

Aus der Klinik für Unfallchirurgie,  
Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie,  
Zentrum für Chirurgie, Universitätsklinikum Ulm  
Ärztlicher Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Florian Gebhard

**Einfluss des hämorrhagischen Schocks auf die  
zellvermittelte Immunfunktion von Mäusen nach  
stumpfen Thoraxtrauma**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin der Medizinischen Fakultät  
der Universität Ulm

Vorgelegt von  
Björn Tauchmann  
aus Krumbach  
2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Knöferl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Karl-Heinz Orend

Tag der Promotion: 10.06.2011

Gewidmet

meiner Mutter Ingrid und meinem Vater Hans

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Klinischer Hintergrund	1
1.2	Das Thoraxtrauma	2
1.3	Der hämorrhagische Schock	3
1.4	Die Rolle der Monozyten	3
1.5	Tiermodelle	4
1.6	Zielsetzung der Studie	5
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>6</b>
2.1	Tierversuch	6
2.1.1	Versuchstiere	6
2.1.2	Versuchsaufbau	7
2.1.3	Hauptversuch	10
2.2	Bestimmungen nach Tierversuchsende	14
2.2.1	Blut	15
2.2.2	Leber	16
2.2.3	Milz	17
2.2.4	Zytokinmessung mittels ELISA	18
2.3	Statistik	19
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>20</b>
3.1	Versuchstiere	20
3.2	Druckwelle	20
3.3	Physiologische Parameter	20
3.3.1	Atemfrequenz	20
3.3.2	Herzfrequenz	23
3.3.3	Mittlerer arterieller Blutdruck	25
3.3.4	Pulmonale Hämorrhagien	27
3.3.5	Blutverlust	29

3.4	Immunologische Parameter	30
3.4.1	Plasma	30
3.4.2	Kupffer-Sternzellkultur	33
3.4.3	PBMC-Kultur	36
3.4.4	Milzmakrophagen-Kultur	39
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>42</b>
4.1	Zielsetzung der Studie	42
4.2	Versuchsaufbau	43
4.2.1	Versuchstiere	43
4.2.2	Druckwelle	43
4.2.3	Schock	44
4.2.4	Narkose	44
4.2.5	Beobachtungszeitraum	45
4.3	Physiologische Parameter	46
4.3.1	Atemfrequenz	46
4.3.2	Herzfrequenz	46
4.3.3	Mittlerer arterieller Blutdruck	47
4.3.4	Pulmonale Hämorrhagie	48
4.4	Biochemische Parameter	49
4.4.1	Tumornekrosefaktor- $\alpha$	49
4.4.2	Interleukin-6	49
4.4.3	Interleukin-10	50
4.5	Schlussfolgerungen	52
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>68</b>

## Abkürzungsverzeichnis

- Abb. Abbildung
- ARDS acute respiratory distress syndrome
- CARS compensatory anti-inflammatory response syndrome
- C3H/HeNCrl Labormäusestamm der Firma Charles River, Sulzfeld
- CD cluster of differentiation
- DMEM dulbecco's modified eagle medium
- FCS fetales Kälberserum
- ELISA enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
- et al. et alii (lateinisch: „und andere“)
- HÄM Tiere mit Blutverlust
- HL Herzklappen des rechten Lungenflügels
- IL Interleukin
- kg KG Kilogramm Körpergewicht
- L linke Lunge
- LPS Lipopolysacharid
- MAP arterieller Mitteldruck
- MCP monocyte-chemoattractant-protein
- ML Mittellappen des rechten Lungenflügels
- mmHg Millimeter Quecksilbersäule
- MODS multiple organ dysfunction syndrome
- MOF multiple organ failure
- MOV Multiorganversagen
- OL Oberlappen des rechten Lungenflügels
- one-way-ANOVA einfaktorische Varianzanalyse
- PBMC mononukleäre Zellen im peripheren Blut
- PBS phosphate buffered saline
- q.s. quantum satis (lateinisch: „so viel, wie nötig ist“)
- RPMI am Roswell Park Memorial Institute (Buffalo, New York)  
entwickeltes Zellkulturmedium
- SIRS systemic inflammatory response syndrome
- SNK Student-Newman-Keuls-Test

- TNF Tumornekrosefaktor
- TXT Tiere mit Thoraxtrauma
- TXT+HÄM Tiere mit Thoraxtrauma und hämorrhagischem Schock
- UL Unterlappen des rechten Lungenflügels

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinischer Hintergrund

Jährlich sterben circa 24.000 Bundesbürger an den Folgen eines Unfalls [64]. Unfallverletzungen stehen nicht nur auf Platz eins der führenden Todesursachen der unter Fünfundvierzigjährigen [20, 62], sie sorgen in dieser Altersgruppe auch überproportional häufig für lebenslange Invalidität der Betroffenen [93]. Der durch den Verlust produktiver Lebensjahre entstehende Schaden für Volkswirtschaft und Sozialstaat ist immens [70]. Pro Tag werden im Schnitt circa zweiundzwanzig Menschen mit Mehrfachverletzungen, sog. Polytraumapatienten, in deutsche Kliniken neu aufgenommen. Hierzu existieren nur ungenaue Zahlen, da die detaillierte Erfassung bisher nur freiwillig stattfindet, z.B. im Rahmen des Polytraumaregisters der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie. Um das Leben dieser überwiegend jungen Menschen kämpfen traumatologisch und intensiv-medizinisch tätige Ärzte jeden Tag aufs Neue. Über die letzten zwanzig Jahre konnte die Frühletalität dieses Patientenkollektivs effektiv gesenkt werden [93]. Durch Verbesserungen in der präklinischen Versorgung, die zum Ziel hatten, möglichst früh stabile Kreislaufverhältnisse zu schaffen und die Sauerstoffversorgung des Patienten zu sichern, sank die Rate an Frühkomplikationen, wie zum Beispiel dem oligoanurischen Nierenversagen [94]. Auch wenn in diesem Zusammenhang Fragen nach beispielsweise der adäquaten Volumentherapie oder dem Einfluss des Zeitpunktes der endotrachealen Intubation auf die Gesamletalität nicht eindeutig geklärt sind, geht es in diesem Bereich in den nächsten Jahren hauptsächlich um Prozessoptimierung der einzelnen Rettungssysteme [5, 27, 28, 34, 80]. Durch mehr primär überlebende Schwerverletzte einerseits, hat sich über die Jahrzehnte andererseits auch der Anteil derjenigen Patienten erhöht, die nach Tagen bis Wochen posttraumatisch bedingte Komplikationen z.B. der Lunge erleiden [29, 37]. Dies mag auch mit den in den letzten Jahren geänderten Kriterien für die Diagnosestellung eines akuten Lungenversagens liegen [6, 8]. Die AECC-Konferenz (eng: american-european-consensus-conference) hat darunter zwei fließend ineinander übergehende pathophysiologische Entitäten subsumiert. Man spricht in diesem Zusammenhang heute vom akuten Lungenschaden (eng: acute lung injury = ALI) einerseits und dem so genannten akuten Atemnotsyndrom (eng: acute respiratory

distress syndrome = ARDS) andererseits. Stellen mehrere Organsysteme ihre Funktion ein kommt es zum Multiorganversagen, kurz MOV. Letzteres, im angloamerikanischen Sprachraum auch als multiple organ failure (MOF) oder als multiple organ dysfunction syndrome (MODS) bekannt, weist je nach Studie Letalitätsraten von bis zu 80 % auf und ist weiterhin Gegenstand globaler Forschungsbemühungen [24, 81]. 7 bis 30 % aller polytraumatisierten Patienten entwickeln im Krankheitsverlauf ein solches MOV. Es handelt sich dabei um die Todesursache Nummer eins nach primär überlebtem Trauma [81, 88]. Ob es sich dabei um ein Krankheitsbild mit vielschichtiger Symptomatik einerseits oder aber um die Anhäufung einzelner, voneinander unabhängiger Pathomechanismen andererseits handelt, bleibt weiter unklar [68]. In den vergangenen Jahrzehnten konnte die experimentelle und klinische Forschung durch Veränderung von Therapieprotokollen, Einführung neuer Techniken und Entwicklung neuer Pharmaka, das Outcome der Gesamtheit aller Traumapatienten verbessern. Dies spiegelt sich in einer sinkenden Traumortalität in Deutschland im Zeitraum von 1993 bis 2005 wider [91]. Kausale Ansätze die geeignet wären, gezielt prophylaktisch, respektive therapeutisch den Traumaopfern zu helfen, welche ein hohes Risiko für Multiorganversagen haben, fehlen jedoch weiterhin.

## **1.2 Das Thoraxtrauma**

Verletzungen des Brustkorbes werden in ihrem Ausmaß oft fehlinterpretiert [7]. Ein Viertel aller Traumatoten wiesen als Todesursache Brustkorbverletzung auf [21, 45]. Will man weiter unterscheiden, ob die für diese Traumata auslösenden Gewalten stumpfer oder spitzer Genese waren, lässt sich kein wesentlicher topographischer Unterschied zwischen der Situation in Deutschland und einem angloamerikanischen Land wie z.B. den Vereinigten Staaten von Amerika erkennen [66]. Natürlich werden dort wegen hoher Kriminalitätsraten und flächendeckender Verbreitung von Schusswaffen penetrierende Verletzungen häufiger als hierzulande gesehen. Die Brustkorbverletzungen sind jedoch in beiden Ländern mehrheitlich stumpfer Genese. Verkehrsunfälle und Stürze sind die häufigsten auslösenden Pathomechanismen [66]. Vor diesem Hintergrund ist es leicht verständlich, warum Thoraxtraumata hier in Deutschland seltener als Monoverletzungen auftreten. Schwerverletzte mit mehr als einer lebensbedrohlich verwundeten Körperregion, sog. Polytraumatisierte, haben in der Hälfte der Fälle

Brustkorbverletzungen [36, 45]. Vor allem bei Verkehrsunfällen sind letztere häufig mit Verletzungen des Schädels, des Abdomens oder des Bewegungsapparates vergesellschaftet. Begleitende Schädel-Hirn-Verletzung und Blutungsschock sind dabei die wichtigsten Einflussfaktoren auf das Überleben des Patienten [102]. Das Vorliegen eines Thoraxtraumas erhöht die statistische Wahrscheinlichkeit für einen Mehrfachverletzten, Komplikationen in Form von Organversagen zu erleiden [110]. Dabei wird das respiratorische Versagen mit 30 bis 50 % der Fälle am häufigsten beobachtet [107]. Dieses kommt fast regelhaft und frühzeitig im Verlauf bei allen Patienten mit Multiorganversagen vor. Ferner bestimmt es später als meist schwer zu therapierendes ARDS die Prognose des Patienten maßgeblich [77].

### **1.3 Der hämorrhagische Schock**

Vor über einhundert Jahren charakterisierte der amerikanische Chirurg John Collins Warren Jr. eine „Krankheit“, die vermutlich so alt ist wie die Menschheit selbst. Mit dem Satz „Shock, a momentary pause in the act of death“ betonte er die Lebensbedrohlichkeit des Schockgeschehens [13]. Die über die letzten Jahrzehnte gewonnenen Erkenntnisse ändern nichts an der hohen Letalität von schweren, unkontrollierten Blutungen, vor allem in den ersten drei Stunden nach Trauma [15]. Inwieweit und für welches Patientengut die in den letzten Jahren propagierte „permissive Hypotoniebehandlung“ bei Schockpatienten, also eine Anhebung des Blutdrucks auf höchstens subnormales Niveau von Vorteil ist, wird in jüngster Zeit weiter kontrovers diskutiert [27, 60, 67]. Immunologisch gesehen stellt der Blutungsschock einen wichtigen Risikofaktor zum Entstehen von Organversagen dar [79]. In diesem Zusammenhang konnten Studien eine Hemmung der zellvermittelten Immunfunktion von Tieren mit erlittenem Blutverlust nachweisen [1, 2].

### **1.4 Die Rolle der Monozyten**

Monozyten sind in der Lage, durch die Sekretion von IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- $\alpha$  sowohl begünstigend als auch durch die Produktion von IL-4, IL-10, IL-13 und PG-E<sub>2</sub> hemmend auf den Entzündungsprozess einzuwirken [42]. Im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion beginnen sie die „Alarmzytokine“ IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$

auszuschütten. Dadurch werden sekundär umliegende Zellen zur Freisetzung von IL-8 und dem monocyte-chemoattractant-protein-1 (MCP-1) angeregt, wodurch vermehrt weitere Leukozyten und Monozyten in das betroffene Gewebe einwandern. Je nach Ausmaß des Traumas kann sich dieses Prinzip lokal begrenzt halten, als auch systemisch ausweiten [58]. Somit kann der Organismus normalerweise binnen achtundvierzig bis zweiundsiebzig Stunden den als Traumafolge anfallenden Zelldebris bewältigen. Persistiert die Zytokinausschüttung infolge fortbestehenden Gewebeuntergangs oder begleitender Infektion, kann dies zum Aushebeln der Kontrollmechanismen führen. Das lebenswichtige Gleichgewicht aus Pro- und Antiinflammation verschiebt sich, SIRS oder CARS sind die Folge [39, 43]. SIRS steht für systemic inflammatory response syndrome und bezeichnet ein frühes Ausufernd der lokal begrenzten Immunantwort zu einer unkontrollierten, globalen, proinflammatorischen Zytokinausschüttung [43]. CARS steht für compensatory anti-inflammatory response syndrome. Dabei ist eine im späteren Verlauf auftretende überschießende antiinflammatorische Immunantwort gemeint [43]. Der Theorie nach kann SIRS über den übertriebenen Angriff auf den zuvor intakten Gesamtorganismus und CARS durch eine fortdauernde Immunparalyse mit fehlender Infektabwehr zu jedem Zeitpunkt in das MODS münden [43].

## **1.5 Tiermodelle**

Sowohl für das Thoraxtrauma als auch den hämorrhagischen Schock existieren jeweils eine Vielzahl an Groß- und Kleintiermodellen, um lokale und systemische Inflammation zu beobachten. Studien an Schweinen sind vorteilhaft wegen der ähnlichen anatomischen Größenverhältnisse im Vergleich zum Menschen [69]. Somit sind fast alle Techniken der humanen Intensivmedizin an diesen Tieren anwendbar. Nachteilig sind neben dem immensen logistischen Aufwand zur Haltung und Versuchsdurchführung auch die oft wenig auf die einzelne Spezies standardisierten immunologischen Methoden. Hier bieten Kleintiermodelle Vorteile. In Rattenmodellen konnten jüngst die proinflammatorische Stimulation von Alveolarmakrophagen in der Frühphase nach Thoraxtrauma [65] und erhöhte Gefäßpermeabilität nach Muskelverletzung nachgewiesen werden [16]. Das bereits gut erforschte Immunsystem der Maus ermöglicht eine Vielzahl von Untersuchungen. Physiologische Abläufe zu steuern oder gar zu beeinflussen ist

hingegen aufgrund der Größenverhältnisse aufwendig. In der Vergangenheit konnten in Modellen mit berührungsloser Druckwellenverletzung nahezu isolierte Lungenkontusionen erzeugt und deren inflammatorische Veränderungen untersucht werden [56, 57, 87].

In der Literatur wurde immer wieder die Schwierigkeit betont, den hämorrhagischen Schock tierexperimentell sinnvoll und klinisch relevant nachzuvollziehen [25]. Dies liegt wohl an den, beim realen Patienten immer mitbeteiligten, vielfältigen Begleitmechanismen wie Hypothermie, Koagulopathie, Azidose, begleitendem Gewebetrauma, usw. [25]. Die Modelle lassen sich in drei Kategorien einteilen: Modelle mit einem festgelegten Blutdruckwert, Modelle mit einem festgelegten Blutverlust und Modelle mit unkontrollierter Blutung [25]. Auch wenn letzterer Ansatz definitiv den Verhältnissen beim real Verletzten am nächsten kommt und sich somit für Interventionsstudien eignet, ist er wegen den hohen Letalitätsraten und der geringen Standardisierbarkeit weniger praktikabel, wenn es um die grundlegende Erforschung pathobiochemischer Zusammenhänge geht. Studien an der Maus konnten in der Vergangenheit bereits immunologische Veränderungen nach isoliertem oder kombiniertem Blutungsschock zeigen [2, 55]. Bei der Maus handelt es sich somit um ein etabliertes Versuchstier.

## **1.6 Zielsetzung der Studie**

Lungenkontusion und hämorrhagischer Schock sind zwei entscheidende Pathomechanismen, die das Outcome des Polytraumapatienten bestimmen [46]. Zielsetzung der Studie war es, ein nicht letales Kombinationsmodell dieser Verletzungen zu entwickeln und mit den einzelnen Verletzungen zu vergleichen [96].

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tierversuch**

#### 2.1.1 Versuchstiere

##### 2.1.1.1 Tierauswahl

Für alle Tierversuche wurden männliche C3H/HeNCrl-Mäuse (Charles River, Sulzfeld) mit einem Alter von 8-9 Wochen und einem Gewicht von circa 25 g verwendet. Die Tiere wurden in den Ställen der Bereichstierhaltung Safranberg des Tierforschungszentrums Ulm gehalten. Die Haltung erfolgte zu maximal 10 Tieren pro Käfig bei einer Raumtemperatur von 21 °C. Die Hell-Dunkel-Phasen wurden in einen zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus eingeteilt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Das Futter bestand aus der standardisierten Versuchstiernahrung Altromin<sup>®</sup>-1314-Forti (Altromin, Lage-Lippe). Die Tierversuche wurden ausschließlich in den Räumen der Bereichstierhaltung Safranberg durchgeführt.

