3.2), wäre der nahegelegenste Ansatzpunkt, aus diesen durch die lokale Zugabe von GM-CSF, IL-4 und TNF- α Dendritische Zellen zu generieren. Die Ergebnisse der *in vitro* Differenzierung von Dendritischen Zellen aus Schwamm-Makrophagen (siehe: 3.5.4 Differenzierung von Dendritischen Zellen) weisen auf diese Möglichkeit hin. Ein anderer Ansatzpunkt Dendritische Zellen in den Schwamm zu locken, bzw. ihre Anzahl im PVA-Schwamm zu erhöhen, liegt in der Zugabe der Chemokine MIP-1 α , MIP-3 α und RANTES. Dadurch würden vor allem die Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut und die unreifen Dendritischen Zellen aus dem Gewebe über die Wundränder in den PVA-Schwamm gelockt werden. Hier könnten sie dann ihre Hauptaufgabe, die Phagozytose, aufnehmen, zu reifen Dendritischen Zellen differenzieren und zum nächstgelegenen Lymphknoten wandern. Von besonderem Interesse ist die Zugabe von MIP-1 α , MIP-3 α und RANTES zur Rekrutierung der unreifen Dendritischen Zellen, zusammen mit der Zugabe von 6Ckine und MIP-3 β zur Reifung der Dendritischen Zellen und zur Rekrutierung naiver T-Lymphozyten. Möglicherweise ließe sich damit das „Primen“ der naiven T-Zelle von der T-Zell

reichen Zone des drainierenden Lymphknotens in den PVA-Schwamm nahe der Wundinfektion verlagern. Dazu sollte unter anderem untersucht werden ob die Chemokine zeitgleich oder zeitversetzt (erst MIP-1 α , MIP-3 α und RANTES und später 6Ckine und MIP-3 β) gegeben werden müssten. Eine Verlagerung der Aktivierung naiver, Antigen-spezifischer T-Lymphozyten in den PVA-Schwamm würde der VAC-Therapie neben ihrem Einsatz innerhalb der Heilung akuter, chronischer und infizierter Wunden möglicherweise auch die Anwendung innerhalb der Immuntherapie von Tumoren eröffnen. Hier könnte der PVA-Schwamm nun im Sinne eines „künstlichen Lymphknotens“ unter Zugabe der entsprechenden Chemokine, bzw. Zytokine flexibel in direkter Nähe des Tumors eingesetzt werden, wo er dann die Rolle des nächstgelegenen Lymphknotens übernehmen könnte (Abb. 4.1).

PVA-Schwamm als künstlicher Lymphknoten?

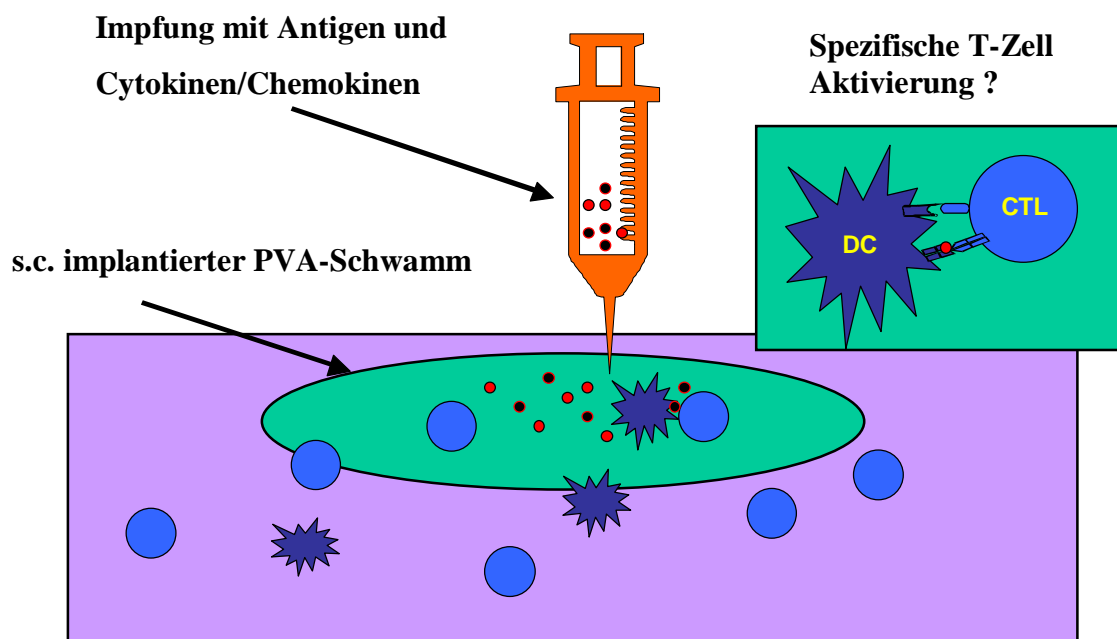


Abb. 4.1 PVA-Schwamm als künstlicher Lymphknoten.

Ausserdem würde der PVA-Schwamm mit seiner nahen Lokalisation am Tumor einen bevorzugten Ort zur Durchführung von Tumorimmunisierungen darstellen.

Chirurgisch betrachtet stellt die Implantation des PVA-Schwammes einen kleinen, relativ ungefährlichen Eingriff dar. Angesichts der vielen verschiedenen Mediatoren, die für die jeweiligen Zellarten bekannt sind, wird deutlich, dass für eine verstärkte Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und Dendritischen Zellen ein ganzer „Cocktail“ aus Chemokinen und Zytokinen zum Schwamm hinzugegeben werden müsste. Dies würde zunächst mehrere Studien am Tiermodell erfordern, die sich mit der Auswirkung einzelner, dem PVA-Schwamm zugegebener, Chemokine oder Zytokine auf die Zellinfiltration und Wundheilung während der VAC-Therapie beschäftigen. Aus diesen Ergebnissen heraus könnte dann die gleichzeitige Anwendung zweier oder mehrerer Chemokine/Zytokine untersucht werden, um schliesslich die am besten geeignete Mischung herauszuarbeiten. Ziel solcher Studien wäre eine adäquate Stärkung des Immunsystems zur Abwehr von Wundinfektionen im Laufe der VAC-Therapie und damit im weiteren Sinne die zügige Mobilisierung und Verbesserung der Lebensqualität des Patienten. Eine zusätzliche Motivation liegt in der bereits erwähnten möglichen Anwendung des PVA-Schwammes im Zusammenhang mit der Immuntherapie von Tumoren.

5 Zusammenfassung

Postoperative Wundinfektionen sind häufig die Ursache chronischer Wunden. Eine effektive Behandlungsmöglichkeit bietet die VAC-Therapie. Sie stellt eine erweiterte Form der Drainage dar, bei der dem Redonschlauch ein poröser PVA-Schwamm aufgesetzt und beides zusammen in die Wunde eingebracht wird. Der Vorteil gegenüber der üblichen Redondrainage ist, dass der PVA-Schwamm der Wundgrösse entsprechend angepasst werden kann. Dies wiederum ermöglicht die Drainage der Wundflüssigkeit aus der gesamten Wunde (siehe: 1.3 Vacuum-Assisted Closure Therapie). Ziel der VAC-Therapie ist der möglichst schnelle Wundverschluss (Fleischmann et al., 1993). Klinische Studien über die VAC-Therapie ergaben fast ausschliesslich positive Ergebnisse (Mullner et al., 1997), (Argenta und Morykwas, 1997), (Zöch, 1998). Dennoch gibt es kaum Daten über die Ursachen der vorteilhaften Wirkung der VAC-Therapie auf die Wundheilung. Ein Teil der Daten stammt von Untersuchungen am Tiermodell die zeigten, dass durch die VAC-Therapie die Durchblutung der Wundumgebung, die Bildung von Granulationsgewebe, sowie die Reduktion der infizierenden Bakterien gefördert wird (Morykwas et al., 1997). Völlige Unklarheit herrschte bislang über die Anwesenheit und Funktion inflammatorischer Zellen (Neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Dendritische Zellen) innerhalb der Wunde bzw. des PVA-Schwammes während der VAC-Therapie. In dieser Arbeit wurden deshalb die in den PVA-Schwamm infiltrierenden Zellen mit Hilfe der Immunhistochemie und der Durchflusszytometrie charakterisiert, sowie im weiteren Verlauf in Bezug auf ihre Aktivität, Funktionalität und Spezifität analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass in den PVA-Schwämmen neben einer grossen Anzahl von Neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten immer, wenn auch in geringer Menge, T-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen und höchstwahrscheinlich auch Dendritische Zellen zu finden sind. Dies entspricht sowohl den Zellen, die in der Entzündungsphase in die frische Wunde infiltrieren (siehe: 1.1: Physiologie der Wundheilung) als auch den Zellen, die für die Abwehr einer Infektion mit extrazellulären Bakterien verantwortlich sind (Kaufmann, 1999). In den durchflusszytometrischen Untersuchungen über die Expression des Aktivierungsmarkers HLA-DR, des Gedächtnis-/Aktivierungsmarkers

CD45RO und der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) zeigte sich, dass die Schwamm-T-Lymphozyten im Vergleich zu den autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten eine eigene Population darstellen. Dies konnte im Zellproliferations-ELISA durch Stimulation mit Mitogen, Superantigenen, Recall-Antigenen und hitzeinaktivierten Wunderregern weiter bestätigt werden, denn die Antwort der Schwamm-T-Lymphozyten unterschied sich immer von der der autologen, peripheren Blut-T-Lymphozyten. Die Stimulation der Schwamm-T-Lymphozyten mit den hitzeinaktivierten Wunderregern weisen ausserdem darauf hin, dass zumindest die CD4⁺ T-Lymphozyten Erreger-spezifisch in den PVA-Schwamm rekrutiert werden. Die *in vitro* Versuche zur Differenzierung Dendritischer Zellen aus Schwamm-Makrophagen durch Inkubation mit GM-CSF, IL-4 und TNF- α ergaben in zwei Fällen CD1a⁺ und HLA-DR⁺ Zellen. Ob es sich dabei tatsächlich um Dendritische Zellen handelt, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Aufschluss über die Infiltration, Zusammensetzung und Funktion der verschiedenen, zur Wundheilung und Infektionsabwehr benötigten Zelltypen innerhalb der menschlichen Wunde bzw. des Schwammes. Aus diesen Erkenntnissen ergeben sich neue Ideen zur Verbesserung des PVA-Schwammes in der VAC-Therapie und möglicherweise auch dessen Anwendung innerhalb der Tumorthherapie.

6 Abkürzungen

AA	Aspergillus Antigen
BrdU	5-bromo-2'deoxyuridine
DTH	Delayed-type hypersensitivity
EGF	Epidermal growth factor
FAF	Fibroblast activating factor
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calve serum
FDGZ	Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation
FITC	Fluorescence isothiocanate
FSC	Forward scatter
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GLR	Gemischte Lymphozyten Reaktion
GM-CSF	Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor
IFN- γ	Interferron- γ
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-1	Interleukin-1
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
i.v.	intravenös
LPS	Lipopolysaccharid
M. tbc.	Mykobakterium tuberculosis
MACS	Magnetic cell sorting
mAk	monoklonaler Antikörper

MCAF	Makrophage chemoattractant and activating factor
MIP-1	Macrophage inflammatory protein-1
MIP-2	Macrophage inflammatory protein-2
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein-1 α
MIP-3 α	Macrophage inflammatory protein-3 α
MIP-3 β	Macrophage inflammatory protein-3 β
MLR	Mixed lymphocyte reaction
MW	Mittelwert
NB	nicht bestimmt
NK	Negativ Kontrolle
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P. aeruginosa)
PBMZ	Periphere Blut mononukleäre Zellen
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PHA-L	Phytohämagglutinin-L
POD	Peroxidase
PPD	Purified protein derivative
PVA	Polyvinylalkohol
SA	<i>Staphylokokkus aureus</i> (S. aureus)
s.c.	subcutan
SE	<i>Staphylokokkus epidermidis</i> (S. epidermidis)
SEA	Staphylokokken Enterotoxin A
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SMZ	Schwamm mononukleäre Zellen
SSC	sideward scatter
ST	Mischung der Staphylokokken Toxine SEA, SEB, TSST-1
TGF- β	Transforming growth factor
TH1-Zellen	T-Helferzellen vom Typ 1
TH2-Zellen	T-Helferzellen vom Typ 2
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor necrosis factor- α

TSST-1	Toxisches Schocksyndrom-Toxin-1
TT	Tetanus Toxoid
VAC	Vacuum-Assisted Closure

7 Literaturverzeichnis

Akporiaye,E.T., Stewart,S.J., Stevenson,A.P., and Stewart,C.C. (1985). A gelatin sponge model for studying tumor growth: flow cytometric analysis and quantitation of leukocytes and tumor cells in the EMT6 mouse tumor. *Cancer Res* 45, 6457-6462.

Argenta,L.C. and Morykwas,M.J. (1997). Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience. *Ann Plast Surg* 38, 563-576.

Banchereau,J., Briere,F., Caux,C., Davoust,J., Lebecque,S., Liu,Y.J., Pulendran,B., and Palucka,K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.

Banchereau,J. and Steinman,R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Barbul,A., Breslin,R.J., Woodyard,J.P., Wasserkrug,H.L., and Efron,G. (1989). The effect of in vivo T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing. *Ann Surg* 209, 479-483.

Bauer,P., Schmidt,G., and Partecke,B.D. (1998). [Possibilities of preliminary treatment of infected soft tissue defects by vacuum sealing and PVA foam]. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 30, 20-23.

Bellingan,G.J., Caldwell,H., Howie,S.E., Dransfield,I., and Haslett,C. (1996). In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. *J Immunol* 157, 2577-2585.

Broll,R. (1994). Chirurgische Infektionen, 185-204. in: Berchtold, R., Hamelmann, H., Peiper, H.-J., Trentz, O.: *Chirurgie*; 3. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.

Burastero,S.E., Rossi,G.A., and Crimi,E. (1998). Selective differences in the expression of the homing receptors of helper lymphocyte subsets. *Clin Immunol Immunopathol* 89, 110-116.

Collins,H.L. and Kaufmann,S.H. (2001). The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology* 103, 1-9.

Cooper,D.M. (1999). Wound healing: new understandings. *Nurse Pract Forum* 10, 74-86.

Dieu,M.-C., Vanbervliet,B., Vicari,A., Bridon,J.-M., Oldham,E., Ait-Yahia,S., Brière,F., Zlotnik,A., Lebecque,S. (1998). Selective Recruitment of Immature and Mature Dendritic Cells by Distinct Chemokines Expressed in Different Anatomic Sites. *J Exp Med* 188, 373-386.

Efron,J.E., Frankel,H.L., Lazarou,S.A., Wasserkrug,H.L., and Barbul,A. (1990). Wound healing and T-lymphocytes. *J Surg Res* 48, 460-463.

Engelmann,E. (1999). Fadenpilze: Schimmelpilze, 711-718. In: Hahn,H., Falke,D., Kaufmann,S.H.E., Ullmann,U.: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*; 3. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Fishel,R.S., Barbul,A., Beschorner,W.E., Wasserkrug,H.L., and Efron,G. (1987). Lymphocyte participation in wound healing. Morphologic assessment using monoclonal antibodies. *Ann Surg* 206, 25-29.

Fleischmann,W., Lang,E., and Russ,M. (1997). [Treatment of infection by vacuum sealing]. *Unfallchirurg* 100, 301-304.

Fleischmann,W., Russ,M.K., and Moch,D. (1998). [Surgical wound treatment]. *Chirurg* 69, W222-W232.

Fleischmann,W., Strecker,W., Bombelli,M., and Kinzl,L. (1993). [Vacuum sealing as treatment of soft tissue damage in open fractures]. *Unfallchirurg* 96, 488-492.

- Ford,H.R., Hoffman,R.A., Twardy,D.J., Kispert,P., Wang,S., and Simmons,R.L. (1991). Evidence that production of interleukin 6 within the rejecting allograft coincides with cytotoxic T lymphocyte development. *Transplantation* 51, 656-661.
- Fry,D.E., Marek,J.M., and Langsfeld,M. (1998). Infection in the ischemic lower extremity. *Surg Clin North Am* 78, 465-479.
- Gouttefangeas,C., Eberle,M., Ruck,P., Stark,M., Muller,J.E., Becker,H.D., Rammensee,H.G., and Pinocy,J. (2001). Functional T lymphocytes infiltrate implanted polyvinyl alcohol foams during surgical wound closure therapy. *Clin Exp Immunol* 124, 398-405.
- Grzybowski,J., Janiak,M.K., Oldak,E., Lasocki,K., Wrembel-Wargocka,J., Cheda,A., Antos-Bielska,M., and Pojda,Z. (1999). New cytokine dressings. II. Stimulation of oxidative burst in leucocytes in vitro and reduction of viable bacteria within an infected wound. *Int J Pharm* 184, 179-187.
- Guzman,V.G., Guerrero,T.S., Lluck,M.C., and Delgado,F.J. (1999). Effectiveness of collagen-gentamicin implant for treatment of "dirty" abdominal wounds. *World J Surg* 23, 123-126.
- Hahn,H. (1983). Antibacterial defence mechanisms. *Infection* 11 Suppl 2, S112-S118.
- Hahn,H., Kaufmann,S.H.E., Rodloff,A.C. (1999). Mykobakterien, 377-387. In: Hahn,H., Falke,D., Kaufmann,S.H.E., Ullmann,U.: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*; 3. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hopt,U.T., Sullivan,W., Hoffman,R., and Simmons,R.L. (1980). Migration and cell recruiting activity of specifically sensitized lymphocytes in sponge matrix allografts. *Transplantation* 30, 411-416.
- Ilizarov,G.A. (1989). The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop* 263-285.

Janeway,C.A., Travers,P. (1997). Immunogenetics: the major histocompatibility complex, 2:35-2:41. In: Janeway,C.A., Travers,P.: Immunobiology: The Immune System in Health and Disease; Third Edition, Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc.

Janeway,C.A., Travers,P. (1997). The major histocompatibility complex of genes: organization and polymorphism, 4:20-4:32. In: Janeway,C.A., Travers,P.: Immunobiology: The Immune System in Health and Disease; Third Edition, Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc.

Kaufmann,S.H.E. (1999). Infektabwehr, 136-148. In: Hahn,H., Falke,D., Kaufmann,S.H.E., Ullmann,U.: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie; 3. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Kaufmann,S.H.E. (1999). T-Zellen, 97-113. In: Hahn,H., Falke,D., Kaufmann,S.H.E., Ullmann,U.: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie; 3. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Leibovich,S.J. and Ross,R. (1975). The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 78, 71-100.

Leibovich,S.J. and Ross,R. (1976). A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro. *Am J Pathol* 84, 501-514.

Marrack,P. and Kappler,J. (1990). The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248, 705-711.

Martin,C.W. and Muir,I.F. (1990). The role of lymphocytes in wound healing. *Br J Plast Surg* 43, 655-662.

McCallon,S.K., Knight,C.A., Valiulus,J.P., Cunningham,M.W., McCulloch,J.M., and Farinas,L.P. (2000). Vacuum-assisted closure versus saline-moistened gauze in the healing of postoperative diabetic foot wounds. *Ostomy Wound Manage* 46, 28-32, 34.