##### 2.1.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Als Ausschlusskriterien wurden herangezogen:

1. Tiere mit Infektionen und Abszessen, die vor, während oder nach dem Versuch augenscheinlich wurden.
2. Tiere mit posttraumatischer Perikardtamponade, intrathorakaler oder intraabdomineller Blutungen, welche zu einem zusätzlichen, unkontrollierten Blutverlust, respektive zur Hypotension führten.

##### 2.1.1.3 Gruppeneinteilung

Die Versuchstiere werden in folgende vier Gruppen eingeteilt:

###### 1. Kontrolltiere:

Die Tiere dieser Gruppe wurden in Narkose gelegt und beidseits femoralarteriell kanüliert. Atmung und Herzkreislauffunktion wurden drei Stunden lang protokolliert. 20 Stunden nach Beobachtungsbeginn wurden die Tiere getötet, ihre Organverletzungen makroskopisch begutachtet und Gewebeproben für die sich anschließenden Untersuchungen gewonnen.

## 2. Tiere mit Thoraxtrauma (TXT):

Die Tiere wurden analog den Kontrolltieren behandelt, erhielten aber bei Beobachtungsbeginn zusätzlich ein stumpfes Thoraxtrauma.

## 3. Tiere mit blutdruckkontrolliertem, hämorrhagischem Schock (HÄM):

Die Tiere wurden analog den Kontrolltieren behandelt, bei Beobachtungsbeginn wurde zusätzlich ein blutdruckkontrollierter, hämorrhagischer Schock induziert.

## 4. Tiere mit Thoraxtrauma und blutdruckkontrolliertem, hämorrhagischem Schock (TXT+HÄM):

Die Tiere wurden analog den Kontrolltieren behandelt und erhielten bei Beobachtungsbeginn zusätzlich sowohl ein stumpfes Thoraxtrauma als auch anschließend einen blutdruckkontrollierten, hämorrhagischen Schock.

### 2.1.1.4 Genehmigung der Tierversuche

Alle durchgeführten Tierversuche wurden durch die zuständige Behörde im Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Versuchsnummer: 697).

## 2.1.2 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau gliederte sich in die drei folgenden Systeme:

1. Druckwellengenerator, der zur Auslösung des Thoraxtraumas benötigt wurde, mit der Druckwellenmessvorrichtung
2. Narkosesystem mit Spülmaske
3. Blutdruckmesssystem für die invasive Blutdruck- und Pulsmessung

### 2.1.2.1 Druckwellengenerator

Das Thoraxtrauma wurde durch eine Druckwelle ausgelöst, welche von einem Druckwellengenerator (Wissenschaftliche Werkstatt für Feinwerktechnik der Universität Ulm, Ulm) erzeugt wurde [47, 49]. Dieses, erstmals für den Einsatz an Ratten entwickelte Gerät, wurde bereits durch die eigene Arbeitsgruppe auf die Anwendung bei Mäusen modifiziert [56]. Der Druckwellengenerator (Abb. 1) setzte sich aus zwei Zylindern zusammen, wobei der obere Zylinder die Druckkammer darstellt, der untere Zylinder zur Fokussierung der Druckwelle dient. Er war an

einer Seite mit einem Verbindungsstück zu einer Gasleitung versehen und an der anderen Seite offen.

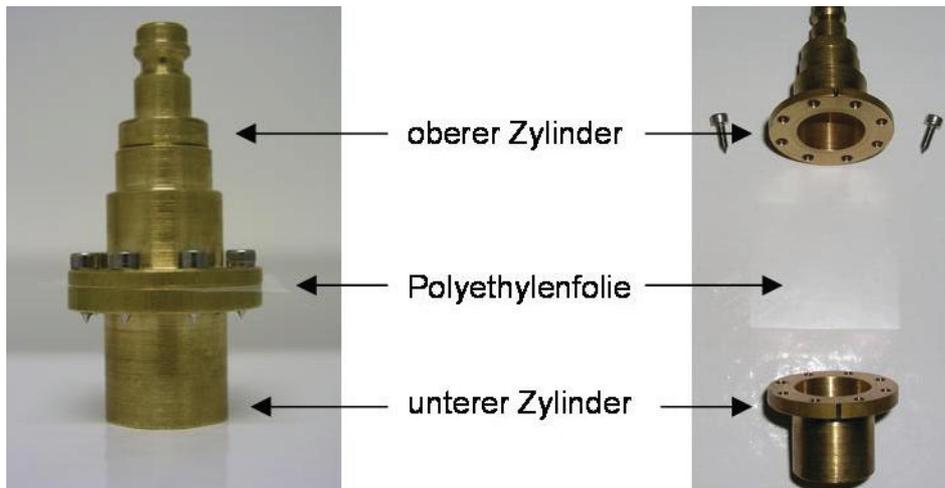


Abb. 1: Druckwellengenerator, zusammgebaut (links) und zerlegt (rechts)

Der untere offene Zylinder hatte eine Länge von 2 cm und einen Innendurchmesser von 1,6 cm. Die beiden Zylinder waren fest miteinander verschraubt. Dazwischen war eine Polyethylenfolie der Stärke 50 µm (Du Pont de nemours, Bad Homburg) eingespannt, so daß die Hohlräume der beiden Zylinder voneinander getrennt waren. Der Generator war in eine für diesen Zweck angefertigte, in der Höhe exakt verstellbare Haltevorrichtung (Werkstatt des Universitätsklinikums am Safranberg, Ulm) eingespannt (Abb. 2).

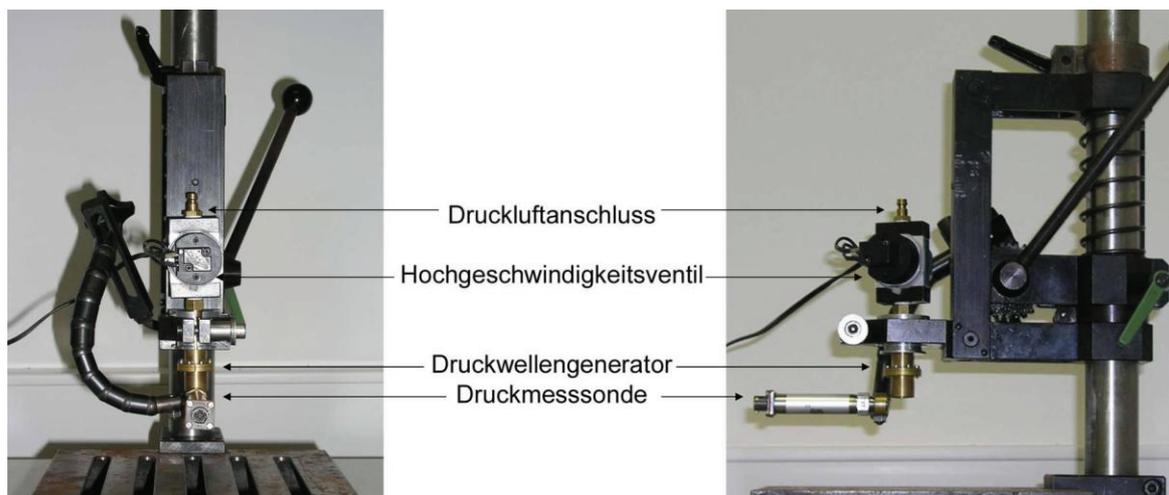


Abb. 2: Druckwellengenerator und Druckmesssonde in der Haltevorrichtung, Ansicht von vorne (links) und seitlich (rechts)

Der Druckwellengenerator war in den folgenden Experimenten mit der Öffnung des Unterteiles auf die Versuchstiere gerichtet. Dabei bildete sich der vordere

Rand des Druckwellengenerators auf das kaudale Ende des Processus xiphoideus ab und der Mittelpunkt der Austrittsöffnung stand zentral über der Sternummitte. Zwischen Unterkante des Druckwellengenerators und dem Mäusethorax wurde ein Abstand von 1,5 cm gewählt. Das Verbindungsstück wurde über ein elektronisch auslösbares Hochgeschwindigkeitsdruckluftventil Hee-D-24 (Festo, Esslingen) an eine Druckluftflasche für Atemzwecke (MTI, Eichingen) mit Druckminderer (Zinser, Ebersbach/Fils) angeschlossen. Damit wurde ein Arbeitsdruck am Ventil von 13 bar eingestellt. Zur Messung der Druckwelle wurde der Druckaufnehmer OMEGA 100 psi (Newport Omega, Deckenpfronn) senkrecht zur Austrittsrichtung des Druckwellengenerators und unmittelbar unter der unteren Zylinderöffnung angebracht. Diese Messsonde wurde an die serielle Schnittstelle eines Computers angeschlossen, an dem die Auswertung mittels der Messsoftware DasyLab 5.5 (Datalog, Mönchengladbach) erfolgte. Durch einen Gleichstromimpuls wurde das Hochgeschwindigkeitsventil geöffnet. Der Druck im Oberteil des Druckwellengenerators stieg dabei an, bis die Berstspannung der Polyethylenfolie erreicht war. Nach Überschreiten dieses Druckes kam es zum schlagartigen Zerreißen der Folie in Richtung Unterteil, was zur Entstehung einer Druckwelle führte, die durch die Austrittsöffnung des Unterteiles entwich.

#### 2.1.2.2 Narkosesystem

Zur Narkose der Versuchstiere wurde eine Sevofluraninhalationsanästhesie mit Sevofluran<sup>®</sup> (Abbott, Wiesbaden) über eine Spülmaske in Kombination mit der subkutanen Injektion von Temgesic<sup>®</sup> (Wirkstoff: Buprenorphin, Böhringer-Mannheim, Mannheim) verwendet. Die Narkose erfolgte mittels einer Spezialmaske (Werkstatt des Universitätsklinikums am Safranberg, Ulm), welche den Kopf der Versuchstiere vollständig umschloss. Sie wurde über einen Rotameter<sup>®</sup>-Gasflussminderer (Drägerwerk AG, Lübeck) mit einem Liter medizinischem Sauerstoff (Westfalen, Münster) pro Minute gespeist. Zur Narkoseeinleitung wurde über den Narkosegasverdampfer Vapor Typ 19.3 (Drägerwerk AG, Lübeck) dem Frischgasfluss ein Volumenanteil von 4 % Sevofluran beigemischt. Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie waren Werte zwischen 2 und 2,5 % ausreichend. Den so narkotisierten Tieren wurde daraufhin zur Analgesie 10 µg pro kg KG Temgesic<sup>®</sup> subkutan injiziert.

### 2.1.2.3 Messung der Vitalparameter

Blutdruck und Puls wurden bei den Versuchstieren invasiv in der Arteria femoralis gemessen. Dazu wurde ein Polyethylenschlauch (SIMS Portex Ltd., Kent, Großbritannien) mit dem Innendurchmesser 0,28 mm und einem Außendurchmesser 0,61 mm mit einer Länge von 10 cm verwendet. Dieser wurde an einem Ende zu einer Spitze gedehnt und an seinem anderen Ende über eine Microlance-3<sup>®</sup>-Kanüle Nr.20 (Becton Dickinson, Heidelberg) gestülpt. Der so hergestellte Arterienkatheter wurde an eine 1 ml-Spritze angeschlossen, die der Füllung und Spülung mit Ringer-Lösung (Baxter, Unterschleißheim) diente. Nach dessen Platzierung wurde der Katheter an ein mit Ringer-Lösung gefülltes Druckübertragungssystem mit Gummimembran (Medex Medical, Ratingen) angeschlossen. Der Drucküberträger wurde mit einem Druckaufnehmer MX900-13L9 (Medex Medical, Ratingen) gekoppelt, dessen Signale von einem Überwachungsmonitor Servomed<sup>®</sup> (Hellige, Breisgau) verarbeitet wurden. Neben der arteriellen Druckkurve konnten der arterielle Mitteldruck und die Herzfrequenz direkt abgelesen werden. Die Atemfrequenz der Tiere innerhalb einer Minute wurde zu den vorbestimmten Messzeitpunkten mittels Auszählen und Stoppuhr ermittelt.

### 2.1.3 Hauptversuch

#### 2.1.3.1 Versuchsablauf

Pro Versuchstag wurden pro Gruppe jeweils ein Tier, also insgesamt vier Tiere behandelt. Alle Tiere wurden gewogen, in Narkose gelegt und in Rückenlage auf einer Plexiglasplatte gelagert. Die abgespreizten Extremitäten wurden mittels Pflasterstreifen fixiert. Danach wurde ein Katheter in die linke Arteria femoralis eingeführt, um eine Blutdruck- und Pulsmessung zu ermöglichen, ein weiterer in die kontralaterale Arteria femoralis, um Blutentnahme und Infusion zu ermöglichen. Im Folgenden wurden zu festgelegten Zeitpunkten Puls, Blutdruck und Atemfrequenz der Tiere bestimmt und festgehalten. Es erhielten nun die Tiere der TXT- und der TXT+HÄM-Gruppe ein Thoraxtrauma, die Tiere der HÄM- bzw. der TXT+HÄM-Gruppe einen Blutverlust. Es folgte eine dreistündige Beobachtungszeit, in der die unmittelbaren physiologischen Reaktionen der Versuchstiere auf das Thoraxtrauma aufgezeichnet wurden. Die Gefäßkatheter wurden entfernt,

die entsprechenden Gefäße ligiert und die Insertionsstellen mittels Hautnaht adaptiert. Nach Ausleitung der Narkose erwachten die Tiere und wurden zurück in ihre Käfige verbracht. Nach zwölf Stunden erhielten alle Tiere eine erneute subkutane Injektion mit 10 µg pro kg KG Temgesic®. Zwanzig Stunden später wurden die Tiere durch Überdosierung einer erneuten Inhalationsanästhesie getötet, die thorakalen und abdominalen Organe wurden makro- bzw. operationsmikroskopisch begutachtet. Es schloss sich die Probengewinnung für weiterführende Untersuchungen an.

#### 2.1.3.2 Kathetereinlage

In Narkose wurde das Fell der Tiere an beiden Oberschenkeln und im Thoraxbereich rasiert. Nach Hautschnitt an der Innenseite des linken Oberschenkels und stumpfer Präparation wurde unter Sicht mit dem Operationsmikroskop OpMi-1 (Zeiss, Oberkochen) der Gefäß-Nerven-Strang dargestellt. In mikrochirurgischer Technik wurde die Arteria femoralis auf einer Länge von 5 mm dargestellt und zwei 5/0 Prolene®-Ligaturen (Ethicon, Brüssel) proximal und distal vorgelegt. Zur Dilatation des Gefäßes wurde ein Tropfen Xylocain 2 % (Astra Chemicals, Wedel) aufgetragen. Nach Eröffnung des Gefäßlumens mit einer Kanüle Nr. 20 wurde der Polyethylenkatheter fünf Millimeter nach proximal vorgeschoben. Die vorgelegten Ligaturen wurden verknotet, der Katheter fixiert und an die oben beschriebene Messeinrichtung angeschlossen. Im selben Verfahren wurde das andere Bein kanüliert, um die Blutabnahme und Infusion von Ringerlösung durchführen zu können.

#### 2.1.3.3 Behandlung der Trauma- und der Hämorrhagie-Tiere

Zur Auslösung des Thoraxtraumas wurden die Tiere der TXT- und TXT+HÄM-Gruppe unter dem Druckwellengenerator zentriert. Dabei bildete sich der vordere Rand des Druckwellengenerators auf die knöcherne Unterkante des Sternums ab und der Mittelpunkt der Austrittsöffnung stand zentral über der Sternummitte. Zwischen Unterkante des Druckwellengenerators und dem Mäusethorax wurde ein Abstand von 1,5 cm gewählt. Diese Konfiguration gewährleistete ein schweres, bilaterales Thoraxtrauma mit ausgesprochen geringer Frühletalität der Tiere [56].

Nach Beendigung dieser Vorbereitungen wurden bei jedem Tier die Ausgangswerte der Vitalparameter (siehe unten) ermittelt. Die Druckwelle wurde über das elektronische Hochgeschwindigkeitsventil in Inspirationsstellung des Tieres ausgelöst. Die Daten der Druckmesssonde wurden im Computer für spätere Auswertungen als Druck-Zeit-Diagramm gespeichert. Direkt nach Auslösung des Thoraxtraumas wurde die Narkose nach Verabreichung des Analgetikums beendet und es begann ein 180 Minuten dauernder Beobachtungszeitraum. Währenddessen erhielten die nun wachen Tiere zusätzlich zur langdauernden Analgesie mit Buprenorphin tropfenweise Lokalanästhesie mit Xylocain 2 % auf die Kathetereinlagestellen. Der Blutungsschock wurde nach folgendem, bereits bewährten Verfahren induziert [54, 103]: Tieren der Gruppen HÄM und TXT+HÄM wurde zwei Minuten nach Beobachtungsbeginn über eine 1ml-Spritze, die am Katheter des rechten Beines angeschlossen war soviel Blut entnommen, dass am Monitor ein Blutdruck von 35 mmHg abzulesen war. Dieser Wert wurde durch ständige Nachentnahme mit der Spritze über eine Stunde gehalten. Unmittelbar nach Ablauf dieser Zeit wurde die entnommene Blutmenge abgelesen und verworfen. Anstatt dieser Spritze wurde nun eine 10ml-Einwegspritze konnektiert, in der die vierfache Menge des entnommenen Blutvolumens in Form von Ringerlösung aufgezogen war. Diese Infusionsspritze wurde in den Perfusor-Programm-1 (Becton Dickinson, Heidelberg) eingespannt und der Inhalt über eine Stunde infundiert.

#### 2.1.3.4 Kontrolltiere

Bei den Kontrolltieren wurden ebenfalls in Narkose beidseits Katheter eingelegt, es wurde aber weder Blut abgenommen noch Ringer-Lösung infundiert. Der Druckwellengenerator wurde über diesen Tieren zentriert, das Druckwellentrauma jedoch nicht ausgelöst.

#### 2.1.3.5 Abfolge der Messzeitpunkte

Die Vitalparameter aller Tiere wurden eine halbe Minute vor und nach dem Thoraxtrauma bestimmt. Die weiteren Messungen erfolgten alle 60 Sekunden von der ersten bis zur zehnten Minute nach Trauma. Danach lag der Abstand der Messungen bis zum Ende der Beobachtungsdauer bei 10 Minuten.

#### 2.1.3.6 Beobachtungsende

Nach Ende der dreistündigen Beobachtungszeit wurden die Tiere aller Gruppen erneut in Narkose gelegt. Beide Femorararterienkatheter wurden entfernt und die Gefäße ligiert. Die Wunden wurde jeweils mit einer fortlaufenden Hautnaht mit 5/0-Prolene<sup>®</sup>-Faden verschlossen. Nach erneutem Erwachen wurden die Tiere in ihren Käfig verbracht. Zwölf Stunden nach Trauma erhielten alle Tiere eine erneute subkutane Injektion mit 10 µg pro kg KG Temgesic<sup>®</sup>.

#### 2.1.3.7 Probengewinnung

Zwanzig Stunden nach Induktion des Traumas wurden die Tiere getötet. Dies geschah durch Überdosierung der Sevoflurannarkose. Nach vollständigem Erlöschen der Atembewegungen erfolgte die mediane Thorakotomie. Zur Blutabnahme wurde eine 1 ml-Spritze, vorgefüllt mit 0,05 ml Heparin-Natrium (Braun, Melsungen) und mit aufgesteckter 27 G-Kanüle verwendet. Damit wurde der rechte Herzventrikel punktiert und etwa 1,2 ml Blut entnommen. Die Blutproben wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) abgefüllt und auf Eis gelagert. Unter operationsmikroskopischer Sicht wurden nun zunächst die von frontal und dorsal erkennbaren Lungenhämorrhagien, jeweils nach Lobus getrennt, prozentual eingeschätzt. Nun wurde die Lunge mittels mikrochirurgischer Schere und Pinzette entnommen und nach Seiten getrennt. Beide Lungenflügel wurden jeweils in einem 2 ml-Reaktionsgefäß bei -80 °C eingefroren. Nun laparotomierten wir die Tiere median und begutachteten anschließend makroskopisch die Abdominalorgane. Die Milz wurde vom anliegenden Fettgewebe befreit und hilusnah abgesetzt. Sie wurde für das weitere Vorgehen in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) mit 2 ml eisgekühlter PBS-Lösung (Gibco Life Tech., Karlsruhe) zwischengelagert. Die großen thorakalen Gefäße wurden zwerchfellnah abgeklemmt. Es folgte die Punktion der Vena cava inferior mittels Perfusionsbesteck mit 21 G-Butterflykanüle (Dispomed, Witt) in Höhe der Nierenarterienabgänge. Die Kanülenpitze wurde bis zur Leberpforte vorgeschoben und mittels spitzer Pinzette die Hohlvene wieder abgedichtet. So konnte das Gefäßsystem der Mäuseleber zunächst mit einer 20 ml fassenden Spritze mit PBS-Lösung gespült werden, um es von Restblut zu befreien. Im Anschluß daran wurde die Leber mit 10 ml einer 0,075%-igen Kollagenase-Typ IV-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) in kalzium- und

magnesiumfreiem Hank's-Medium (Gibco Life Tech., Karlsruhe) perfundiert. Nach Abpräparation der Gallenblase, welche verworfen wurde, konnte die Leber hilusnah abgesetzt werden. Sie wurde in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen, gefüllt mit 5 ml der o.g. Kollagenaselösung, auf Eis zwischengelagert.

## **2.2 Bestimmungen nach Versuchsende**

Alle Arbeitsschritte der Abschnitte 2.2.1, 2.2.2 und 2.2.3, bei denen Zellkulturgefäße geöffnet werden mussten, wurden in Reinluftatmosphäre einer Sicherheitswerkbank Heraeus Herasafe KS (Kendro, Langenselbold) durchgeführt.

Desweiteren wurden folgende Kulturmedien angesetzt und wie folgt bezeichnet:

### **RPMI+:**

Einer handelsüblichen 500 ml-Flasche RPMI-Medium (Gibco Life Tech., Karlsruhe) wurden 27,5 mg Gentamicin (Gibco Life Tech., Karlsruhe), 5,5 ml einer Penicillin-Streptomycin-Mischung (Gibco Life Tech., Karlsruhe) und 55 ml hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Biochrom AG, Berlin) zugegeben.

### **DMEM+:**

Einer handelsüblichen 500 ml-Flasche Dulbecos modified eagle Medium (Gibco Life Tech., Karlsruhe) wurden 0,5 ml Gentamycin, 5,5 ml Penicillin-Streptomycin und 55 ml hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum FCS zugegeben.

### **DMEM-:**

Einer handelsüblichen 500 ml-Flasche Dulbecos modified eagle Medium wurden 0,5 ml Gentamycin und 5,5 ml Penicillin-Streptomycin zugegeben.

## **2.2.1 Blut**

Die in Abschnitt 2.1.3.7 gewonnenen Blutproben wurden in den 2 ml-Reaktionsgefäßen bei 16.000 x g für 10 Minuten in der auf 4 °C gekühlten Mikroliterzentrifuge Heraeus Biofuge fresco (Kendro, Langenselbold) zentrifugiert.

Der Plasmaüberstand wurde abpipettiert und bei -80 °C eingefroren. Aus dem übrig gebliebenen Blutzellsediment wurden analog dem Vorgehen von Schwacha et al. [95] die mononukleären Zellen (PBMCs) isoliert. Nach Resuspension in Hank's-Medium wurden diese jeweils in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) über 3 ml des Dichtegradientenmediums Nycoprep 1.007A (Nycomed, Oslo/Norwegen) überschichtet. Es schloss sich nun die Zentrifugation der Röhrchen für 30 Minuten bei  $350 \times g$  und Raumtemperatur in einer Heraeus Varifuge K (Kendro, Langenselbold) an. Die nun zwischen Blut und Medium abgetrennten Zellen wurden mittels steriler Transferpipette (Becton Dickinson, Heidelberg) abgesaugt und jeweils in ein neues 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Resuspension der Zellen in Hank's-Medium und erneuter fünfzehnminütiger Zentrifugation bei  $350 \times g$  und 4 °C folgte die hypotone Lyse der enthaltenen Erythrozyten. Dazu wurde der Überstand jedes Röhrchens verworfen und das Blutzellpellet mit 1,8 ml Aqua dest. resuspendiert. Die daraus resultierende Hämolyse wurde nach fünf Sekunden durch Zugabe von 200 µl zehnfach-konzentrierter PBS-Lösung gestoppt. Nach Auffüllen jedes Röhrchens mit Hank's-Medium folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei  $350 \times g$  und 4 °C für die Dauer von 15 Minuten. Schließlich wurde der Überstand wieder verworfen und die nun mehrfach gereinigten polymorphkernigen Zellen mit 0,95 ml des RPMI+-Mediums resuspendiert. Die hierin enthaltene Zellzahl wurde durch mikroskopische Zählung der mit Trypan-Blau (Sigma-Aldrich, Steinheim) gefärbten Zellen in einer geeichten Neubauerzählkammer (Merck, Darmstadt) ermittelt. Somit wurde nun für jede der Zellsuspensionen das benötigte Verdünnungsvolumen berechnet, um eine einheitliche Zellkonzentration von  $10^6$  Zellen/ml der Proben herzustellen und dieses in Form von RPMI+ zugegeben. Die nun gleich konzentrierten Zellsuspensionen jedes Einzeltieres wurden in die Wells mehrerer steriler 24er-Mikrotiterplatten (Becton Dickinson, Heidelberg) verteilt. Sie wurden im Folgenden mit 1 µg/ml Lipopolysaccharid (Sigma-Aldrich, Steinheim) in RPMI+-Medium stimuliert. Nach anschließender 48-stündiger Inkubationszeit in einem Heraeus Heracell Brutschrank (Kendro, Langenselbold) bei 37 °C und 5 % Kohlendioxidkonzentration wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und durch fünfzehnminütige Zentrifugation bei 4 °C mit  $350 \times g$  von Zellresten befreit. Die gewonnenen Überstände konnten nun bei -80 °C für die späteren Zytokinmessungen eingefroren werden.

## 2.2.2 Leber

Aus den Lebern der Tiere wurden, wie von Angele et al. [4] bereits beschrieben, die Kupffer-Sternzellen isoliert. Die in eisgekühlter Kollagenaselösung aufbewahrten Mäuselebern wurden in Petrischalen umgefüllt und mit jeweils einer separaten, sterilen Schere sehr klein geschnitten. Danach wurden die Schalen nacheinander zehn Minuten lang in den Brutschrank bei 37 °C gestellt, um die weitere Zersetzung des Bindegewebes zu beschleunigen. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit Auslaufpipetten der Größen 25 ml und 10 ml (Becton Dickinson, Heidelberg) wurde der Brei zunehmend dünnflüssiger und konnte schließlich über ein steriles Kunststoffzellsieb der Porengröße 100 µm (Becton Dickinson, Heidelberg) in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen abfiltriert werden. Es folgten zwei Reinigungsschritte, die jeweils fünfzehn Minuten Zentrifugation aller Röhrchen bei 350 × g und 4 °C, Verwerfen des Überstandes und Resuspension der Zellpellets mit Hank's-Medium beinhalteten. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wurde jedes Pellet in 6 ml DMEM+ resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde über 5 ml des Dichtegradientenmediums Metrizamide (Sigma-Aldrich, Steinheim) geschichtet. Es schloss sich die Zentrifugation bei 875 x g, 4 °C und 45 Minuten an. Die abgetrennten Kupffer-Sternzellen fanden sich nun direkt über der Metrizamideschicht und wurden mittels 10 ml-Auslaufpipette (Becton Dickinson, Heidelberg) abgesogen. Diese wurden dann zu Reinigung zweimal in DMEM+ resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun konnte jedes Kupffer-Sternzellpellet in 0,95 ml DMEM+ resuspendiert und anschließend wie in 2.2.1 die Zellzahl bestimmt werden. Auch hier wurde ein geeignetes Verdünnungsvolumen an DMEM+ berechnet um eine Konzentration aller Zellkulturen von je  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml zu erreichen. Die eingestellten Zellsuspensionen pipettierte man zu je einem Milliliter in die Vertiefungen einer 24er-Mikrotiterplatte. Nach drei Stunden Inkubation der Platte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> konnten alle Zellen, die noch nicht an die Kunststoffwandungen der Wells adhärent waren, durch einmaliges Waschen mit DMEM- entfernt werden. Daraufhin wurde jeweils 1 µg/ml Lipopolysacharid in DMEM+ zur Stimulation zupipettiert und die Platten für 24 Stunden wieder in o.g. Atmosphäre inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden alle Zellkulturüberstände abgenommen und fünfzehn Minuten lang bei 350 x g und 4 °C zentrifugiert. Der nun erhaltene Überstand wurde für die folgenden Messungen bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.3 Milz

Die Milz wurde nach dem von Zellweger et al. [111] beschriebenen Verfahren zur Isolation der dort ansässigen Makrophagenpopulation benutzt. Die in 4 °C kalter PBS-Lösung gelagerten Milzen wurden jeweils in eine Petrischale mit dem Durchmesser 60 mm (Becton Dickinson, Heidelberg) gegossen. Sie wurden zwischen den rauen Matträndern zweier handelsüblicher Objektträger (Firma Menzel-Glaser, Braunschweig) eingeklemmt und zerrieben. Der übrig bleibende Kapselsack wurde verworfen, das in der Schale gesammelte verflüssigte Milzparenchym wurde in PBS-Lösung suspendiert und in 50 ml-Zentrifugenröhrchen abgefüllt. Diese wurden nun bei 350 × g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert, danach die Überstände verworfen. Die in den übrig gebliebenen Zellpellets enthaltenen Erythrozyten wurden analog 2.2.1 lysiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit PBS-Lösung, Abzentrifugation der Zellen bei 350 × g, 4 °C für 15 Minuten, Verwerfen des Überstandes und anschließender Resuspension in jeweils 2 ml RPMI+. Wie in 2.2.1 beschrieben, wurden auch die Zellzahlen der Splenozyten und Milzmakrophagen pro ml mittels Neugebauer-Zählkammer bestimmt und durch Zugabe von RPMI+ eine einheitliche Konzentration von 10<sup>7</sup> Zellen pro ml Probe eingestellt. Die Zellsuspensionen wurden milliliterweise auf eine 24er-Mikrotiterplatte verteilt. In einer zweistündigen Wartephase bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Makrophagen an den Platteninnenwänden adhären. Durch anschließendes zweimaliges Waschen mit DMEM- wurden die restlichen, nicht-adhären Milzzellen entfernt. Zur nachfolgenden Stimulation wurde 1 µg/ml Lipopolysacharid in DMEM+ zugegeben. Nach zweitägiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und durch zehnmünütige Zentrifugation mit 350 × g bei 4 °C gereinigt. Die Überstände wurden bei -80 °C für die späteren Zytokinmessungen eingefroren.

### 2.2.4 Zytokinmessung mittels ELISA

Im Folgenden wurden die Konzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 im Blutplasma und in den Kulturüberständen von PBMC, Kupffer-Sternzellen und Milzmakrophagen mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest, kurz ELISA

bestimmt. Die hierzu verwendeten OptEIA<sup>®</sup>-Sets (PharMingen, Heidelberg) für Mäuse wiesen folgende Spezifikationen auf:

Sensitivität:	15,6 - 1000 pg/ml für TNF- $\alpha$ und IL-6 31,3 - 2000 pg/ml für IL-10
Spezifität:	keine Kreuzreaktion mit rekombinanten Mäuszytokinen vom Typ: Typ IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-12(p70), IL-15, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, MCP-1, TCA-3 sowie TNF- $\alpha$ bei den Assays für IL-6 und IL-10 IL-6 bei den Assays für TNF- $\alpha$ und IL-10 IL-10 bei den Assays für TNF- $\alpha$ und IL-6
Coatingbuffer:	TNF- $\alpha$ und IL-10: 0,2 M Natriumphosphat, pH 6,5 11,8 g Dinatriumhydrogenphosphat 16,1 g Natriumdihydrogenphosphat q.s. für einen Liter, pH 6,5  IL-6: 0,1 M Natriumcarbonat, pH 9,5 8,40 g Natriumhydrogencarbonat 3,56 g Dinatriumcarbonat q.s. für einen Liter, pH 9,5

Die jeweiligen Capture-Antikörper wurden nach Herstellerangaben mit Coating-Buffer verdünnt, 100  $\mu$ l-weise in die Vertiefungen einer C96er-Maxisorp-Mikrotiterplatte (NUNC, Wiesbaden) pipettiert und 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem maschinellm Waschen der Platten mit Waschpuffer (8,0 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 1,5 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat, 0,4 g Kaliumdihydrogenphosphat und 0,5 g Tween 20 in 1.000 ml Aqua bidest. auf pH 7,0 eingestellt) wurden dieselbigen auf ein Papierhandtuch ausgeschlagen. Daraufhin wurde pro Well 200  $\mu$ l Assay diluent (PharMingen, Heidelberg) zupipettiert um unspezifische Bindungen der Antikörper zu blockieren. Die Platten

wurden erneut abgeklebt und diesmal 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Platten dreimal gewaschen und trocken geschlagen. Es wurden dann entweder die Standards (PharMingen, 1.000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml und 15,6 pg/ml, mit assay diluent verdünnt) oder die Proben in der jeweiligen Verdünnung auf die Platten immer doppelt aufpipettiert. Nach erneutem Abkleben erfolgte wieder eine 24stündige Inkubation bei 4 °C. Am nächsten Tag erfolgte nach fünfmaligem Waschen der Platten mit Waschpuffer die 30minütige Inkubation aller Platten mit einem Gemisch aus fertigem Enzymreagenz und dem jeweiligen detection antibody (beide PharMingen, Heidelberg). Dann wurden die Platten sieben Mal gewaschen und 30 Minuten mit Tetramethylbenzidinsubstrat (PharMingen, Heidelberg) inkubiert. Nach dem Stoppen der Farbreaktion mittels 2 N Schwefelsäure wurde die Absorption der Proben bei 450 nm photometrisch bestimmt. Die Konzentrationen wurden durch die aus den Standards berechneten Eichgeraden ermittelt.