McCourt,M., Wang,J.H., Sookhai,S., and Redmond,H.P. (1999). Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch Surg* 134, 1325-1331.

Morse,M.A., Zhou,L.J., Tedder,T.F., Lyster,H.K., and Smith,C. (1997). Generation of dendritic cells in vitro from peripheral blood mononuclear cells with granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor, interleukin-4, and tumor necrosis factor-alpha for use in cancer immunotherapy [see comments]. *Ann Surg* 226, 6-16.

Morykwas,M.J., Argenta,L.C., Shelton-Brown,E.I., and McGuirt,W. (1997). Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: animal studies and basic foundation. *Ann Plast Surg* 38, 553-562.

Mullner,T., Mrkonjic,L., Kwasny,O., and Vecsei,V. (1997). The use of negative pressure to promote the healing of tissue defects: a clinical trial using the vacuum sealing technique [see comments]. *Br J Plast Surg* 50, 194-199.

Nunez,R., Sanchez,M., Wild,P., Filgueira,L., and Nunez,C. (1998). Characterisation of two human dendritic cell-lines that express CD1a, take-up, process and present soluble antigens and induce MLR. *Immunol Lett* 61, 33-43.

Nwomeh,B.C., Yager,D.R., and Cohen,I.K. (1998). Physiology of the chronic wound. *Clin Plast Surg* 25, 341-356.

Oehler,L., Majdic,O., Pickl,W.F., Stockl,J., Riedl,E., Drach,J., Rappersberger,K., Geissler,K., and Knapp,W. (1998). Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. *J Exp Med* 187, 1019-1028.

Peterson,J.M., Barbul,A., Breslin,R.J., Wasserkrug,H.L., and Efron,G. (1987). Significance of T-lymphocytes in wound healing. *Surgery* 102, 300-305.

Rappolee,D.A., Mark,D., Banda,M.J., and Werb,Z. (1988). Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 241, 708-712.

Roberts,P.J. and Hayry,P. (1976). Sponge matrix allografts. A model for analysis of killer cells infiltrating mouse allografts. *Transplantation* 21, 437-445.

Ross,R., Benditt,E.P. (1962). Wound healing and collagen formation II. Fine structure and experimental scurvy. *J Cell Biol* 12, 533-51.

- Sallusto,F. and Lanzavecchia,A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.
- Schaffer,M. and Barbul,A. (1998). Lymphocyte function in wound healing and following injury. *Br J Surg* 85, 444-460.
- Schäffer,M., Becker,H.-D. (1999). Immunregulation der Wundheilung. *Chirurg* 70, 897-908.
- Simpson,D.M. and Ross,R. (1972). The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. *J Clin Invest* 51, 2009-2023.
- Singer,A.J. and Clark,R.A. (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341, 738-746.
- Sposato,G., Molea,G., Di Caprio,G., Scioli,M., La,R., I, and Ziccardi,P. (2001). Ambulant vacuum-assisted closure of skin-graft dressing in the lower limbs using a portable mini-VAC device. *Br J Plast Surg* 54, 235-237.
- Stadelmann,W.K., Digenis,A.G., and Tobin,G.R. (1998). Impediments to wound healing. *Am J Surg* 176, 39S-47S.
- Thiede,A., Eckert,P. (1994). Wunden, Wundheilung und Wundbehandlung, 217-226. In: Berchtold,R., Hamelmann,H., Peiper,H.-J., Trentz,O.: *Chirurgie*; 3. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.
- Trautmann,M. (1999). Sepsis, 915-20. In: Hahn,H., Falke,D., Kaufmann,S.H.E., Ullmann,U.: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*; 3. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Witte,M.B. and Barbul,A. (1997). General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 77, 509-528.

Woolley,S.T., Whyte,A., Licence,S.T., Haskard,D.O., Wooding,F.B., and Binns,R.M. (1995). Differences in E-selectin expression and leucocyte infiltration induced by inflammatory agents in a novel subcutaneous sponge matrix model. *Immunology* 84, 55-63.

Zabel,L.T., Schwab,E. (1999). Erreger- und Resistenzstatistik einer Unfallchirurgischen Klinik für die Jahre 1995 bis 1997. *Akt. Traumatol* 29, 98-103.

Zangemeister,U., Thiede,K., and Schirmacher,V. (1989). Recruitment and activation of tumor-specific immune T cells in situ: functional studies using a sponge matrix model. *Int J Cancer* 43, 310-316.

Ziegler,U.E., Schmidt,K., Breithaupt,B., Menig,R., Debus,E.S., and Thiede,A. (2000). [Ambulant treatment of wounds by vacuum sealing]. *Zentralbl Chir* 125 *Suppl* 1, 87-89.

Zöch,G. (1998). „Vacuum-Assisted Closure“ V.A.C. TM-Anwendertreffen. *Acta Chir. Austriaca Supplement* 150:1-28.

8 Veröffentlichung

Functional T lymphocytes infiltrate implanted polyvinyl alcohol foams during surgical wound closure therapy

Short title: T cells in implanted polyvinyl alcohol foams

M. Eberle*, C. Gouttefangeas*, P. Ruck[†], M. Stark[‡], J.E. Müller[§], H-D. Becker[¶], H-G. Rammensee* and J. Pinocy[¶]

*Department of Immunology, Institute for Cell Biology, University of Tübingen,
D-72076 Tübingen, Germany

[†]Department of Histo- and Cytopathology, Institute for Pathology, University of
Tübingen

[‡]Department of Medical Microbiology, Institute for Hygiene, University of Tübingen

[§]Trauma Center and Department of Traumatology, Berufsgenossenschaftliche
Unfallklinik, D-72076 Tübingen

[¶]Department of Surgery, University of Tübingen

M. E. and C. G. contributed equally to this work

Corresponding author: Hans-Georg Rammensee, Department of Immunology, Institute
for Cell Biology, Auf der Morgenstelle 15, D-72076 Tübingen, Germany.

Tel: (49) 7071 2980991. Fax: (49) 7071 295653

Email: rammensee@uni-tuebingen.de

Keywords: wound healing - vaccum-assisted closure - leukocyte - bacteria

Abstract

Vacuum-assisted closure involving the implantation of polyvinyl alcohol foam is a technique developed recently for the treatment of patients suffering from wound infection or chronic wound. This method has been shown to improve and accelerate wound healing. However, little is known about the cell populations that may infiltrate the foam, and their potential role in resolving the infection and promoting granulation tissue formation. Our study demonstrates that wound implanted foams are mainly infiltrated with granulocytes, but that mononuclear cells, including macrophages and minor populations of T, B, and natural killer lymphocytes, are also present. We show that foam-infiltrating T cells, especially CD4⁺ T cells, constitute a phenotypically and functionally heterogeneous population influenced by wound-infecting bacteria. Thus, T lymphocytes could play a role in wound cleansing. In addition, our data indicate that implanted polyvinyl alcohol foams might be suitable microenvironments for manipulating T-cell mediated immune responses in patients.

Introduction

Wound infections affecting soft tissues and bones are a serious complication after injuries, and endanger the reconstructive process in particular if alloplastic material has been implanted within the wound. The treatment of wound infection generally consists of wound revision, removal of alloplastic material, and open wound care. Further steps range from the exclusive treatment with saline-moistened gauze to the local or systemic application of antibiotics, and are supported by conventional drainage or percutaneous catheter drainage [1]. The goal of these various treatments is to accelerate wound cleansing and thus to support wound healing.

A new treatment of wound infections and chronic wounds called vacuum-assisted closure (VAC) was recently introduced [2,3]. The VAC system consists of a polyvinyl alcohol (PVA) foam with a pore-size of 0.7-1.5 mm that is connected to a Redon drainage and a vacuum bottle. The PVA foam is fitted in size according to the patient's injury and is placed within the wound leading the Redon drainage external. The wound is then closed and a continuous suction is established. The usual treatment with VAC involves at least two steps with an exchange of the PVA foam generally after one week [2,4,5]. Various case reports and clinical studies investigating the efficiency of VAC application to either chronic or acute wounds showed successful wound healing for almost all treated patients [2,4-6]. Different animal models have been used to study the mechanisms leading to the positive effect of VAC in wound healing. Experimentally induced wounds in pigs were treated with VAC and healing was compared to control wounds treated with saline-moistened gauze: the results showed an increase in local blood flow with an improved supply of nutrients, a decrease in bacterial count following removal of excess wound fluid, and an accelerated rate of granulation tissue formation [3]. A second reason for the positive effect of VAC may be the reduction of post-traumatic immunosuppression mediated by the continuous drainage of fluid from the wound. Release of soluble mediators, including proinflammatory cytokines within the wound fluid has indeed been implicated in the immunosuppression often observed after severe injury [7-9]. Thus, the VAC system might allow the infiltration of leukocytes in contact with the wound, and promote an efficient immune reaction against the local infection. Neutrophilic granulocytes form the first line of defense against wound

infection, but are not essential for wound healing [10,11]. In contrast, macrophages and T lymphocytes have been shown to play a critical role [10,12]: a marked reduction of wound breaking strength and collagen synthesis is observed after T cell depletion in mice, and interleukin 2 has also been shown to enhance wound healing in a rat model [13,14]. Moreover, the tight contact established by the Redon drainage system between the wound surface and the PVA foam, may even allow infiltration of cells into the foam itself. However, only few data on the recruitment of immunocompetent cells to the vicinity of or inside the PVA foam are available so far. Polynuclear neutrophils and monocytes penetrate rapidly into subcutaneously implanted sponges in a rat wound model [15]. Leukocyte infiltration into PVA foams without drainage system has also been observed in pigs [16]. In humans, the cell populations possibly infiltrating the PVA foam during VAC therapy, and their potential role in wound healing have not yet been characterized.