### **2.3 Statistik**

Die statistische Aufarbeitung des gewonnenen Zahlenmaterials geschah in Rücksprache mit dem Institut für Biometrie der Universität Ulm (Leiter: Prof. Dr. Rainer Muehe). Die Messwerte wurden auf Normalverteilung getestet. Es wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test (SNK) bzw. der t-test durchgeführt. Dabei wurde das Signifikanzniveau jeweils auf  $p < 0,05$  festgelegt. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse wurde mit den Programmen SigmaStat und SigmaPlot (beide SPSS Science, Chicago, USA) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Versuchstiere

Es wurden insgesamt 40 Tiere in die Studie aufgenommen (n=10 pro Gruppe). Die Tiergewichte (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte) lagen bei  $24,7 \pm 1,5$  g in der Kontrollgruppe,  $25,5 \pm 0,7$  g in der TXT-Gruppe,  $25,0 \pm 1,6$  g in der HÄM-Gruppe und  $25,8 \pm 0,8$  g in der TXT+HÄM-Gruppe. Es ergaben sich diesbezüglich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

#### 3.2 Druckwelle

Die Intensitäten der Druckwellen und deren Dauer wurden durch die senkrecht zu der Austrittsöffnung des Druckwellengenerators platzierte Druckmesssonde überwacht. Tabelle 1 zeigt Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Versuchstiergruppen, die ein Thoraxtrauma erhalten haben. Statistisch zeigten sich hier keinerlei signifikante Unterschiede zwischen Tieren die Thoraxtrauma alleine und solchen, die Thoraxtrauma und Schock erlitten hatten.

Tab. 1: Spitzendruck [bar] und Druckwellendauer [Millisekunden] bei C3H/HeNCrl-Mäusen mit alleinigem Thoraxtrauma (TXT) und Thoraxtrauma mit hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM), MW  $\pm$  SEM: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (n=10)

Gruppe	Spitzendruck [bar]	Dauer [ms]
	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM
TXT	$0,83 \pm 0,27$	$3,6 \pm 0,4$
TXT+HÄM	$0,75 \pm 0,16$	$3,3 \pm 0,5$

#### 3.3 Physiologische Parameter

##### 3.3.1 Atemfrequenz

Die Atemfrequenz wurde bei allen Tieren intermittierend ausgezählt und zu festgelegten Zeitpunkten dokumentiert. Abbildung 3 zeigt die dazugehörigen zeitlichen Verläufe. Außerdem sind darunter die jeweiligen Zeitpunkte farblich markiert, in denen Werte einer einzelnen Gruppe statistisch signifikant von den

Werten einer jeweils anderen Gruppe abwichen ( $p < 0,05$ ). Die Tiere mit Thoraxtrauma unterschieden sich neben den einzelnen Zeitpunkten bei 0,5, 100 und 140 Minuten auch in dem Bereich von der 40. bis zur 80. Minute signifikant von der Kontrollgruppe. Nach kurzer Apnoe bzw. Bradypnoe, atmeten die Traumatiere teilweise signifikant, teilweise nur tendenziell schneller als Tiere ohne Intervention. Die Atemfrequenzen der Kontrolltiere unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von denen der Tiere, die nur dem Schock unterzogen wurden. Eine Tendenz zu niedrigerer Frequenz während Schockinduktion und -aufrechterhaltung bei der HÄM-Gruppe ist aber offensichtlich. Bis auf einen einzigen Messzeitpunkt bei 0,5 Minuten zeigte der Vergleich zwischen Kontrolltieren und Tieren, die Trauma und Schock erlitten hatten, keine statistisch signifikanten Unterschiede. Tiere mit Thoraxtrauma hatten fast durchgehend höhere Atemfrequenzen als Tiere mit Schock. Statistisch signifikant waren die Unterschiede bei 0,5 Minuten, im Bereich von 30 bis 90 Minuten, bei der 100. und bei der 170. Minute. Ebenso hatten Tiere nach alleinigem Thoraxtrauma fast durchgehend höhere Atemfrequenzen als Tiere mit Trauma und Schock. Statistisch signifikant sind die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen im Bereich von der 40. bis zur 80. Minute, in der 100., der 140., der 160. und 170. Minute. Bis auf den Zeitpunkt 30 Sekunden nach Versuchsbeginn unterschieden sich Tiere mit alleinigem Schock nicht von Tieren mit zusätzlichem Thoraxtrauma. Tendenziell atmeten die Schocktiere während Schockinduktion und -aufrechterhaltung langsamer als Tiere der Kombinationsgruppe TXT+HÄM. Im Verlauf drehte sich dieses Verhältnis ab etwa der 110. Minute zugunsten tendenziell höherer Atemfrequenz bei den Schocktieren.

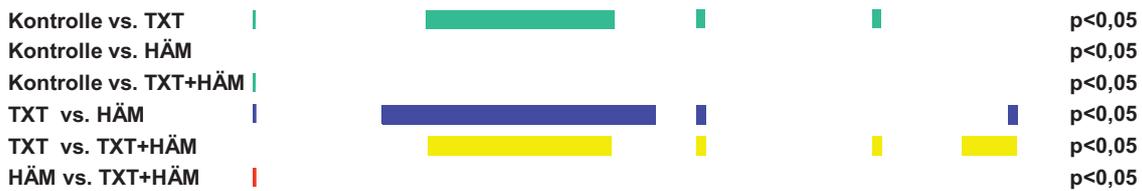
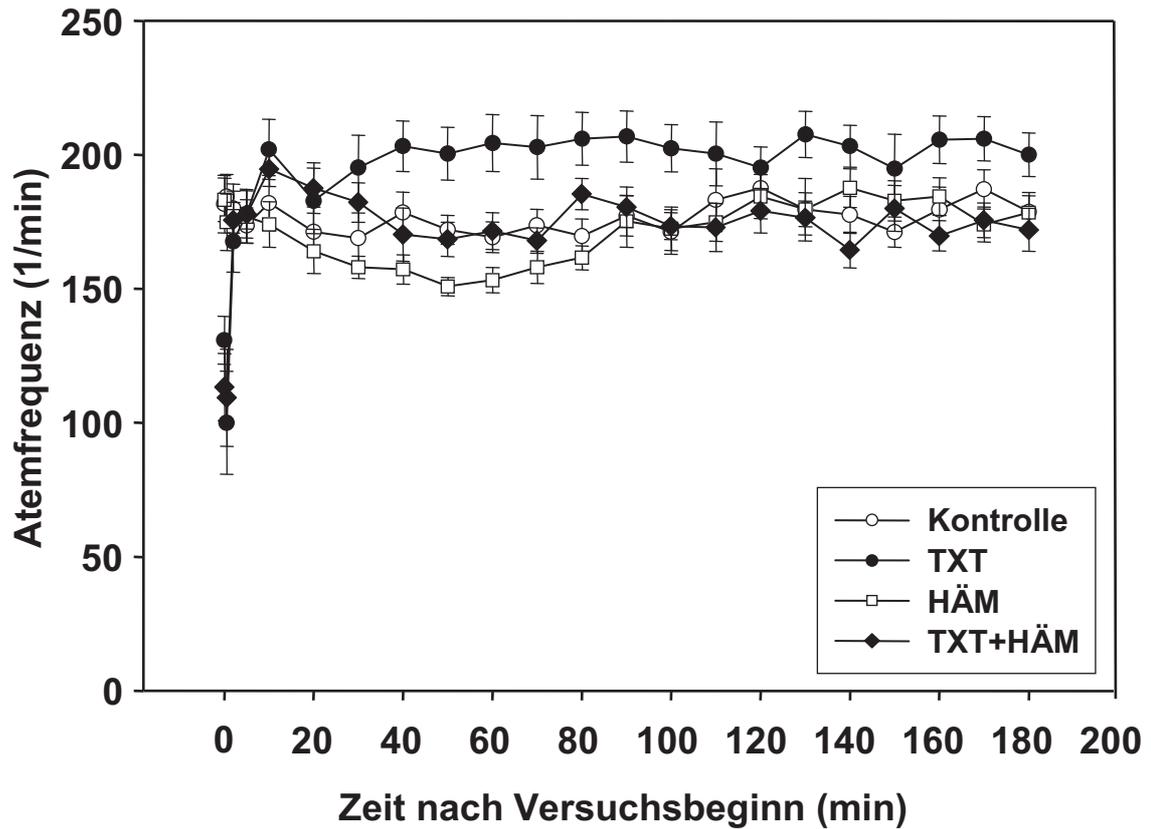


Abb. 3: Atemfrequenzen der Versuchstiere in Atemzügen pro Minute [1/min] zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Versuchsbeginn in Minuten [min]. C3H/HeNCrI-Mäusen wurden dabei der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10). Darunter farbig eingezeichnet die Bereiche mit statistisch signifikanten Unterschieden der Versuchstiergruppen untereinander, jeweils  $p < 0,05$  (einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test).

### 3.3.2 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz wurde bei allen Tieren kontinuierlich invasiv detektiert und zu festgelegten Zeitpunkten dokumentiert. Abbildung 4 zeigt die dazugehörigen zeitlichen Verläufe. Außerdem sind darunter die jeweiligen Zeitpunkte farbig markiert, in denen Werte einer einzelnen Gruppe statistisch signifikant von den Werten einer jeweils anderen Gruppe abwichen ( $p < 0,05$ ). Im Vergleich zur Kontrollgruppe hatten die Tiere aller anderen Gruppen während der ersten 130 Minuten signifikant niedrigere Herzfrequenzen. Die beiden Gruppen mit Thoraxtrauma blieben auch bis zum Versuchsende signifikant bradykarder, die HÄM-Gruppe nur tendenziell. Die Gruppen der TXT- und der HÄM-Tiere unterschieden sich zueinander wie folgt: TXT zunächst signifikant bradykarder bis zur 10. Minute, dann Frequenzbeschleunigung der TXT-Gruppe und -abfall der HÄM-Gruppe. Der Unterschied war ab der 40. Minute bis einschließlich der 70. Minute signifikant. Bei im Verlauf stagnierenden Werten der TXT-Tiere, stiegen die Herzfrequenzen der HÄM-Tiere wieder an und übertrafen sie ab der 160. Minute bis Versuchsende. Tiere mit Trauma und Blutverlust (TXT+HÄM) waren insgesamt fast durchwegs bradykarder als Tiere mit alleinigem Thoraxtrauma (TXT). Statistisch signifikant war dieser Unterschied im Bereich von Minute 40 bis 120. Im Vergleich zu den HÄM-Tieren waren die Tiere mit Trauma und Blutverlust zu Beginn bis einschließlich Minute 20 signifikant bradykarder. Im weiteren Verlauf der Phase der kontrollierten Hypotonie glichen sich die Herzfrequenzen kurz an. Nach Beendigung des Schocks stiegen die Herzfrequenzen beider Tiergruppen wieder an. In der TXT+HÄM-Gruppe fiel dieser Anstieg aber träger aus, so dass von Minute 80 bis zum Versuchsende die Herzfrequenzen signifikant niedriger blieben, als in der Gruppe der HÄM-Tiere.

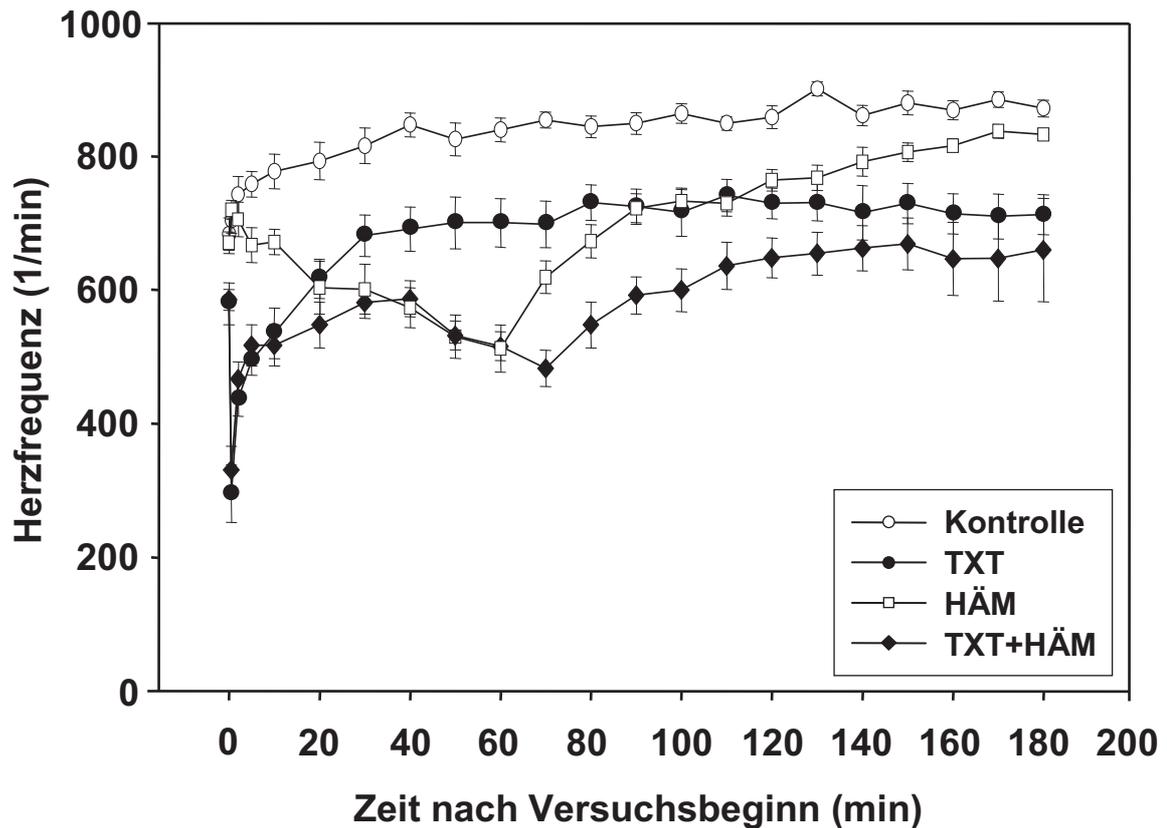


Abb. 4: Herzfrequenzen der Versuchstiere in Schlägen pro Minute [1/min] zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Versuchsbeginn in Minuten [min]. C3H/HeNCrI-Mäusen wurden dabei der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), darunter farbig eingezeichnet die Bereiche mit statistisch signifikanten Unterschieden der Versuchstiergruppen untereinander, jeweils  $p < 0,05$  (einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test).

### 3.3.3 Mittlerer arterieller Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck wurde bei allen Tieren kontinuierlich invasiv über einen femoralarteriellen Katheter überwacht und zu festgelegten Zeitpunkten dokumentiert. Abbildung 5 zeigt die dazugehörigen zeitlichen Verläufe. Außerdem sind darunter die jeweiligen Zeitpunkte farbig markiert, in denen Werte einer einzelnen Gruppe statistisch signifikant von den Werten einer jeweils anderen Gruppe abwichen ( $p < 0,05$ ). Die Blutdrücke aller drei Gruppen mit Trauma waren nach Beginn fortan bis zum Ende der Beobachtungsgruppe signifikant niedriger als die Kontrollgruppe. Tiere die nur eine Lungenkontusion erhalten hatten, wiesen bereits dreißig Sekunden nach Trauma signifikant tiefere Blutdruckwerte auf. Im Vergleich dazu fiel der Blutdruck bei den Tieren mit alleinigem Schock langsamer ab. Beide Gruppen hatten im Intervall von der dritten bis vierten Minute Werte die sich kaum unterschieden. Im Verlauf stieg der Blutdruck der Tiere mit alleinigem Thoraxtrauma schnell an, wobei die HÄM-Tiere durch Blutentnahme auf einem niederen Niveau gehalten wurden. Dieser Unterschied blieb im Bereich von der 5. bis zur 60. Minute statistisch signifikant, danach nicht mehr. Tiere die nur den Schock erlitten hatten verhielten sich trotz der Flüssigkeitssubstitution bis Versuchsende tendenziell hypotoner als Tiere mit Thoraxtrauma alleine. Tiere mit Thoraxtrauma und Schock hatten schon zu Versuchsbeginn bis zur 70. Minute signifikant niedrigere Blutdrücke als die Thoraxtraumatiere, danach glichen sie sich immer wieder an, ohne aber deren Niveau zu erreichen. Ab der 140. Minute waren die Kombinationstiere signifikant hypotoner, als Tiere die nur das Thoraxtrauma erhalten hatten. Im Vergleich zu Tieren mit alleinigem Blutverlust zeichneten sich die Tiere der Kombinationsgruppe TXT+HÄM in den ersten Minuten durch signifikant schlechtere Blutdruckwerte aus. Während der folgenden Stunde glichen sich beide Gruppen an. Im Bereich der siebzigsten Minute waren Tiere mit Schock alleine schon wieder signifikant hypertoner als Kombinationstiere. Letztere glichen ihre Blutdruckwerte dann zügig an, ohne das Niveau wirklich zu erreichen. Die dabei zunächst niedrigere Tendenz mündete ab der 140. Minute in signifikant hypotoneren Werten bis zum Schluss des Experimentes.