We performed an extensive study of the leukocytes infiltrating PVA foams obtained from patients after routine VAC treatment. We analyzed these populations by histology, fluorescence-activated cell analysis, and functional studies, including T-cell assays to measure specific proliferative responses against the autologous infectious bacteria. Our results indicate that the implanted PVA foam is an attractive habitat for immune cells, mainly granulocytes, but also CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The potential contribution of these cells to wound cleansing, as well as possible improvements are discussed.

Table 1. Patients involved in the study

Patient	Age (years) /Sex	Indication for therapy with vacuum-assisted closure	Wound infection	Foam	Implantation time (days) ^A
29	59/M	Infected arthroplasty of the hip with chronic fistula	<i>S. aureus</i> ^E	29.1	7
30	66/M	Infected arthroplasty of the hip with chronic fistula	<i>S. aureus</i>	30.1/30.2	7/7
32	38/M	Abscess-forming osteitis of the thigh	<i>S. epidermidis</i> ^E	32.1/32.2	6/7
39	80/F	Infected arthroplasty of the hip with chronic fistula	<i>S. aureus</i>	39.3	7
40	77/M	Impaired wound healing after venectasia (saphena magna) for CABG ^B	<i>S. epidermidis</i>	40.2	7
42	58/M	Haematoma of the groin after PTCA ^C	<i>S. epidermidis</i>	42.1/42.2	5/6
43	71/M	Fistula at chronic osteitis of the thigh	<i>C.k., M.m., E.f., B.f.</i> ^E	43.1	7
44	78/F	Infected haematoma of the groin after IABP ^D	<i>E. faecium</i> ^E , <i>S. epidermidis</i>	44.1	7
45	80/F	Mediastinitis and osteitis of the sternoclavicular joint	<i>S. aureus</i>	45.2	6
47	74/M	Infected arthroplasty of the hip with chronic fistula	<i>S. epidermidis</i>	47.1	7
48	38/M	Chronic fistula after collum femoris fracture	<i>A. neuii ssp. anitratus</i> ^E	48.1	7
50	68/M	Empyema of the shoulder	<i>S. aureus</i>	50.1	8
51	47/M	Infected haematoma of the knee after osteotomy	<i>S. aureus</i>	51.2	7
52	70/M	Infected arthroplasty of the hip with chronic fistula	<i>S. aureus, S. epidermidis</i>	52.1/52.2	7/7
56	58/M	Infection of an osteosynthesis after fracture of a vertebra	<i>E. coli</i> ^E	56.1	8

^APVA foams were removed from the wound after the indicated period of time and used immediately for analysis. ^BCoronary artery bypass grafting.

^CPercutaneous transluminal coronary angioplasty. ^DIntraaortic balloon pump. ^E*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, C.k. Citrobacter koseri, M.m. Morganella morgani, E.f. Enterococcus faecalis, B.f. Bacteroides fragilis, Enterococcus faecium, Actinomyces neuii subspecies anitratus, Escherichia coli.*

Materials and Methods

Patients

Fifteen patients from the Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik and from the Department of Surgery at the University of Tübingen were involved in the study. All were suffering from wound infection providing an indication for VAC. As the general treatment with VAC involves 14 days of therapy with one exchange of the PVA foam (VacuSeal®, Coloplast, Hamburg, Germany and Coldex, Mondomed, Hamont, Belgium) after 5 to 8 days, in many cases we obtained two PVA foams per patient: one after the first week of therapy (foam N°.1) and one after the second (foam N°.2). The foam size was highly variable, ranging from ~ 10 cm² to ~ 50 cm², with a thickness of ~ 1 cm. The bacterial strains causing the infection were determined by classical methods after intra-operative wound smear taken during PVA foam implantation. All patients were treated with antibiotics during VAC therapy. A list of the patients involved and the corresponding PVA foams used in this study is given in Table 1.

Histological analysis

Part of the sponge was fixed in 4% buffered formalin and embedded in paraffin. For conventional histology, 5 µm sections were stained by hematoxylin and eosin, or Giemsa. The naphthol-ASD-chloroesterase reaction was used for the identification of neutrophilic granulocytes. Immunohistochemical staining was carried out by the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method of Hsu et al. [17], with monoclonal antibodies (mAbs) specific for CD3, CD4, CD56 (Novocastra, Newcastle, UK), CD57 (Becton Dickinson, Mountain View, CA), CD8 (Dako, Hamburg, Germany) for T lymphocyte and natural killer (NK) cell populations, and CD68 (Dako) for macrophages.

Isolation of foam-infiltrating mononuclear cells and PBMCs

PVA foams were removed from infected wounds and kept in RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated FCS, 2.0 mM L-glutamine (Life Technologies, Paisley, Scotland), 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (c.c. pro GmbH, Neustadt,

Germany). Small pieces of foam were cut and squeezed vigorously, the resulting cell suspension was washed once, and FMCs were enriched by ficoll density gradient centrifugation (FicoLite H, Linaris, Germany). Cell recovery, depending on the sponge size, was in average 24×10^7 cells/foam. For a second enrichment step, FMCs were labeled with MACS-MicroBeads specific for CD15 (neutrophilic granulocytes) and Glycophorin A (erythrocytes) and depleted over a magnetic column according to the manufacturer's indications (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The negative fraction was collected, washed, counted and further used for flow cytometric analysis or proliferation assays. For foams 29.1, 39.3, 43.1 and 47.1, an additional step was performed using hemolytic Gey's solution.

Peripheral blood (10 ml, EDTA-supplemented) from patients was obtained the same day as the PVA foam. Buffy coats from healthy donors were kindly provided by the Blood Bank, University of Tübingen. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using ficoll and used as control for flow cytometry or proliferation assays.

Flow cytometric analysis and statistical analysis

The following antibodies were used for cytometry: fluorescence isothiocyanate (FITC) conjugated mAbs specific for CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, Glycophorin A (all Coulter-Immunotech, Hamburg, Germany), TCR- γ/δ -1 (Becton Dickinson); phycoerythrin (PE) conjugated mAbs specific for CD1a, CD25, CD56, HLA-DR, CD2, CD45RO and an unconjugated mAb specific for CD15 (all Coulter-Immunotech, except HLA-DR, Leico Biotech., St Louis, MO). Background staining was evaluated using FITC or PE coupled isotype controls (Coulter-Immunotech). Aliquots of 2×10^4 - 15×10^4 FMCs and PBMCs were stained with the different mAbs using a standard protocol. For indirect staining, GAM-Ig-PE was used (Southern Biotechnology Assoc., Birmingham, AL). Cells were either analyzed immediately or fixed in PBS 0.1% NaN_3 1% formaldehyde. Fluorescence analysis was performed on a FACScalibur cytometer (Becton Dickinson).

For Table 3, differences in the percentage of positive cells between patient PBMCs and FMCs were tested for each activation marker using a one-tailed Student's t test. Differences with a P value <0.05 were considered significant.

Heat-killed bacteria

The following strains of bacteria were obtained from wound smears of the patients: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Bacteria were grown on Columbia blood-agar plates (Columbia agar-plates (Oxoid, Basingstoke, Great Britain) supplemented with 5 % sheep blood) for 24 h at 37°C, harvested, washed once at 3000 rpm for 10 min and resuspended in PBS. Bacteria concentrations for *S. aureus* and *S. epidermidis* were determined by measuring the optical density at 600 nm (patients 51 and 52), and estimated for patients 29 and 30 by visual inspection. *P. aeruginosa* concentration was estimated by plate count: serial dilutions of the viable bacterial suspension were plated, and colony forming units (CFU) were enumerated after 24h. Bacteria were heat-killed for 3 min at 80°C and successful inactivation checked by incubation in soya bean-casein digest medium (Oxoid) and on Columbia blood-agar plates for 48 h at 37°C. Heat-killed bacterial suspensions were stored at 4°C before use.

Proliferation assays

FMCs and autologous PBMCs (5×10^4 cells/well) were cultured in 96-well, half-area, flat-bottom plates (Multimed, Kirchheim/Teck, Germany) in 50 μ l α -MEM medium (Sigma, Deisenhofen, Germany) supplemented with 10% heat-inactivated human serum (Diagast, Jülich, Germany), L-glutamine, penicillin, streptomycin, and 50 μ g/ml gentamycin (Life Technologies) in duplicates or triplicates without further additives (control wells) or with different stimuli (experimental wells): Phytohaemagglutinin-L (PHA-L) at 0.5 μ g/ml (Boehringer Mannheim, Germany) together with recombinant human interleukin-2 (r-IL2) at 20 IU/ml (Biozol, Eching, Germany); tetanus toxoid (TT) at 5 μ g/ml (Chiron Behring, Marburg, Germany); aspergillus antigen (AA) at 20 μ g/ml (Aspergillus protein extract, kindly provided by Dr. J.P. Latge, Institut Pasteur, Paris); tuberculin-purified protein derivative (PPD) at 5 μ g/ml (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark); heat-killed bacteria: *S. aureus* at 5×10^6 bacteria/ml (SA and SAC), *S. epidermidis* at 5×10^6 /ml (SE I) and at 5×10^7 /ml (SE II), control *P. aeruginosa* at 10^8 /ml (PAC); these optimal bacterial concentrations were preliminary established by titration experiments; irradiated (30 Gy) allogenic PBMCs at 5×10^4 cells/well for mixed lymphocyte reaction (MLR); a mix of staphylococcal toxins (ST):

staphylococcal enterotoxin A, staphylococcal enterotoxin B and toxic shock syndrome toxin-1, each at 10 ng/ml (Sigma, Deisenhofen, Germany). After 4 or 6 days of culture at 37°C and 7.5 % CO₂, 10 µM 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) was added to each well. Cells were incubated for additional 14 h, and proliferation was determined by BrdU incorporation as indicated by the manufacturer (cell proliferation ELISA, Boehringer Mannheim). Results are expressed as absorbance (A_{370nm}-A_{492nm}) ± SE, measured with a SPECTRAMaxTM Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, CA, USA). Background absorbance (always < 0.37 OD units) was evaluated by incubation of culture medium alone, and systematically subtracted.