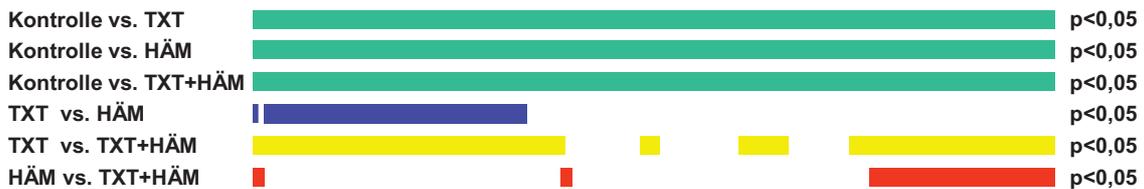
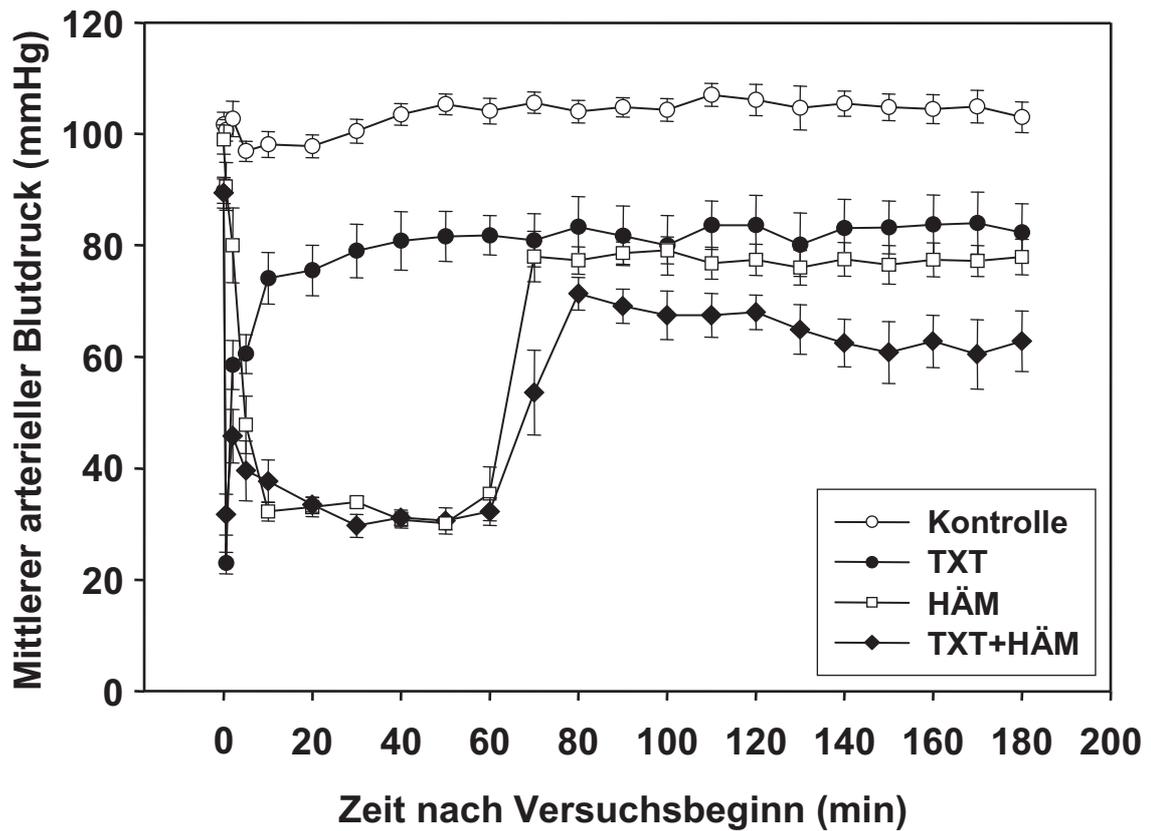


Abb. 5: Mittlerer arterieller Blutdruck der Versuchstiere in Millimeter Quecksilbersäule [mmHg] zu verschiedenen Zeitpunkten nach Versuchsbeginn in Minuten [min]. C3H/HeNCrI-Mäusen wurden dabei der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), darunter farbig eingezeichnet die Bereiche mit statistisch signifikanten Unterschieden der Versuchstiergruppen untereinander, jeweils  $p < 0,05$  (einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test).

### 3.3.4 Pulmonale Hämorrhagien

Nach Eröffnung des Thorax wurden beide Lungenhälften operationsmikroskopisch begutachtet. Das Ausmaß der oberflächlich sichtbaren Einblutung bei Tieren die ein Thoraxtrauma erhalten haben, wurde durch den, im Verlauf der Studie immer gleichen Beobachter pro Lungenlappen subjektiv in einem Bereich von null bis hundert Prozent eingestuft. Der rechte Lungenflügel der Maus besteht aus vier Lappen: Einem Oberlappen (OL), einem Mittellappen (ML), einem Unterlappen (UL) und einem akzessorischen Lappen, der im Folgenden wegen seiner topographischen Lage „Herzlappen“ (HL) genannt wird. Der linke Lungenflügel besteht nur aus einem Lappen, der im Folgenden mit L abgekürzt wird. Abb. 6 stellt die Beurteilungsergebnisse der Lungen aller TXT-Tiere dar. Dabei zeigte sich eine relativ homogene Verteilung des Lungenschadens auf die Einzellappen. Nur der Unterlappen der rechten Lunge blutete statistisch gesehen weniger stark ein als alle anderen Lungenlappen ( $p < 0,05$  vs. OL, ML, HL und L). Der Vergleich der rechten Lunge insgesamt mit der linken Seite ergab keinen statistischen Unterschied.

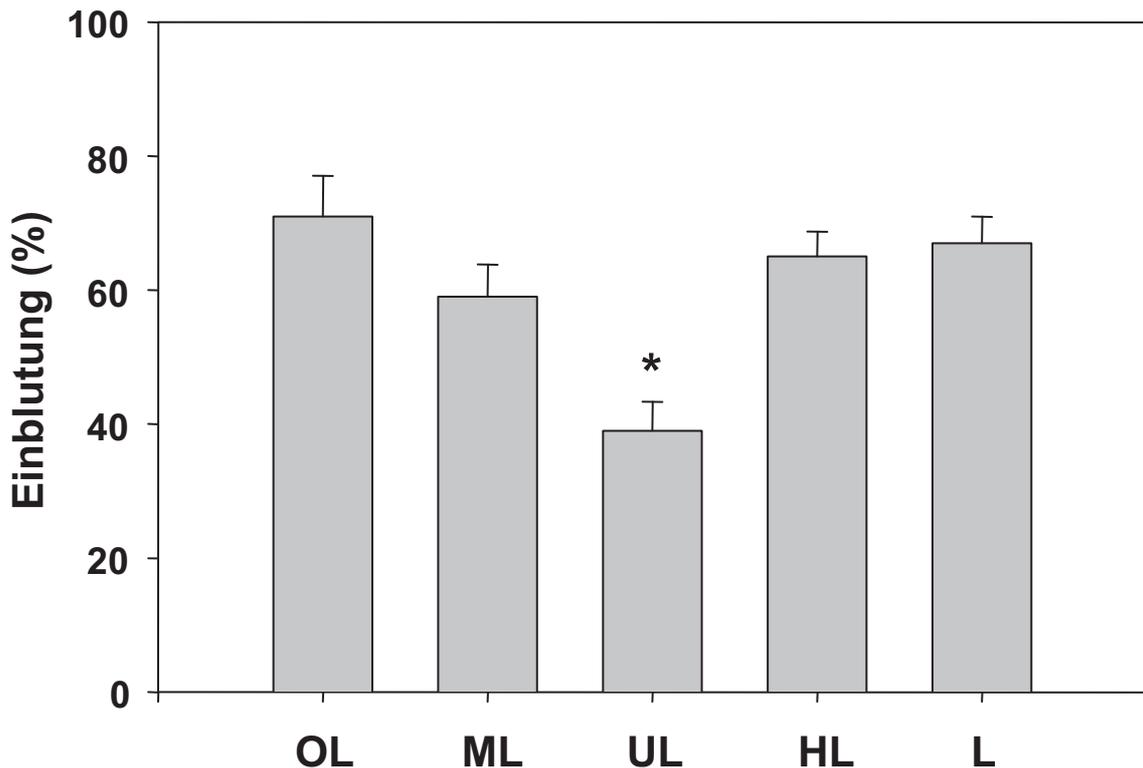


Abb. 6: Anteil der vom Untersucher operationsmikroskopisch eingeschätzten Lungeneinblutung an den gesamten Lungenlappen in Prozent [%]. Die C3H/HeNCrI-Mäuse wurden zuvor dem alleinigen Thoraxtrauma unterzogen. OL: rechter Oberlappen, ML: rechter Mittellappen, UL: rechter Unterlappen, HL: Herzlappen, L: linker Lungenflügel, Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), einfaktorielle Varianzanalyse, anschließender Student-Newman-Keuls-Test.

\*  $p < 0,05$  vs. OL, ML, HL und L

Abb. 7 zeigt die Verteilung der Beurteilungsergebnisse der Lungeneinblutungen aller TXT+HÄM-Tiere. Das Ausmaß der Lungeneinblutung im rechten Unterlappen war auch hier signifikant geringer im Vergleich zu allen anderen Lungenlappen ( $p < 0,05$  vs. OL, ML, HL und L). In dieser Gruppe ergab sich zusätzlich ein signifikant geringerer Schaden des linken Lappens gegenüber dem Herzlappen ( $p < 0,05$  vs. HL).

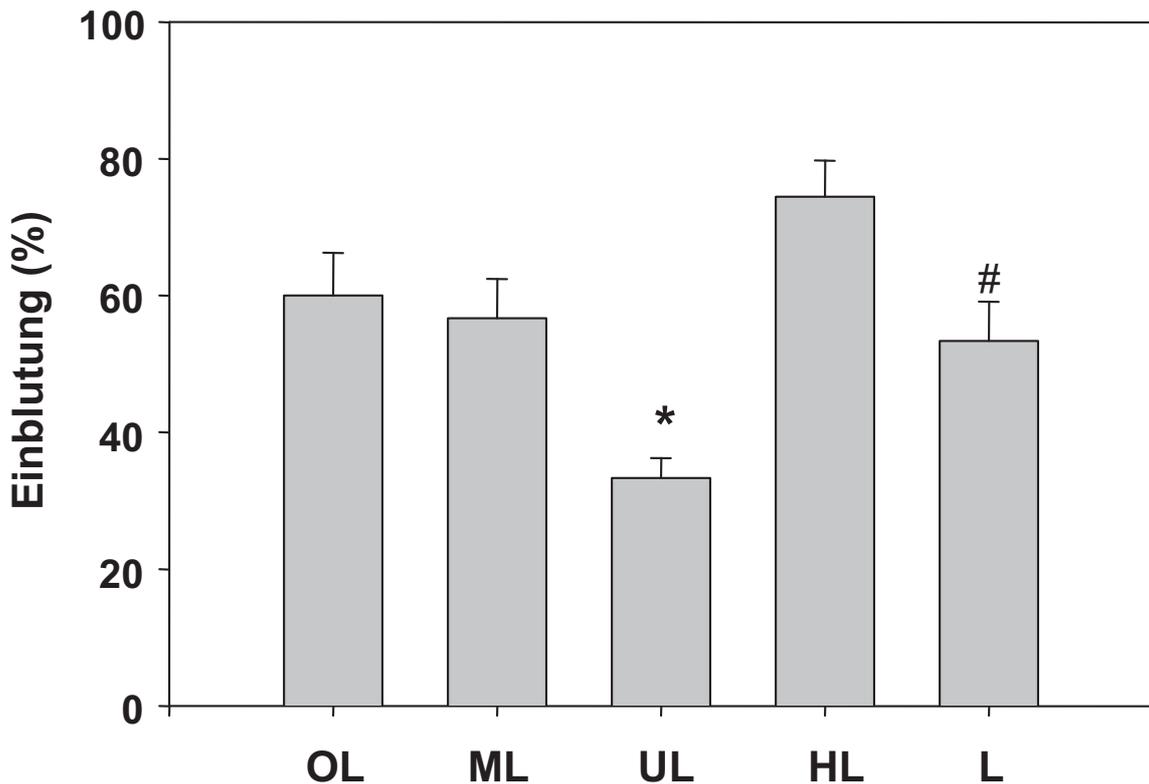


Abb. 7: Anteil der vom Untersucher operationsmikroskopisch eingeschätzten Lungeneinblutung an den gesamten Lungenlappen in Prozent [%]. Die C3H/HeNCrI-Mäuse wurden zuvor dem Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock unterzogen. OL: rechter Oberlappen, ML: rechter Mittellappen, UL: rechter Unterlappen, HL: Herzlappen, L: linker Lungenflügel, Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), einfaktorielles Varianzanalyse, anschließender Student-Newman-Keuls-Test.

\*  $p < 0,05$  vs. OL, ML, HL und L

#  $p < 0,05$  vs. HL

### 3.3.5 Blutverlust

Zur Induktion und Aufrechterhaltung der einstündigen Phase des Blutungschocks wurde den Tieren der TXT+HÄM-Gruppe  $0,73 \pm 0,44$  ml und den Tieren der HÄM-Gruppe  $0,86 \pm 0,42$  ml Blut entnommen, um den arteriellen Mitteldruck bei 35mmHg zu halten. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ( $p = 0,041$ ; t-test).

### 3.4 Immunologische Parameter

#### 3.4.1 Plasma

##### 3.4.1.1 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Freisetzung im Plasma

Beim Vergleich der Versuchstiergruppen ergab sich zwanzig Stunden nach Beobachtungsbeginn eine signifikante Erhöhung der mittleren TNF- $\alpha$ -Plasmakonzentrationen bei den TXT- und den TXT+HÄM-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe einerseits und zur HÄM-Gruppe andererseits. Die Gruppe der Tiere die nur Hämorrhagie erlitten hatte, unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

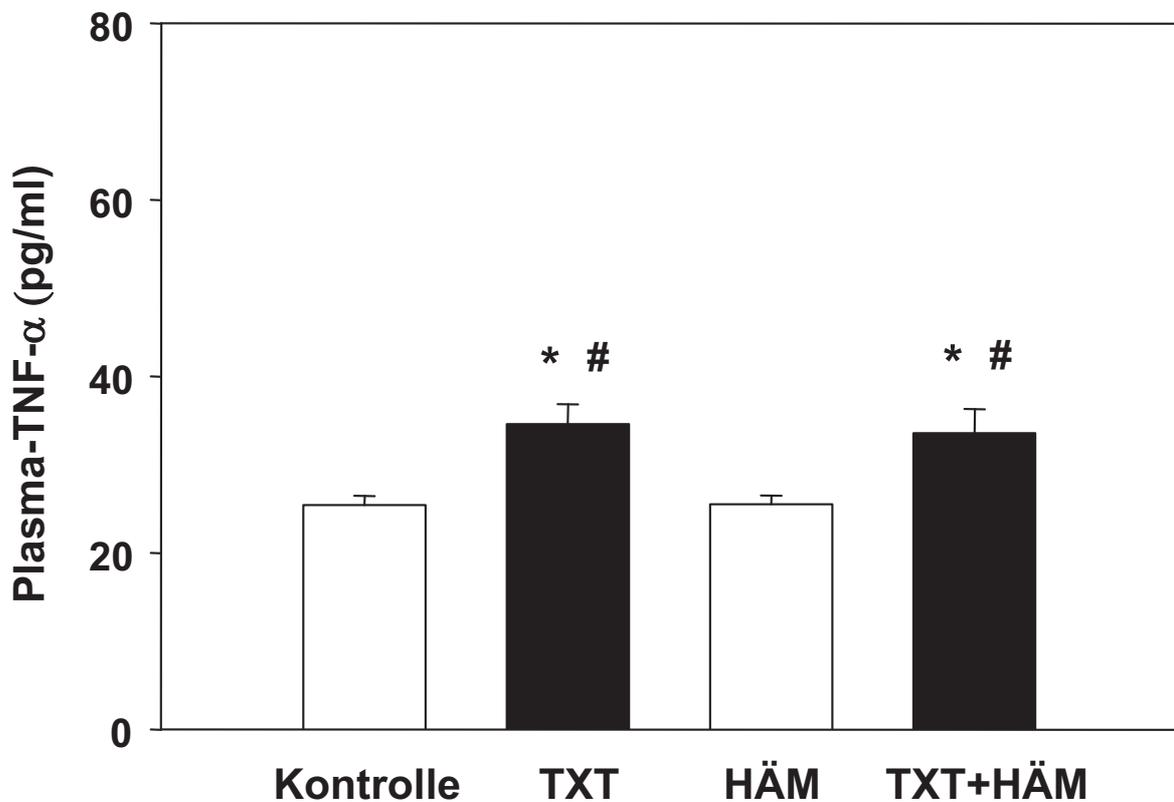


Abb. 8: Tumornekrosefaktor-[TNF]- $\alpha$ -Konzentrationen im Plasma aller Versuchstiergruppen in Pikogramm/ Milliliter [pg/ml] 20 Stunden nach Beobachtungsbeginn. C3H/HeNCrI-Mäuse wurden zuvor der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), einfaktorielle Varianzanalyse, anschließender Student-Newman-Keuls-Test.

\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle

#  $p < 0,05$  vs. HÄM

### 3.4.1.2 Interleukin-6-Freisetzung im Plasma

Die Messung der Konzentrationen von IL-6 im Plasma der Tiere zwanzig Stunden nach Beobachtungsbeginn zeigte, dass kaum Unterschiede der Versuchstiergruppen untereinander bestanden. Die TXT-Gruppe zeigte tendenziell leicht erhöhte Werte für IL-6, dieser Unterschied war aber nicht statistisch signifikant.