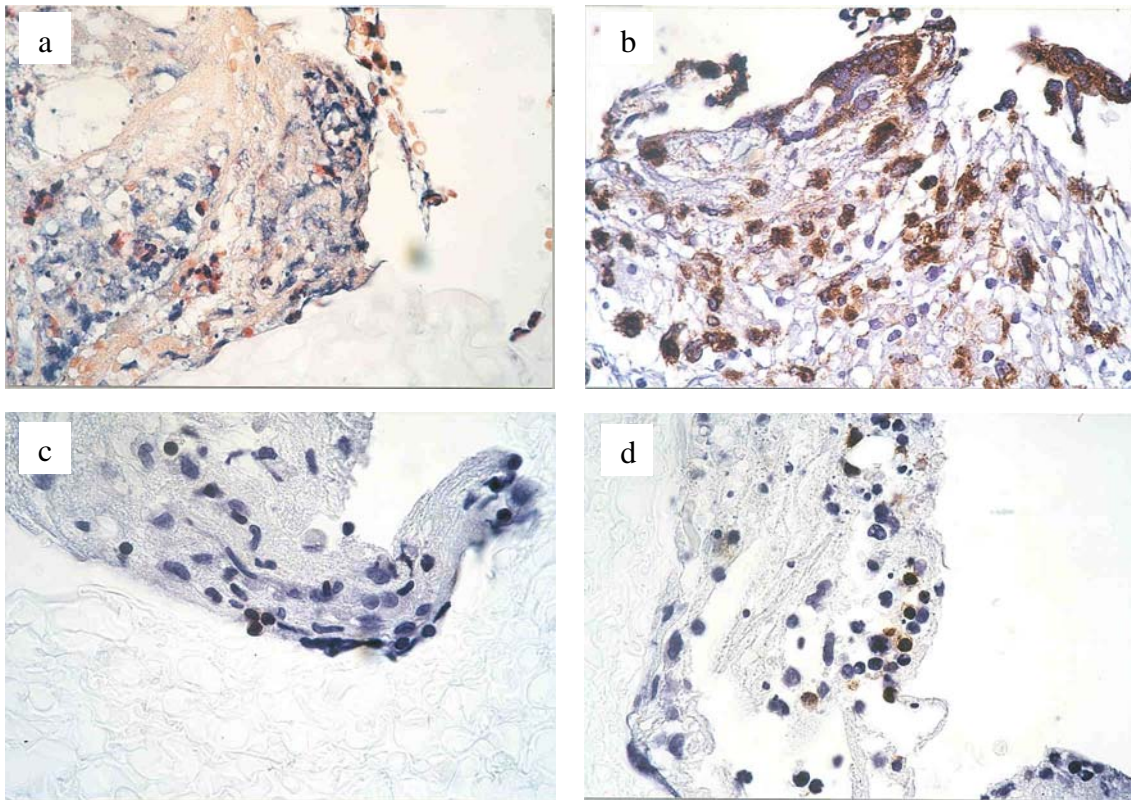


Figure 1: Histochemical and immunohistochemical staining of paraffin embedded sections from foam 30.2. a) Granulocytes as stained red with the naphthol-ASD-chloroesterase reaction. b) anti-CD68, c) anti-CD3 and d) anti-CD8 mAbs were used with the avidin-biotin-peroxidase method to detect macrophages and T-lymphocytes (x560).

Results

Immunohistochemical analysis of foam infiltrating cells

The cell populations infiltrating the PVA foam seven days after implantation were identified by histochemistry. A representative experiment is presented in Figure 1 (foam 30.2). Infiltrating cells were mainly neutrophilic granulocytes (Fig 1a), although macrophages as stained with anti-CD68 mAb were also present (Fig 1b), together with a few T lymphocytes (CD3 and CD8 staining, Fig 1c and 1d). These three populations were found in all the foams studied, occasionally with a gradual decrease in cell

distribution from the surface (many cells) to the inner structure of the foam (few cells). Granulocytes were dominant, whereas the infiltration of T lymphocytes was variable among patients and increased with longer implantation times (data not shown). Moreover, rare B lymphocytes could also be observed (anti-CD20 mAb), whereas dendritic cells were not detected at all (anti-CD1a and S100 protein mAbs) (data not shown).

Isolation and characterisation of foam mononuclear cell populations (FMCs)

In a first set of experiments (n>10), foam infiltrating cells were obtained after squeezing of small sponge pieces and separation over ficoll gradient. Most of the cells obtained were granulocytes (stained with CD15 mAb) as observed previously (Figure 1), but a minor population of monocytes and lymphocytes was also found (data not shown). In order to further study this mononuclear cell population, we established a two-step purification protocol which allowed the depletion of granulocytes and erythrocytes from the foam cell suspension (see Materials and Methods). The total amount of FMCs obtained from each PVA foam using this method was 1.5×10^6 on average, confirming the observation in Figure 1 that macrophages, and especially lymphocytes, constitute a minority among foam infiltrating cells.

To characterize lymphocyte populations of FMCs, a cytometric analysis was systematically performed. The results obtained from 7 different PVA foams are presented in Table 2. The majority of lymphocytes were CD2⁺ (mean 87%) and CD3⁺ (mean 80%), with only a minority of contaminating monocytes (1.5%-5.3%). CD4⁺ T cells accounted for 57%-84% and CD8⁺ T cells for 16%-36% of all CD3⁺ T lymphocytes. Furthermore, NK cells (4.2%-15.9%, mean 9.6%) were detected in every case, as well as a small number of $\gamma\delta$ -T lymphocytes in six out of seven experiments (0.7%-3.1%). B lymphocytes in low numbers were present in 5/7 cases (0.2%-2.1%), confirming the immunohistochemistry. Dendritic cells, stained with anti-CD1a mAb were never detectable, as previously observed (data not shown). These results show that a minor population of T lymphocytes always infiltrates the implanted PVA foam, and that CD4⁺, CD8⁺ and NK cells are present in variable amounts.

Table 2. Characterisation of foam lymphocyte populations

Foam	CD2	CD3	CD4	CD8	$\gamma\delta$ -T cells	CD56	CD19	CD14
32.1	ND ^A	81.4 ^B	58.8	20.0	3.1	7.9	1.0	1.9
32.2	ND	79.9	64.5	13.1	2.4	8.9	1.0	2.8
39.3	84.7	81.1	54.5	26.8	0.7	5.9	1.9	3.9
40.2	83.7	75.5	43.4	27.3	2.9	12.8	2.1	3.0
42.1	76.8	70.8	58.1	11.3	0.9	12.0	0.2	5.3
42.2	93.5	81.3	68.4	17.5	0	15.9	0	4.2
50.1	96.5	95.7	71.8	30.8	1.2	4.2	0	1.5
Mean \pm s.d.	87.0 \pm 7.9	80.8 \pm 7.6	59.9 \pm 9.5	20.9 \pm 7.5	1.6 \pm 1.2	9.6 \pm 4.1	0.88 \pm 0.9	3.2 \pm 1.3

^AND not determined, ^BValues are given in percentage of positive cells, ^CStandard Deviation.

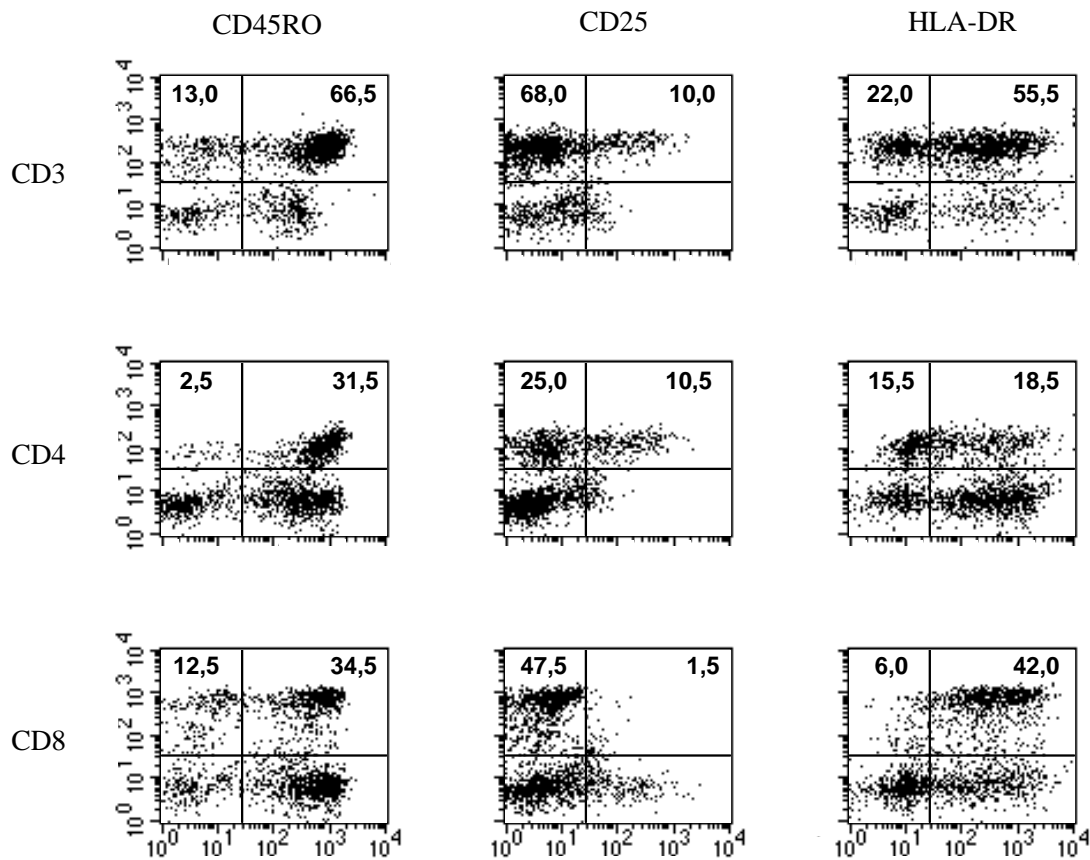


Figure 2: PVA foam derived T lymphocytes express activation markers. FMCs (foam 44.1) were stained using mAbs specific for the T cell markers CD3, CD4 or CD8 (FITC labeled, Y axis) together with mAbs specific for the activation markers CD45RO, CD25 or HLA-DR. (PE labeled, X axis). Quadrant values are given in percentage of positive cells.

Activation stage of foam T lymphocytes

To further characterize foam T lymphocytes, double-staining experiments were performed using anti-CD3, CD4 and CD8 mAbs together with T cell activation specific mAbs. As shown in Figure 2 for foam 44.1, the majority of CD3⁺ lymphocytes, i.e. 93% of CD4⁺ and 73% of CD8⁺, expressed the classical memory/activation marker CD45RO. Moreover, the α -chain of the IL2-receptor, expressed upon T cell activation, was present in 29% of CD4⁺ but, as expected, was almost absent from the CD8⁺ T cell

subpopulation. Finally, MHC class II molecules, which are only expressed after T cell activation, were present on more than 50% of CD4⁺ and on the majority of CD8⁺ T lymphocytes (85%).

To determine whether activated T cells specifically home to the sponge, the same stainings were performed on additional PVA foam lymphocytes, on patient autologous PBMCs, and on control PBMCs obtained from healthy donors. As shown in Table 3, a slight, but significant increase (5%-27%) of the CD45RO memory marker expression in foam-derived CD3⁺ cells could be observed as compared with autologous PBMCs (*P* value = 0.0130). CD3⁺CD25⁺ cells were less represented in foam than in blood (*P* = 0.0048), although in two cases (patient 43 and 48), their number was globally increased compared to that of healthy donors. Moreover, an increase in the number of HLA-DR⁺ cells was observed in patients as compared to normal PBMCs, and in 4/5 patients tested, the percentage of CD3⁺ HLA-DR⁺ was found to be higher in the foam cells compared to blood cells (*P* = 0.0268). These data indicate that foam T lymphocytes constitute a distinct population that is different from peripheral T lymphocytes, and contains a large subpopulation of cells expressing activation markers.

Table 3. Comparison of activation stage between FMCs and autologous patient PBMCs

Patient	Cells analyzed	% of CD45RO ⁺ in CD3 ⁺	% of CD25 ⁺ in CD3 ⁺	% of HLA-DR ⁺ in CD3 ⁺
43	FMC (43.1)	76.4	49.8	28.0
	PBMC	67.2	61.5	9.0
44	FMC (44.1)	83.4	12.8	71.6
	PBMC	65.6	18.6	44.6
45	FMC (45.2)	86.6	15.4	46.5
	PBMC	82.3	27.3	36.8
47	FMC (47.1)	44.7	ND	27.4
	PBMC	38.3	ND	30.6
48	FMC (48.1)	62.7	25.1	36.2
	PBMC	57.8	32.4	20.2
Mean±Standard Deviation	FMC	70.8±17.2	25.8±16.9	41.9±18.3
	PBMC	62.2±16.1	35.0±18.6	28.2±14.0
<i>P</i> value	FMC/PBMC	0.0130	0.0048	0.0268
HD1 ^A	PBMC	65.8	19.2	7.1
HD2	PBMC	63.0	22.0	13.7

^AHD healthy donor.

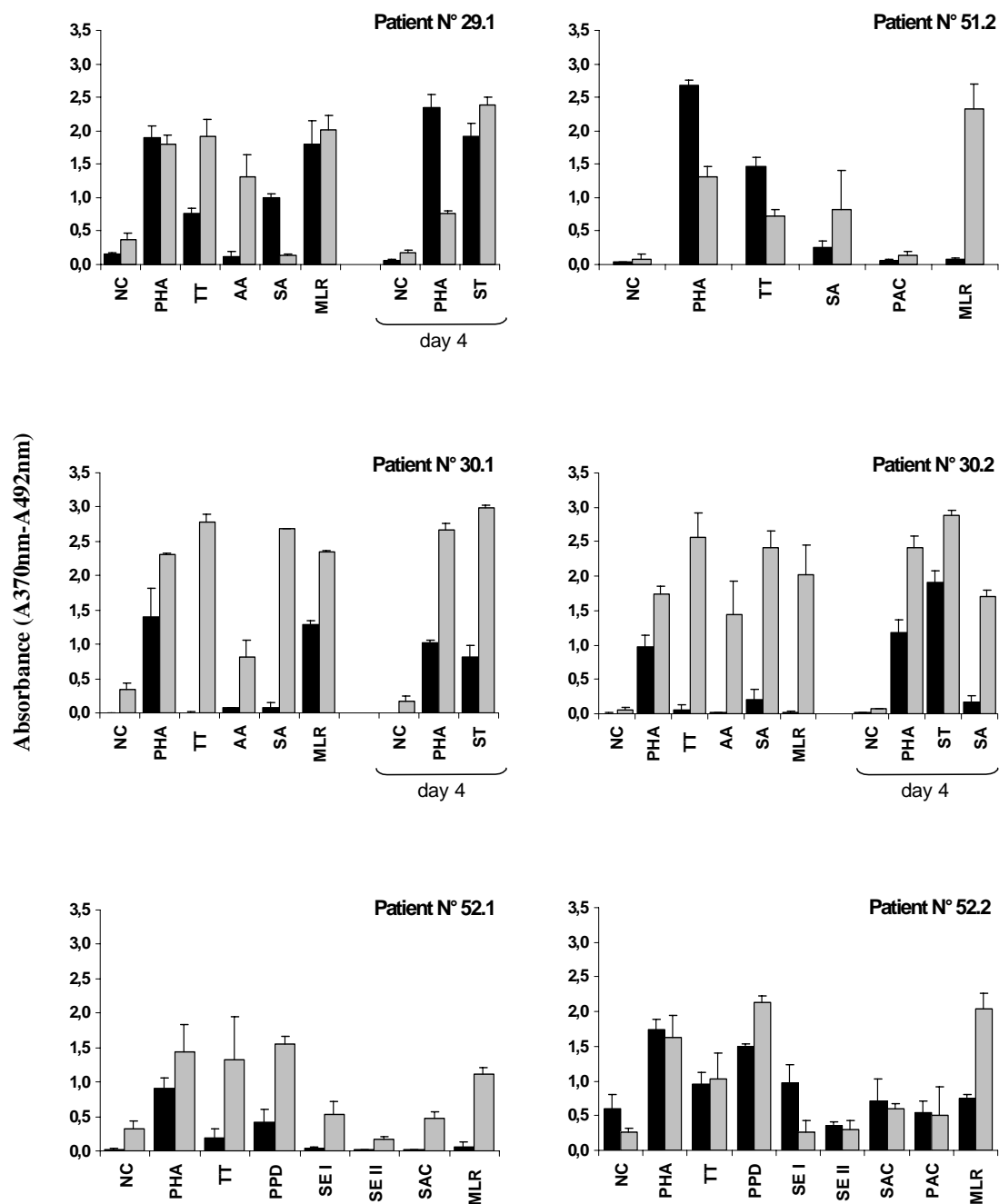


Figure 3: Proliferative responses of FMCs and autologous patient PBMCs upon stimulation with various antigens. 5×10^4 FMCs (black bars) or autologous PBMCs (grey bars) were cultured for 6 days (if not indicated differently) and analyzed for 5-bromo-2'-deoxyuridine-(BrdU)-incorporation after additional 14 h. NC, negative control. PHA, Phytohaemagglutinin. TT, tetanus toxoid. AA, aspergillus antigen. PPD, tuberculin purified protein derivative. MLR, mixed lymphocyte reaction. ST, mix of

staphylococcal toxins. SA, patient-specific S. aureus. SE, patient-specific S. epidermidis (at two concentrations: I and II). SAC, control S. aureus. PAC, control P. aeruginosa.

Functional study of patient's foam and peripheral T cells

Finally, we studied the functional characteristics of foam T lymphocytes and compared them to autologous PBMCs. Results are presented in Figure 3 for 4 patients, accounting for 6 different foams. FMCs were always able to proliferate to a polyclonal stimulus (PHA), either at day 4 or at day 6, showing that they were functional after the purification procedure. However, the response to different recall antigens was variable and usually differed from that of autologous PBMCs. For example, FMCs from patients 29, 51 and 52 did proliferate in response to TT, but not FMCs from patient 30. In contrast to PBMCs, FMCs were not able to proliferate after stimulation with aspergillus antigen (3/3 foams tested). Interestingly, the response of FMCs from patient 52 to PPD, another recall antigen, was significantly increased in the second foam analyzed. Polyclonal stimulation against allogenic PBMCs was also evaluated in a 6-day MLR reaction, and showed a variable response: alloreactive T lymphocytes were present in foam 29.1 but hardly detectable in foam 51.2. As already observed for PPD, proliferation against allogenic cells differed between foams 1 and 2 of patients 30 and 52. The response to a mix of staphylococcal superantigens (ST) was also determined after a 4-day coculture, and showed a significant stimulation of FMCs, although weaker than for PBMCs, in 3/3 foams tested.