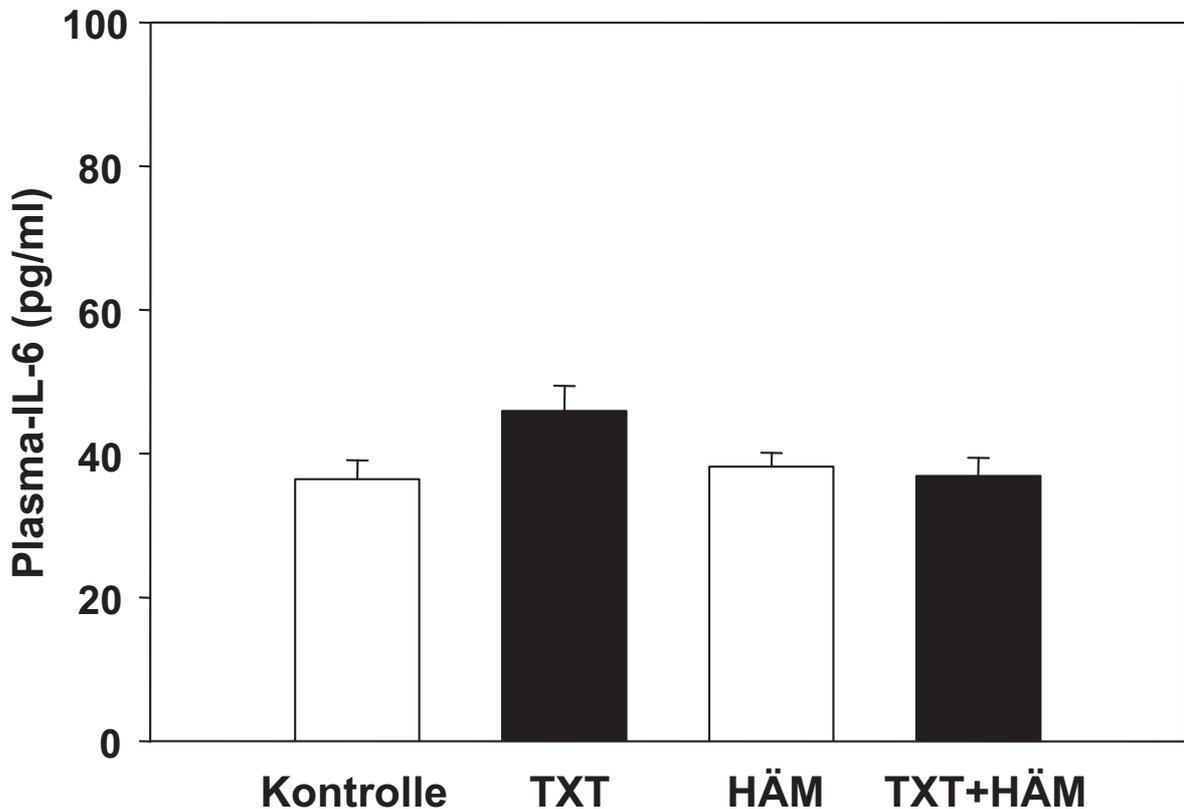


Abb. 9: Interleukin-[IL]-6-Konzentrationen im Plasma aller Versuchstiergruppen in Pikogramm/ Milliliter [pg/ml] 20 Stunden nach Beobachtungsbeginn. C3H/HeNCrI-Mäuse wurden zuvor der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), einfaktorielle Varianzanalyse, anschließender Student-Newman-Keuls-Test.

### 3.4.1.3 Interleukin-10-Freisetzung im Plasma

Auch bei den Plasmakonzentrationen von IL-10 konnten keine statistischen Unterschiede der Gruppen untereinander festgestellt werden.

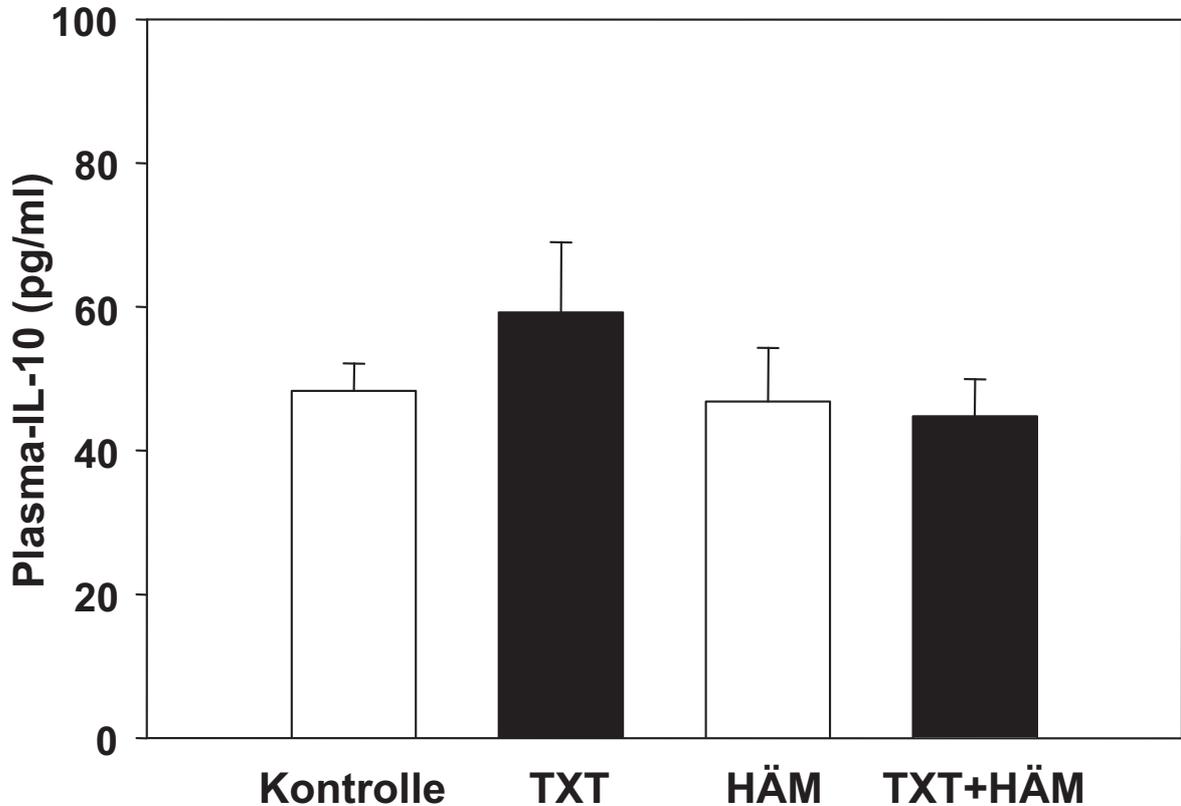


Abb. 10: Interleukin-[IL-]10-Konzentrationen im Plasma aller Versuchstiergruppen in Pikogramm/ Milliliter [pg/ml] 20 Stunden nach Beobachtungsbeginn. C3H/HeNCrI-Mäuse wurden zuvor der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), einfaktorielle Varianzanalyse, anschließender Student-Newman-Keuls-Test.

### 3.4.2 Kupffer-Sternzellkultur

#### 3.4.2.1 TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch Kupffer-Sternzellen

Bei der Analyse der Konzentrationen von TNF- $\alpha$  in den Kulturüberständen der Kupffer-Sternzellkulturen fiel auf, dass die Mittelwerte der drei Gruppen TXT, HÄM und TXT+HÄM tendenziell höher waren, als in der Kontrollgruppe. Dabei war nur der Unterschied der TXT+HÄM-Gruppe statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

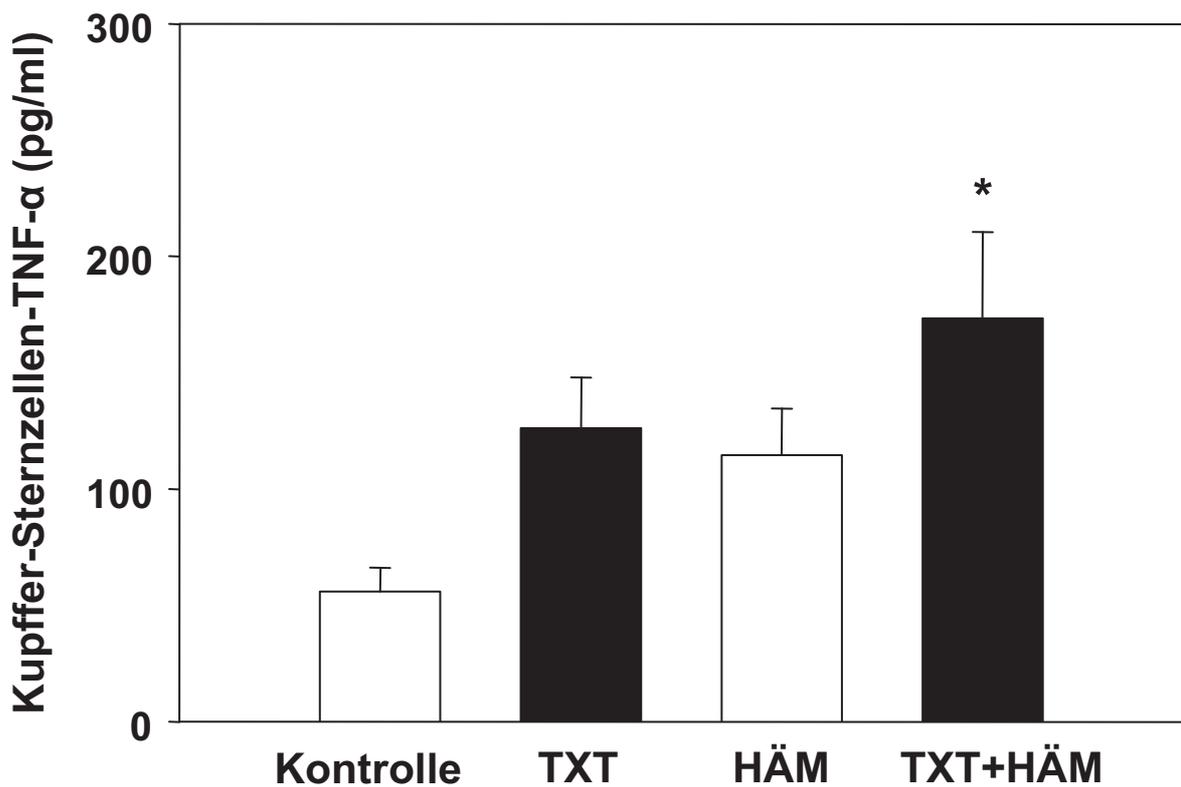


Abb. 11: Tumornekrosefaktor-[TNF]- $\alpha$ -Konzentrationen in Kupffer-Sternzellkulturüberständen aller Versuchstiergruppen in Pikogramm/Milliliter [pg/ml] 20 Stunden nach Beobachtungsbeginn. C3H/HeNCrI-Mäuse wurden zuvor der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), einfaktorielles Varianzanalyse, anschließender Student-Newman-Keuls-Test.

\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle

### 3.4.2.2 IL-6-Freisetzung durch Kupfer-Sternzellen

Die IL-6-Konzentrationen in den Kupfer-Sternzellkulturüberständen der TXT- und TXT+HÄM-Gruppe unterschieden sich jeweils signifikant von der Gruppe der Kontroll- und HÄM-Tiere.

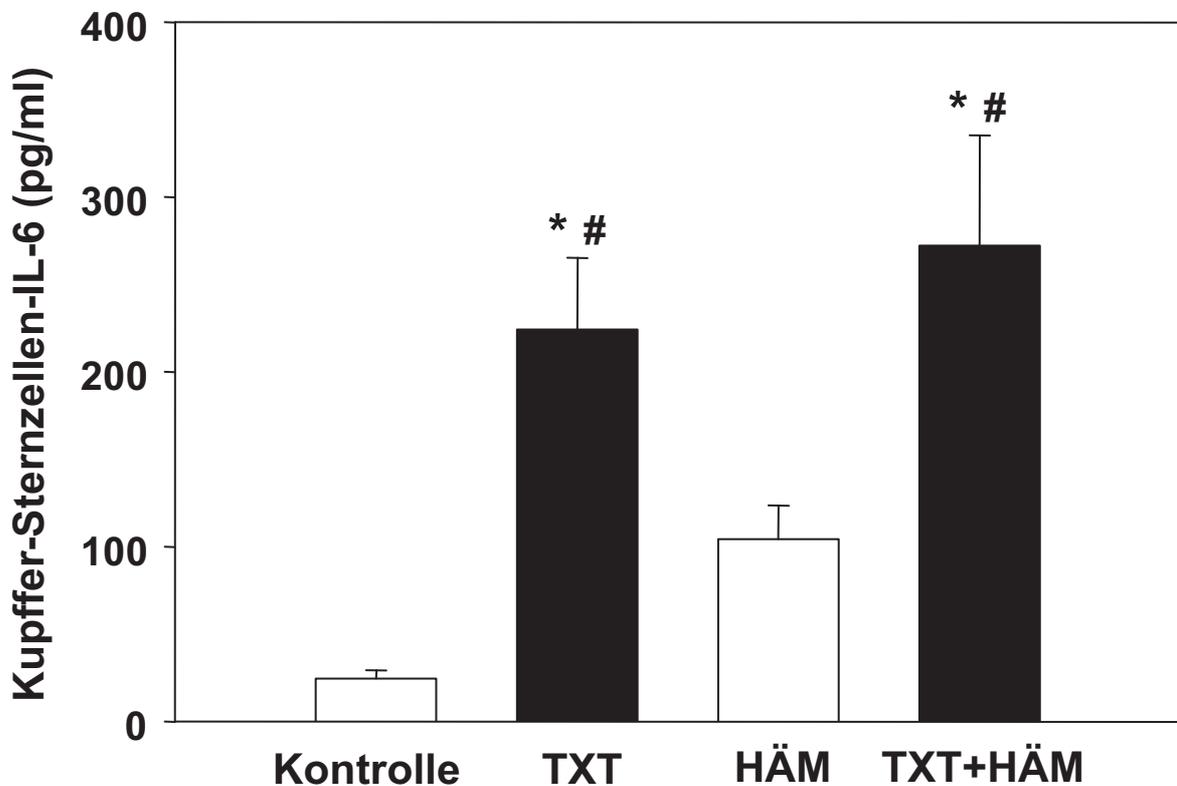


Abb. 12: Interleukin-[IL-]6-Konzentrationen in Kupfer-Sternzellkulturüberständen aller Versuchstiergruppen in Pikogramm/Milliliter [pg/ml] 20 Stunden nach Beobachtungsbeginn. C3H/HeNCrI-Mäuse wurden zuvor der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), einfaktorische Varianzanalyse, anschließender Student-Newman-Keuls-Test.

\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle

#  $p < 0,05$  vs. HÄM

### 3.4.2.3 IL-10-Freisetzung durch Kupffer-Sternzellen

Die IL-10-Konzentrationen der Kupffer-Sternzellkulturüberstände waren im Mittel in der TXT+HÄM-Gruppe statistisch signifikant erhöht im Vergleich zu Kontroll- und HÄM-Gruppe. Die TXT-Tiere zeigten ebenfalls signifikant höhere Werte als die Kontrolltiere.

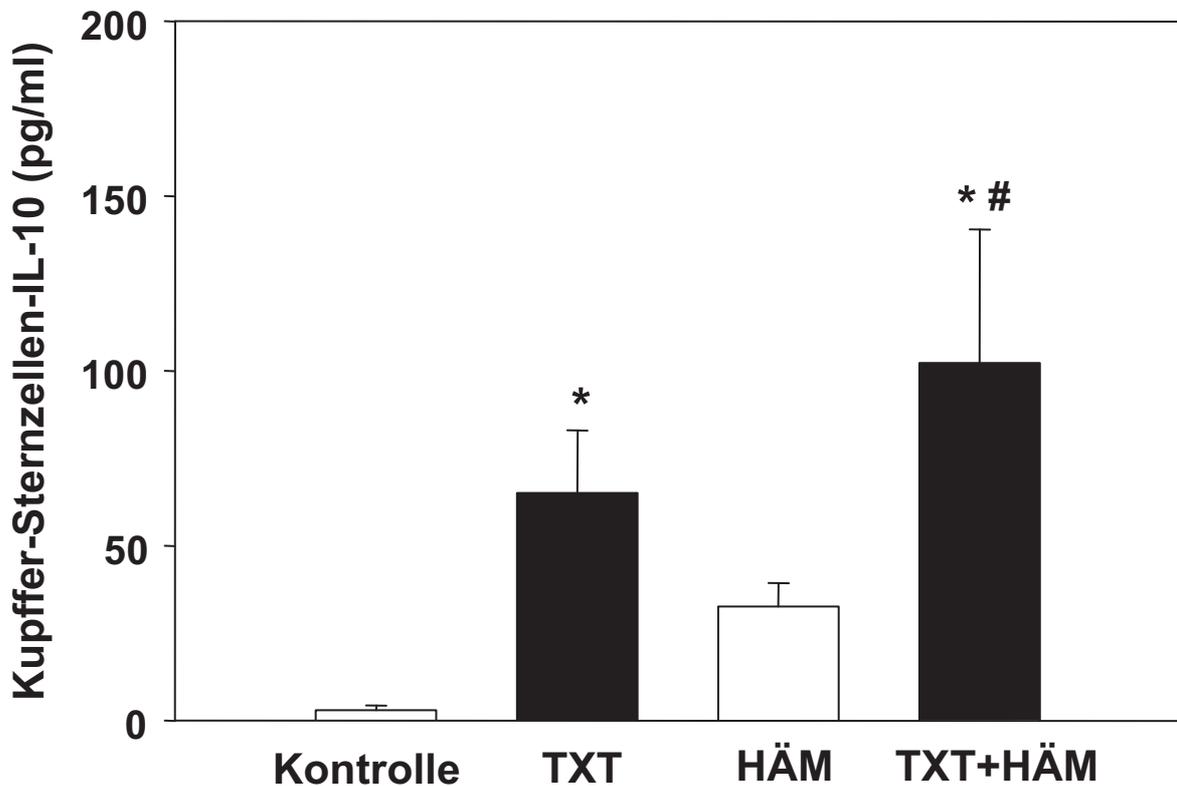


Abb. 13: Interleukin-[IL-]10-Konzentrationen in Kupffer-Sternzellkulturüberständen aller Versuchstiergruppen in Pikogramm/Milliliter [pg/ml] 20 Stunden nach Beobachtungsbeginn. C3H/HeNCrI-Mäuse wurden zuvor der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), einfaktorielle Varianzanalyse, anschließender Student-Newman-Keuls-Test.

\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle

#  $p < 0,05$  vs. HÄM

### 3.4.3 PBMC-Kultur

#### 3.4.3.1 TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch PBMCs

Der Vergleich der Konzentrationen von TNF- $\alpha$  in den Überständen der stimulierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes zeigte, dass Tiere mit Thoraxtrauma und anschließend hämorrhagischen Schock im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant geringere Werte aufwiesen.

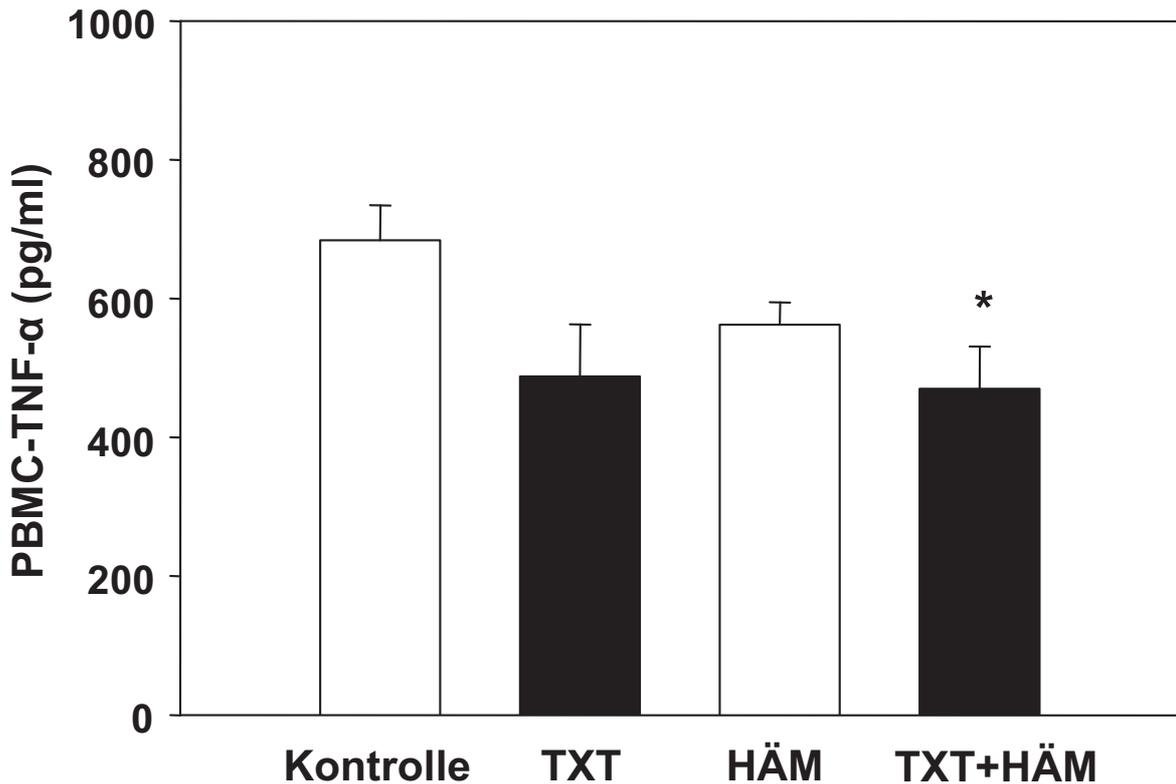


Abb.14: Tumornekrosefaktor-[TNF]- $\alpha$ -Konzentrationen in Zellkulturüberständen von Monozyten des peripheren Blutes (PBMC) aller Versuchstiergruppen in Pikogramm/Milliliter [pg/ml] 20 Stunden nach Beobachtungsbeginn. C3H/HeNCrI-Mäuse wurden zuvor der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), einfaktorielle Varianzanalyse, anschließender Student-Newman-Keuls-Test.

\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle

### 3.4.3.2 IL-6-Freisetzung durch PBMCs

Ähnlich wie TNF- $\alpha$  verhielten sich die IL-6-Konzentrationen in den PBMC-Kulturüberständen. Statistisch signifikant war die Abweichung nur in der Kombinationstiergruppe TXT+HÄM.

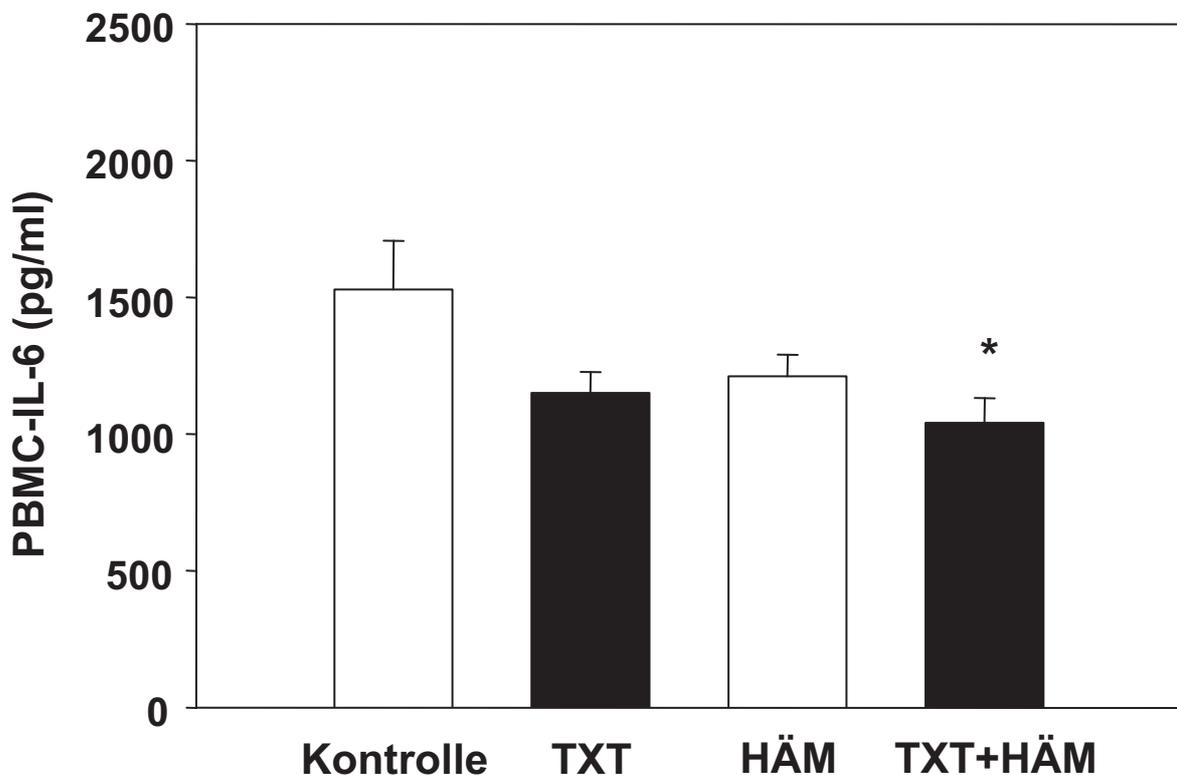


Abb. 15: Interleukin-[IL]-6-Konzentrationen in Zellkulturüberständen von Monozyten des peripheren Blutes (PBMC) aller Versuchstiergruppen in Pikogramm/Milliliter [pg/ml] 20 Stunden nach Beobachtungsbeginn. C3H/HeNCrI-Mäuse wurden zuvor der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), einfaktorische Varianzanalyse, anschließender Student-Newman-Keuls-Test.

\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle

### 3.4.3.3 IL-10-Freisetzung durch PBMCs

Bei den Konzentrationen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 erreichten die Konzentrationsunterschiede keine statistischen Signifikanz.

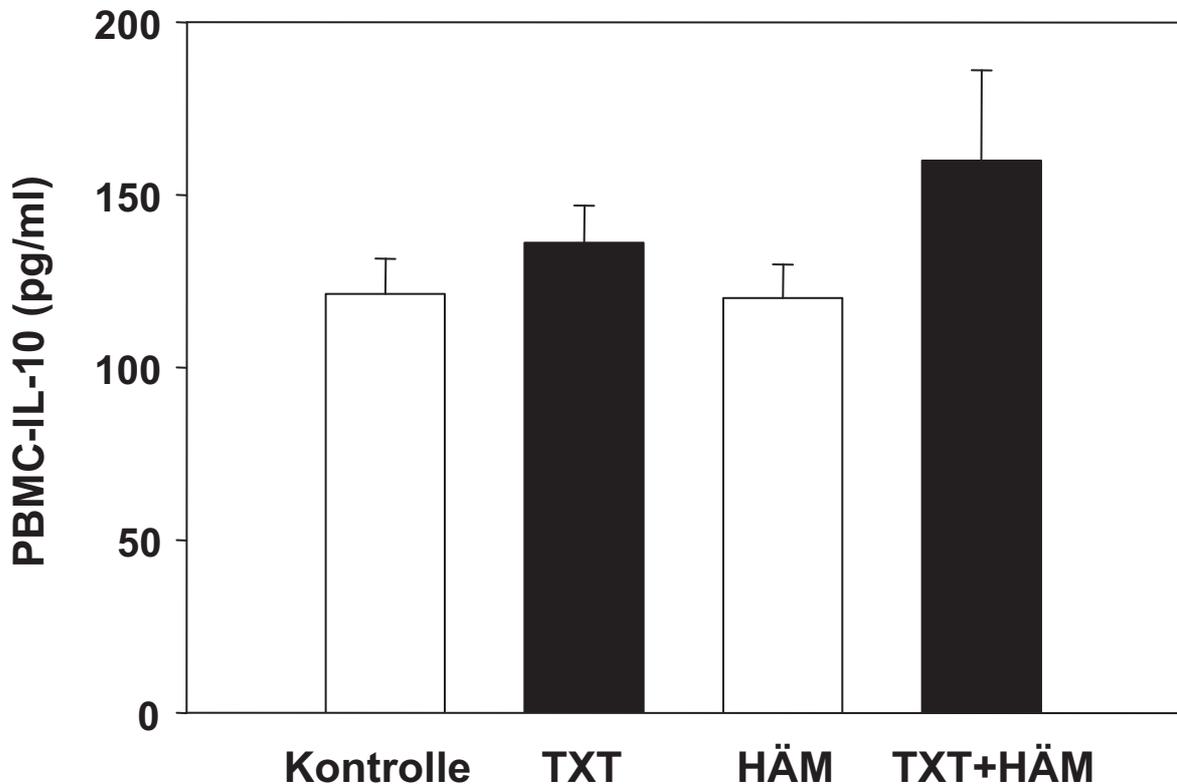


Abb. 16: Interleukin-[IL-]10-Konzentrationen in Zellkulturüberständen von Monozyten des peripheren Blutes (PBMC) aller Versuchstiergruppen in Pikogramm/Milliliter [pg/ml] 20 Stunden nach Beobachtungsbeginn. C3H/HeNCrI-Mäuse wurden zuvor der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), einfaktorielle Varianzanalyse, anschließender Student-Newman-Keuls-Test.

### 3.4.4 Milzmakrophagenkultur

#### 3.4.4.1 TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch Milzmakrophagen

Die Milzmakrophagen der drei Traumagruppen sezernierten nach Stimulation im Mittel weniger TNF- $\alpha$  in das Kulturmedium, als die der Kontrolltiere. Statistisch signifikant waren die niedrigeren Werte jedoch nicht.

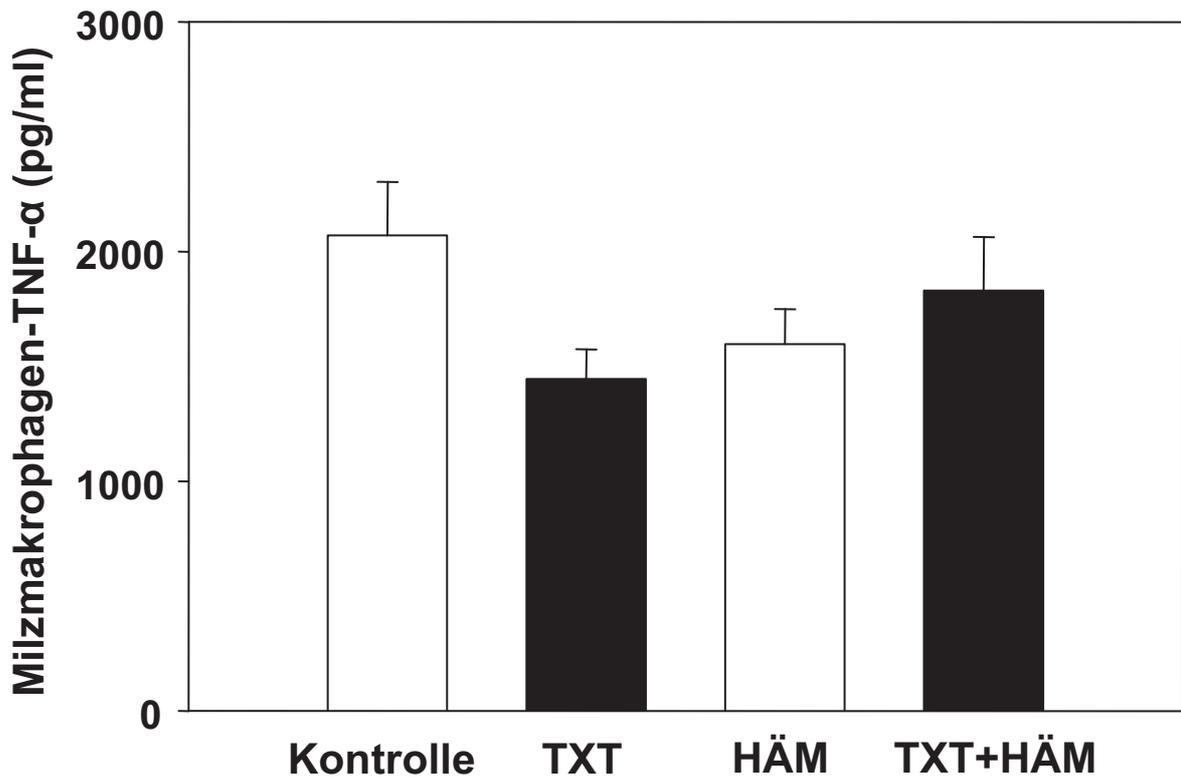


Abb. 17: Tumornekrosefaktor-[TNF]- $\alpha$ -Konzentrationen in Milzmakrophagenkulturüberständen aller Versuchstiergruppen in Pikogramm/Milliliter [pg/ml] 20 Stunden nach Beobachtungsbeginn. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), C3H/HeNCrI-Mäuse wurden zuvor der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen, einfaktorielle Varianzanalyse, anschließender Student-Newman-Keuls-Test.