To determine whether T lymphocytes had been activated *in vivo* against the bacterial infection, FMCs and PBMCs were stimulated with patient specific bacteria (see Table 1) and T cell proliferation was measured after 6 days. Patients 51 and 30 (foams 30.1 and 30.2) showed a significant proliferation of PBMCs, and, to a much lesser extent of FMCs, against *S. aureus* bacteria (SA). This response was specific for the bacterial strain extracted from the patient's wound, since for patient 51, we did not observe any significant proliferation against a control *P. aeruginosa* stimulation (PAC, obtained from another patient). The discrepancy between FMCs and PBMCs was not a kinetical problem, because it was also observed at day 4 after stimulation (foam 30.2). Interestingly, for patient 29, the response against autologous SA bacteria was approximately 5-fold higher of FMCs than of PBMCs, a specific effect of the anti-

bacterial response which was not observed for the other stimuli tested. This strongly suggests that bacteria-reactive T lymphocytes did infiltrate the PVA foam in this patient. For patient 52, a weak proliferation from PBMCs was observed against the autologous *S. epidermidis* (SE), whereas no activation could be detected in FMCs (foam 52.1). However, in the second foam (52.2), a significant response was observed in FMCs, whereas this time, PBMCs did not respond. This better proliferation of FMCs over PBMCs against the specific bacterial strain was already observed for patient 29. This effect was stronger for a low bacterial concentration (SE I) than for a higher dose (SE II), which may be toxic for the cells. Control allogenic SA bacteria (SAC) and PAC induce a weak proliferation of both peripheral and foam T lymphocytes. However, as patient 52 was infected by both SE and SA (see Table 1), we cannot exclude the induction of a mixed proliferative response against different bacterial strains.

Taken together, these data demonstrate that PVA foams implanted for 7 days in patients contain functional T lymphocytes able to respond to various stimuli, including recall antigen or superantigens, but also T cells specifically recognizing the bacterial strain present inside the wound. Foam T cells have distinct functional properties as compared to PBMCs, which is in accordance with our observation that they express different surface antigens.

Discussion

The majority of immune cells infiltrating implanted foams are neutrophilic granulocytes, as indicated by histochemistry and FACS analysis. In addition, monocytes and lymphocytes are also present. The latter consist mainly of CD4⁺ and, to a lesser extent, CD8⁺ T cells. In addition, a few NK, $\gamma\delta$ -T cells, and occasionally B lymphocytes were also observed. These populations correspond to those cells naturally infiltrating healing wounds and are thought to be partially recruited by the “foreign body reaction” occurring against the implanted PVA foam [16,18]. Neutrophilic granulocytes are the first cells to populate a wound, reaching the maximal number after 48 h. Their function is probably to mediate innate immunity against bacteria and to remove wound debris, but they appear not to be involved directly in wound healing [11]. Macrophages appear at day 2 and peak between day 3 and day 5. They release soluble mediators that induce granulation tissue formation [19,20]. Finally, T lymphocytes populate wounds around day 5 and peak at day 7 [21]. They have been shown to be involved in wound healing, but their exact contribution is not well established [13,22,23]. CD8⁺ cells have been reported to inhibit wound healing [24].

To investigate a potential contribution of foam-infiltrating T cells to cleansing the infection, we analyzed their activation markers and functional properties. The presence of CD45RO and HLA-DR on the majority of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells suggests an active contribution of T cells to the local immune response, as also indicated by a significantly higher frequency of CD45RO and HLA-DR among foam CD3⁺ cells as compared to autologous PBMCs in most cases. On the other hand, the IL2-receptor α -chain (CD25) was less expressed, especially on CD4⁺ cells. We conclude that foam-populating T lymphocytes do not represent the same population as peripheral T lymphocytes. This excludes that FMCs represent PBMCs homing passively inside the foam matrix and indicates an active process of T cell recruitment and/or retention. Additional studies of adhesion molecules and homing receptors cell surface expression should help to further characterize foam-infiltrating T cells.

Foam-derived T cells are able to proliferate against mitogen, superantigen, recall antigens and allogenic cells, although such responses were not found in all cases. Responses against these stimuli were usually better in autologous PBMCs, again

pointing to a different quality of foam-infiltrating cells as compared to PBMCs. Moreover, T cell responses against autologous bacterial isolates differed between peripheral T cells and foam T cells in all cases tested. These results indicate that the local antigens can influence, at least in some patients, antigen-specific T cell recruitment into the wound-implanted foam: the bacteria present in the wound (*S. aureus* and *S. epidermidis*) appear to have attracted and activated specific T cells in foams 29.1 and 52.2. The quantity of antigen available in the wound might positively influence the kinetics and the quality of such T-cell recruitment. Alternatively, antigen contact might have induced a state of nonresponsiveness in the foam-infiltrating (but not peripheral) T cells in patient 30 and in the first week of foam implantation in patient 52.

Taken together, our results indicate that PVA-foams are actively populated by functional CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in small numbers as compared to granulocytes. The CD4⁺ T cells are influenced by antigens present in the wound. Further studies on a larger panel of patients with well known bacterial infection histories should shed light on the correlation between foam infiltration with antigen-specific T cells and successful wound cleansing. The different parameters influencing FMCs recruitment, for example the nature and intensity of the bacterial infection as well as the antibiotic treatment, should also be investigated. More generally, the production of different pro or anti-inflammatory cytokines in the wound fluid is thought to be involved in the process of wound healing and tissue remodeling. Using human or animal models, it was shown that at least IL1, IL6 and α -TNF are released with different kinetics into the wound, and decrease to normal levels after the healing process has been achieved [25-26]. The producing cells, however, have not been yet clearly characterized. It would be of interest to first identify the different cytokines produced in the wound fluid of PVA foam treated patient compared to patients without foams, and second to determine which cytokines are produced *in vitro* by the foam T cells after bacterial stimulation. Finally, different animal models have shown that T cell infiltration inside the sponge matrices can be manipulated by prior injection of antigens and/or various cytokines [16,27-30]. Then, PVA-foams could be redesigned to improve T-cell infiltration and T-cell activation, for example by coating with costimulatory substances or by soaking with T cell-attracting chemokines before implantation.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Graduiertenkolleg “Zellbiologie in der Medizin”, University of Tübingen accorded to M.E. (GRK 386), and by a Marie Curie fellowship awarded to C.G. (CT-96-1298).

We wish to thank A. Schäffer from the Department of Medical Microbiology for technical assistance, G. Stürner and E. Gut from the Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik and R. Casneuf from the Department of Surgery for removal and preparation of PVA foams, H. Northoff from the Blood Bank for providing buffy coats, V. Reichert, G. Stuhler from the Medizinische Klinik II (all Tübingen) and J.P. Latge from the Pasteur Institut in Paris for reagents, AK Nussbaum, S. von Daake, J. Müller and B. Schönfisch for help in the statistical analysis, and L. Yakes for editorial assistance.

References

- 1 Mateley PJ, Beningfield SJ, Lourens S, Immelman EJ. Successful treatment of infected thoracoabdominal aortic graft by percutaneous catheter drainage. *J Vasc Surg* 1981; **13**: 513-5.
- 2 Argenta LC, Morykwas MJ. Vacuum-Assisted Closure: A new method for wound control and treatment: clinical experience. *Ann Plast Surg* 1997; **38**: 563-76.
- 3 Morykwas MJ, Argenta LC, Shelton-Brown EI, McGuirt W. Vacuum-Assisted Closure: a new method for wound control and treatment: animal studies and basic foundation. *Ann Plast Surg* 1997; **38**: 553-62.
- 4 Müllner T, Mrkonjic L, Kwasny O, Vécsei V. The use of negative pressure to promote the healing of tissue defects: a clinical trial using the vacuum sealing technique. *Br J Plast Surg* 1997; **50**: 194-9.
- 5 Fleischmann W, Becker U, Bischoff M, Hoekstra H. Vacuum sealing: indication, technique, and results. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 1995; **5**: 37-40.
- 6 Zöch G. „Vacuum-Assisted Closure“ V.A.C. TM-Anwendertreffen. *Acta Chir Austriaca* 1998; Supp **150**: 1-28.
- 7 O'Mahony JB, Palder SB, Wood JJ, McIrvine A, Rodrick ML, Demling RH, Mannick JA Depression of cellular immunity after multiple trauma in the absence of sepsis. *J Trauma* 1984; **24**: 869-75.
- 8 Barbul A, Fishel RS, Shimazu S, Damewood, RB, Wasserkrug HL, Efron G. Inhibition of host immunity by fluid and mononuclear cells from healing wounds. *Surgery* 1984; **96**: 315-9.
- 9 Lazarou SA, Barbul A, Wasserkrug HL, Efron G. The wound is a possible source of posttraumatic immunosuppression. *Arch Surg* 1989; **124**: 1429-31.
- 10 Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *New Engl J Med* 1999; **341**: 738-46.

- 11 Simpson DM, Ross R. The neutrophilic leukocyte in wound repair. A study with antineutrophil serum. *J Clin Invest* 1972; **51**: 2009-23.
- 12 Thornton FJ, Schäffer MR, Barbul A. Wound healing in sepsis and trauma. *Shock* 1997; **8**: 391-401.
- 13 Efron JE, Frankel HL, Lazarou SA, Wasserkrug HL, Barbul A. Wound healing and T-lymphocytes. *J Surg Res* 1990; **48**: 460-3.
- 14 Barbul A, Knud-Hansen J, Wasserkrug HL, Efron G. Interleukin 2 enhances wound healing in rats. *J Surg Res* 1986; **40**: 315-9.
- 15 Meszaros AJ, Reichner JS, Albina JE. Macrophage phagocytosis of wound neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 1999; **65**: 35-42.
- 16 Wooley ST, Whyte A, Licence ST, Haskard DO, Wooding FBP, Binns RM. Differences in E-selectin expression and leucocyte infiltration induced by inflammatory agents in a novel subcutaneous sponge matrix model. *Immunology* 1995; **84**: 55-63.
- 17 Hsu SM., Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981, **29**: 577-80.
- 18 Akporiaye ET, Stewart SJ, Stevenson AP, Stewart CC. A gelatin sponge model for studying tumor growth: flow cytometric analysis and quantitation of leukocytes and tumor cells in the EMT6 mouse tumor. *Cancer Res* 1985; **45**: 6457-62.
- 19 Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 1975; **78**: 71-100.
- 20 Roos R, Benditt EP. Wound healing and collagen formation. II. Fine structure in experimental scurvy. *J Cell Biol* 1962; **12**:533-51.

- 21 Fishel RS, Barbul A, Beschorner WE, Wasserkrug HL, Efron G. Lymphocyte participation in wound healing. Morphologic assessment using monoclonal antibodies. *Ann Surg* 1987; **206**: 25-9.
- 22 Schäffer M, Barbul A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. *Br J Surg* 1998; **85**: 444-60.
- 23 Martin CW, Muir IFK. The role of lymphocytes in wound healing. *Br J Plast Surg* 1990; **43**: 655-62.
- 24 Barbul A, Breslin RJ, Woodyard JP, Wasserkrug HL, Efron G. The effect of in vivo T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing. *Ann Surg* 1989; **209**: 479-83.
- 25 Ford HR, Hoffman RA, Wing EJ, Magee DM, McIntyre L, Simmons RL. Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model. *Arch Surg* 1989; **124**:1422-8.
- 26 Holzhiemer RG, Steinmetz W. Local and systemic concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in human wounds. *Eur J Med Res* 2000; **18**:347-55.
- 27 Gladue RP, Allen M, Cunningham A, Gardner J, Laquerre AM, Connelly PA, Shaw AS, Mcneish J. Phenotypic characterization and analysis of allogeneic cell responses in ZAP-70 dominant negative transgenic mice. *Clin Exp Immunol* 1997; **110**:397-402.
- 28 Ford HR, Hoffman RA, Tweardy DJ, Kispert P, Wang S, Simmons RL. Evidence that production of interleukin 6 within the rejecting allograft coincides with cytotoxic T lymphocyte development. *Transplantation* 1991; **51**: 656-61.
- 29 Watanabe M, McCormick KL, Volker K, Ortaldo JR, Wigginton JM, Brunda MJ, Wiltout RH, Fogler WE Regulation of local host-mediated anti-tumor mechanisms by cytokines. Direct and indirect effects on leukocyte recruitment and angiogenesis. *Am J Path* 1997; **150**: 1869-81.

30 Zangemeister U, Thiede K, Schirmacher W. Recruitment and activation of tumor specific immune T cells in situ: functional studies using a sponge matrix model. *Int J Cancer* 1989; **43**: 310-6.

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1998 bis Dezember 1999 am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee und Frau Dr. Cécile Gouttefangeas durchgeführt. Unterstützt wurde diese Arbeit durch ein Stipendium des Graduiertenkollegs „Zellbiologie in der Medizin“ der Universität Tübingen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, der mir meinen Wunsch ermöglichte, wissenschaftlich auf dem Gebiet der Immunologie zu arbeiten und mir damit die Gelegenheit gab, mich intensiv mit der Forschung und den faszinierenden Vorgängen des Immunsystems auseinanderzusetzen. Sein ständiges Interesse, seine allgegenwärtige Diskussionsbereitschaft und seine vielen hilfreichen Anregungen trugen entscheidend zum Entstehen dieser Arbeit bei.

Frau Dr. Cécile Gouttefangeas danke ich herzlich für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Ihre stetige Bereitschaft, auf meine vielen Fragen zu antworten, ihre zahlreichen Ratschläge, Aufmunterungen und ihre wunderbare Unterstützung halfen mir sehr, diese Arbeit fertigzustellen. Die Zusammenarbeit mit ihr war äusserst lehrreich und hat mir grossen Spass bereitet.

Frau Dr. Jutta Bachmann danke ich für die Organisation der spannenden und informativen Veranstaltungen im Rahmen des Graduiertenkollegs „Zellbiologie in der Medizin“. Sie waren alle eine sehr schöne Erfahrung für mich.

Réne Toes, Arnaud Moris, Steve Pascolo, Cécile Gouttefangeas und Karl Lang möchte ich für die vielen hilfreichen Diskussionen und Vorschläge während der „T-Zell-Clubs“ danken und dafür, dass sie mir Holland und Frankreich ein Stückchen näher gebracht haben. Lynne Yakes, Franziska Löwenstein und allen anderen Mitarbeitern des Interfakultären Instituts für Zellbiologie, Abteilung Immunologie danke ich für das hervorragende und äusserst angenehme Arbeitsumfeld.

Herrn Dr. Jürgen Pinocy von der Chirurgischen Universitätsklinik, Tübingen danke ich für seine hilfreiche Unterstützung bei der Organisation der PVA-Schwämme, der hitzeinaktivierten Bakterien und der immunhistochemischen Färbungen.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Peter Ruck, Institut für Pathologie, Abteilung Spezielle Histo- und Cytopathologie, Universität Tübingen für die immunhistochemische Aufbereitung der PVA-Schwämme.

Frau Andrea Schäffer von der Medizinischen Mikrobiologie des Hygiene-Instituts, Universität Tübingen danke ich für ihre Hilfe und die vielen netten Gespräche bei der Aufbereitung der hitzeinaktivierten Bakterien.

Frau Edith Gut und Herrn Gregor Stürner von der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik, Tübingen danke ich für die unermüdliche Bereitstellung der entnommenen PVA-Schwämme.

Silvija Schönweitz, Lotta Bässler und Anja Bialkowski möchte ich für ihre wundervolle Freundschaft danken.

Mein besonderer Dank gebührt meinen Eltern für ihre Liebe, ihr Vertrauen und ihre unerschöpfliche Hilfsbereitschaft.

10 Curriculum Vitae

NAME, Vorname:	EBERLE, Melanie Judith
Geburtstag:	29. 09. 1975
Geburtsort:	Urach, jetzt Bad Urach
 Ausbildung	
Aug. 1986-Juni 1995	Allgemeine Hochschulreife, Graf-Eberhard-Gymnasium, Bad Urach.
Sept. 1995-Aug. 1996	Freiwilliges Soziales Jahr
Sept. 1996-Aug. 1998	Studium der Humanmedizin, 1./2. Studienjahr, Universität Tübingen.
Aug. 1998	Physikum, Universität Tübingen.
Sept. 1998-Dez. 1999	Promotion (experimenteller Teil)
Okt. 1999-Sept. 2001	Studium der Humanmedizin, 3./4. Studienjahr, Universität Tübingen.
Aug. 2000	1. Staatsexamen, Universität Tübingen.
Okt. 2001-Sept. 2002	Studium der Humanmedizin, 5. Studienjahr, TU Dresden.
Okt. 2000-Feb. 2003	Promotion (schriftlicher Teil)
Sept. 2003	2. Staatsexamen, TU Dresden.
Okt. 2003-Sept. 2004	Studium der Humanmedizin, 6. Studienjahr, Mexiko Stadt/TU Dresden.
05. 11. 2004	3. Staatsexamen, TU Dresden.
 Sprachen	 Englisch, Spanisch, Französisch, Latein.

Klinische Praktika

Feb.-März 2001	Städtisches Krankenhaus Dresden-Neustadt, Klinik für Anästhesiologie u. Intensivtherapie, Dresden.
Aug.-Sept. 2001	Gynäkologische Praxis, Dr. med. Dipl. Psych. Christel Valentin, Tübingen.
Sept. 2002	Krankenhaus Freital GmbH, Medizinische Klinik I, Freital.

Sonstiges

Sept. 1996-April 1998	Pflegehelfer, Medizinische Klinik und Poliklinik, Abteilung II (Hämatologie, Onkologie, Immunologie, Rheumatologie), Universität Tübingen.
Mai-Aug. 1998/Feb.-Sept. 2001	Praxishilfe, gynäkologische Praxis, Tübingen.
Nov. 1998-Okt. 1999	Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Zellbiologie in der Medizin“, Universität Tübingen.
Dez. 1999-Aug. 2002	Pflegehelfer, Radiologischen Klinik, Abteilung für Strahlentherapie, sowie Orthopädische Klinik, Wachzimmer, Universität Tübingen.
Okt. 2001-Okt. 2002	Vorstandsvorsitzende der Akademischen Fliegergruppe der TU Dresden e.V.
April 2002-März 2003	Ausbilderin für Lebensrettende Sofortmassnahmen und Erste Hilfe.

Veröffentlichung

Eberle M., Gouttefangeas C., Ruck P., Stark M., Müller J.E., Becker H.D., Rammensee H.-G., Pinocy J. Functional T lymphocytes infiltrate implanted polyvinyl alcohol foams during surgical wound closure therapy. Clin Exp Immunol 2001; 124:398-405.

Vorträge und Poster

- 99-1 Eberle M., Gouttefangeas C., Müller J.E., Stark M., Ruck P., Pinocy J., Rammensee H.-G.. Untersuchung von immunologisch relevanten Zellen in Wundschwämmen. Vortrag: 1. Wintersymposium des Graduiertenkollegs "Zellbiologie in der Medizin", Oberjoch, 22.-25.02.1999.
- 99-2 Eberle M., Gouttefangeas C., Rammensee H.-G.. Untersuchung von T Lymphozyten aus Polyvinylalkoholschwämmen nach Vakuumversiegelung. Vortrag: Bundesweites Graduiertenkollegstreffen, Würzburg, 23./24. 04. 1999.
- 99-3 Eberle M., Gouttefangeas C., Müller J.E., Stark M., Ruck P., Pinocy J., Rammensee H.-G.. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes isolated from polyvinylalcohol foams of patients with infected soft tissue damages. Poster: 30. Jahrestagung der Gesellschaft für Immunologie, Hannover, 29.09.-02.10.1999.