### 3.4.4.2 IL-6-Freisetzung durch Milzmakrophagen

IL-6 zeigte im Mittel kaum Konzentrationsunterschiede in den Kulturüberständen der Milzmakrophagen aller vier Gruppen. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

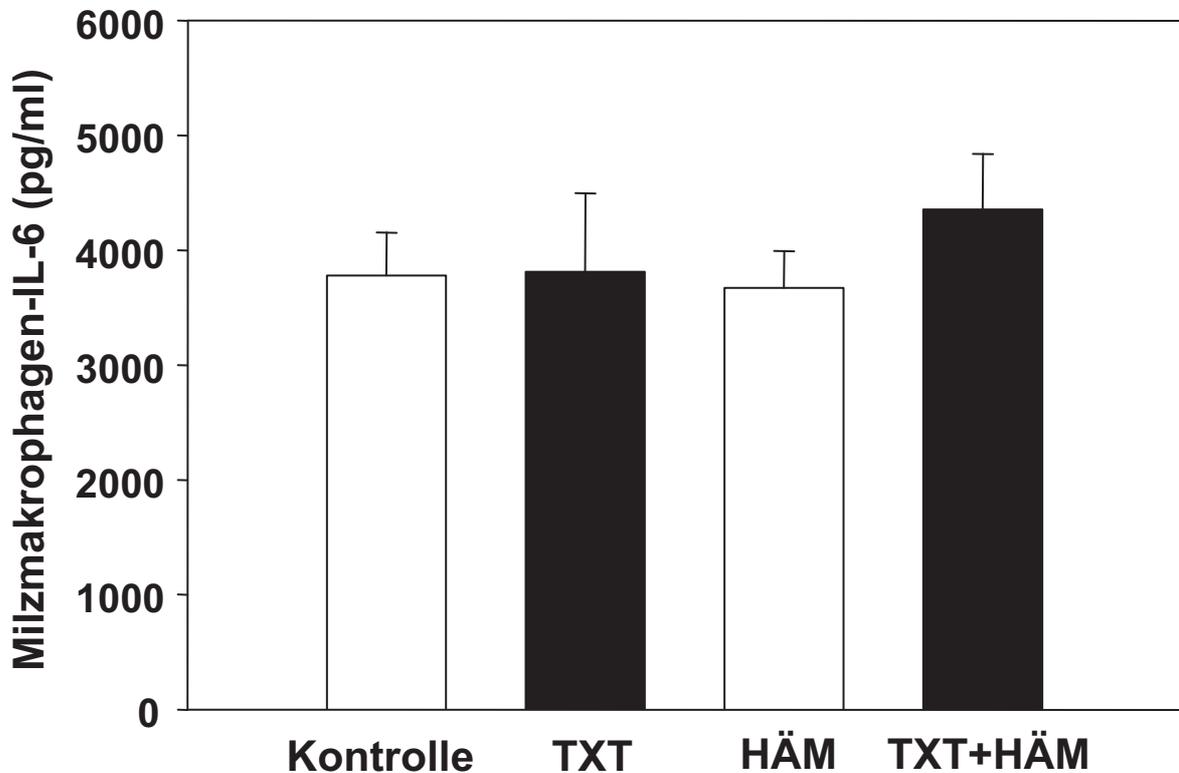


Abb. 18: Interleukin-[IL]-6-Konzentrationen in Milzmakrophagenkulturüberständen aller Versuchstiergruppen in Pikogramm/Milliliter [pg/ml] 20 Stunden nach Beobachtungsbeginn. C3H/HeNCrI-Mäusen wurden zuvor der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), einfaktorische Varianzanalyse, anschließender Student-Newman-Keuls-Test.

### 3.4.4.3 IL-10-Freisetzung durch Milzmakrophagen

Bei der Untersuchung der IL-10-Konzentrationen in den Milzmakrophagenkulturüberständen zeigten sich erhöhte Werte in den Gruppen, die Blutverlust erlitten hatten. Dabei ließ sich in der HÄM-Gruppe eine signifikante Konzentrationserhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe einerseits und zur TXT-Gruppe andererseits sichern. Kontroll- und TXT-Tiere unterschieden sich im Bezug auf dieses Zytokin praktisch nicht voneinander.

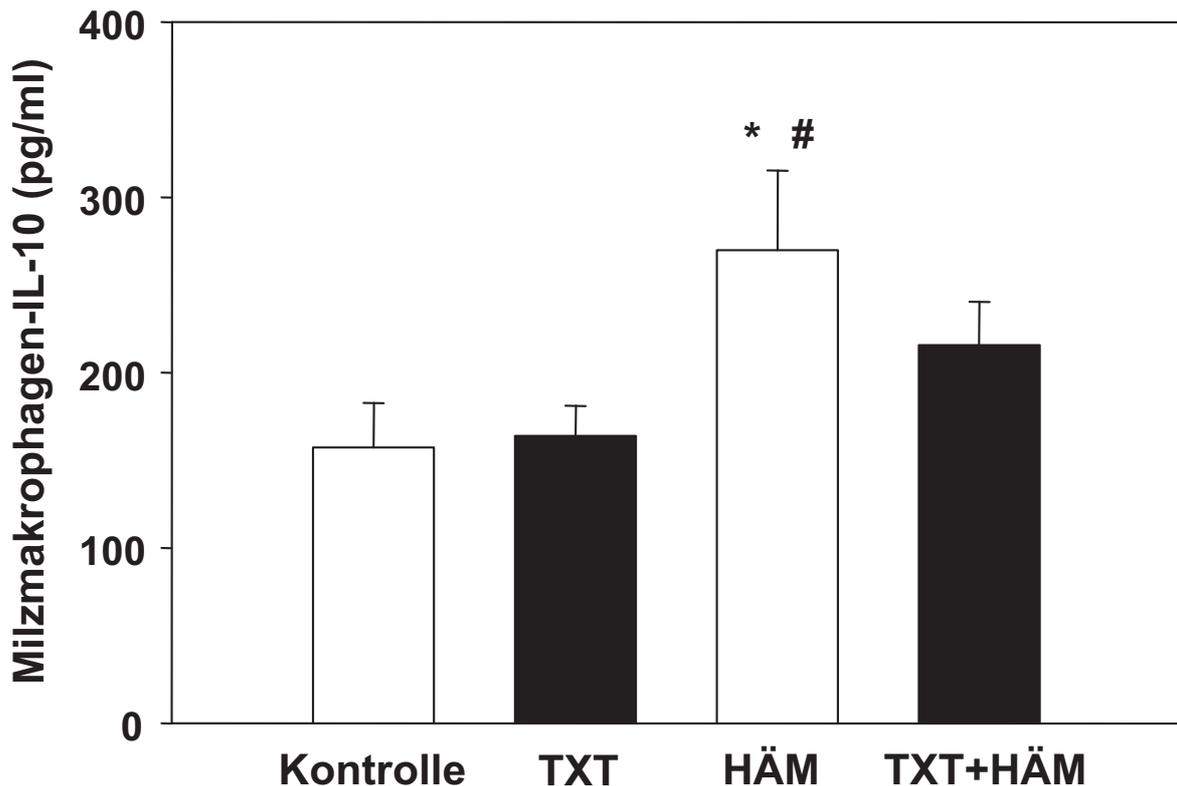


Abb. 19: Interleukin-[IL-]10-Konzentrationen in Milzmakrophagenkulturüberständen aller Versuchstiergruppen in Pikogramm/Milliliter [pg/ml] 20 Stunden nach Beobachtungsbeginn. C3H/HeNCrI-Mäuse wurden zuvor der Kontrollprozedur (Kontrolle), einem alleinigen Thoraxtrauma (TXT), einem alleinigen hämorrhagischen Schock (HÄM) und der Kombination aus Thoraxtrauma mit anschließendem hämorrhagischen Schock (TXT+HÄM) unterzogen. Daten sind Mittelwerte und Standardfehler (Fehlerbalken), (n=9-10), einfaktorische Varianzanalyse, anschließender Student-Newman-Keuls-Test.

\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle

#  $p < 0,05$  vs. TXT

## 4. Diskussion

### 4.1 Zielsetzung der Studie

Thoraxtrauma und hämorrhagischer Schock gehören, wie einleitend berichtet wurde, unbestritten mit zu den Pathomechanismen, die über das outcome des Polytraumapatienten entscheiden. Die dabei entstehenden Entzündungsprozesse im Organismus sind für die beiden einzelnen Verletzungsbilder weitreichend charakterisiert, jedoch noch sehr unvollständig. Welche Mechanismen bei Zusammentreffen der beiden Vorgänge entscheidend oder gar für therapeutische Interventionen zugänglich sind, bleibt unklar. Klinische Studien zu diesem Thema sind existent [36, 44, 84, 99, 102, 108, 109], deren Kritiker bemängeln jedoch häufig die Inhomogenität des Patientenguts bezüglich Alter, Vorerkrankungen, Verletzungsmuster und -intensität. Deshalb wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von experimentellen Groß- und Kleintiermodellen zum Thema Trauma [9, 22, 23, 35, 41, 47, 49, 73, 75, 82, 83] und Schock [2, 3, 10, 63, 98] entwickelt. Trotz teilweise erheblicher Begleitverletzungen wie Rippenfrakturen und Herzkontusionen, boten diese Studien besser reproduzier- und validierbare Daten. Ziel unserer Studie war zum einen die Entwicklung eines nicht letalen Kombinationsmodells aus Thoraxtrauma mit schwerer Lungenkontusion in Verbindung mit anschließendem schweren Volumenmangelschock. Des Weiteren sollten die eng miteinander verwobenen biochemischen Abwehrprozesse anhand von gut für Einzelverletzungen charakterisierter Parameter untersucht werden. Wir haben dazu das von Knöferl et al. entwickelte Mäusethoraxtraumamodell [56] verwendet. Die Vorteile sind die umfassende Verfügbarkeit immunologischer Untersuchungsmethoden, das sehr homogene Versuchstierkollektiv, die relativ unkomplizierte Haltung und Behandlung der Tiere, die gezielte Applizierbarkeit einer ausgeprägten, bilateralen Lungenkontusion unter Vermeidung relevanter intra- und extrathorakaler Begleitverletzungen. Die Erfassung physiologischer Parameter wie Atem- und Herzfrequenz, arterieller Mitteldruck und Lungenschaden der Tiere innerhalb einer Gruppe bzw. der Tiergruppen wurde durchgeführt. Diese, zusammen mit der Evaluation des Lungenschadens der TXT- und der TXT+HÄM-Gruppen sollte gewährleisten, daß sich die Trauma- und Schockintensitäten in beiden Gruppen nicht signifikant unterschieden. Die Messung der Freisetzung ausgewählter Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) einzelner

Zellenarten in Blut, Leber und Milz sollte Aufschluss über die immunologischen Zusammenhänge beider Pathomechanismen geben. Die jeweiligen Tierorgane wurden hierzu aufgearbeitet, dann Kupffer-Sternzellen der Leber, PBMC aus dem peripheren Blut und Makrophagen der Milz isoliert respektive in Kultur gebracht. Nach Stimulation mit jeweils geeigneten Substanzen wurde die Konzentration der freigesetzten Zytokine quantifiziert. Die Mediatoren wurden im Hinblick auf Relevanz bezüglich Auslösung von pro- und antiinflammatorischer Prozesse nach Trauma oder Schock ausgewählt [42].

## **4.2 Versuchsaufbau**

### **4.2.1 Versuchstiere**

Bei den Tiergewichten der einzelnen Versuchsgruppen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Dem in Vergangenheit erwähnten protektiven Effekt höherer Körpergewichte [90] bei Lungenkontusion wurde somit Rechnung getragen. Der freie Zugang der Tiere zu Futter und Wasser von Beendigung der Narkose an bis zur Tötung der Tiere war im Sinne des Tierschutzes obligat. Somit war jedoch die Kalorien-, Wasser- und Spurenelementzufuhr der Tiere nicht kontrollierbar und wahrscheinlich bei allen Tiergruppen qualitativ bzw. quantitativ unterschiedlich. Dass beispielsweise Tiere mit Kombinationsverletzung später und quantitativ weniger Nahrung zu sich nehmen als Kontrolltiere erscheint trivial. Retrospektiv könnte es sich gerade hierbei um einen wichtigen Einflussfaktor auf die Immunantwort der einzelnen Versuchstiergruppen handeln, da gerade während der Frühphase nach Trauma der Substratumsatz von Proteinen, Kohlehydraten und Fetten gleichsinnig gesteigert ist [72]. Tiere mit weniger oraler Substratzufuhr in der Frühphase nach Trauma können diesen kurzfristigen Mehrbedarf an Energie dann nur durch einen frühzeitigeren Abbau von Körperreserven decken – ein dementsprechend vorzeitig einsetzender metabolischer Block mit konsekutiver Immunodepression könnte die Folge sein [71].

### **4.2.2 Druckwelle**

Die gemessenen Spitzendrücke und Druckwellendauern waren in beiden Versuchstiergruppen, die ein Thoraxtrauma erhalten hatten, statistisch gesehen

gleich. Dies spricht für die Reproduzierbarkeit des Thoraxtraumamodells an Mäusen [56]. Somit sollten Unterschiede zwischen der TXT- und TXT+HÄM-Gruppe vorwiegend den Auswirkungen der Schockphase zuzuschreiben sein.

#### 4.2.3 Schock

Abbildung 5 zeigt dass sich bis auf die ersten zwei Minuten die Blutdrücke der HÄM- und der TXT+HÄM-Gruppe während der einstündigen Schockphase statistisch nicht voneinander unterschieden. Die Abweichung für die ersten zwei Minuten war dadurch bedingt, dass Tiere nach Thoraxtrauma sofort hypoton waren und Tiere mit alleinigem Schock erst entblutet werden mussten. Wegen der Größenverhältnisse im Mäusemodell waren bei Innendurchmessern der Gefäßzugänge von unter 0,28 mm schnellere Blutentnahmen technisch nicht realisierbar. Die signifikant kleinere Menge an entnommenem Blut zur Induktion und Aufrechterhaltung der gleichen Blutdrücke ist nachvollziehbar, da die Tiere mit zusätzlichem Trauma ja einerseits sichtbar Blut in ihr pulmonales Parenchym verloren hatten, andererseits unter den kardiozirkulatorischen Nebenwirkungen des Traumas litten (siehe dazu Abschnitt 4.3.2 und 4.3.3). Die objektivierbare Schwere des Blutungsschocks war somit in beiden Gruppen vergleichbar.

#### 4.2.4 Narkose

Die gewählte Inhalationsanästhesie mit Sevofluran, einer halogenierten Kohlenwasserstoffverbindung, supplementiert mit der subkutanen Injektion von Buprenorphin, erlaubte die Versuchsdurchführung in Spontanatmung. Dies entspricht wohl eher den physiologischen Voraussetzungen eines Traumapatienten. Die Intubationsnarkose mit konsekutiver kontrollierter Beatmung der Tiere wäre nicht nur technisch aufwendiger, sondern auch unphysiologischer gewesen, da Glottisschluss und postraumatische Apnoephase unterdrückt worden wären. Weiterhin hätte die Überdruckbeatmung der Kleintierlunge selbst auch Potential zur Lungenschädigung gehabt. Die Kombination aus kurzwirksamem Inhalationsnarkotikum und langwirksamem Opiat bietet viele Vorteile. Diese liegen vor allem in der guten Steuerbarkeit der Narkosetiefe, den kurzen Einschlaf- und Aufwachzeiten dank des niedrigen Blutgaskoeffizienten des Sevoflurans von 0,65, seiner nur geringen kardiodepressiven Wirkung und der relativ günstigen

immunologischen Interaktionen. Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass Makrophagen- und Lymphozytenfunktion von mit Sevofluran narkotisierten Mäusen erhalten blieben [85], bei einer lediglich kurzdauernden, reversiblen Verminderung der Leukozyten im peripheren Blut der Tiere [30]. Insbesondere Phagozytenzahl und -aktivität blieben konstant, die Stimulierbarkeit der Splenozyten zum Beispiel mit Concavalin A oder LPS war erhalten [85]. Nach Langzeitnarkose fanden sich erhöhte Organgewichte von Milz, Leber und Nieren bei erhaltener Mikroarchitektur und Funktion [85]. Allerdings muss an dieser Stelle auch auf die organoprotektiven Wirkungen von Narkosegasen hingewiesen werden. Neuroprotektive Effekte von Xenon nach Hypoxämie [14, 19, 92], Kardioprotektion durch Isofluran [33] und die nachfolgend genannten Effekte von Sevofluran sind in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der pharmakotherapeutischen Forschung gerückt. In vivo wurden bei Leberresektionen sowohl signifikant niedrigere Transaminasenwerte als auch weniger postoperative Komplikationen nach Sevoflurannarkose im Vergleich zur totalintra venösen Anästhesie nachgewiesen [18]. Weiter zeigten sich in vitro an LPS-stimulierten Alveolarmakrophagen signifikant geringere Ausschüttungen von TNF- $\alpha$ , cytokine-induced-neutrophil-chemoattractant-1 (CINC-1), macrophage-inflammatory-protein-2 (MIP-2) und dem monocyte-chemoattractant-protein-1 (MCP-1) unter Sevofluraneinfluss, was auf eine geringere chemotaktische Reaktion auf neutrophile Granulozyten und Makrophagen schließen lässt [104]. Letztlich sollten die unbestreitbaren Einflüsse der aus tierschutzrechtlichen und ethischen Gesichtspunkten nötigen Narkose auf das Immunsystem der Tiere durch die gleich behandelte Kontrolltiergruppe von den Reaktionen nach Trauma und Blutungsschock weitgehend differenzierbar bleiben.

#### 4.2.5 Beobachtungszeitraum

Beim Beobachtungszeitraum mussten Kompromisse eingegangen werden. Eine ausreichend lange Überwachung in Narkose zur Erfassung der kardiorespiratorischen Verlaufsparemeter und eventueller frühletaler Ereignisse erschien sinnvoll. Somit musste aber auch exemplarisch ein Einfluss der Liegedauer auf die Bildung pulmonaler Atelektasen und eine daraus resultierende Verschlechterung von Oxygenationsparametern in Kauf genommen werden. Da alle Versuchstiergruppen die gleiche Liegedauer in Narkose aufwiesen, sollten sie auch diese

Nebenwirkungen gleichverteilt aufweisen und somit andere Ergebnisse nicht stören. Inspiriert durch die Arbeiten von Irwin et al. an Ratten wurde eine 180minütige Beobachtungsphase durchgeführt [47].

### **4.3. Physiologische Parameter**

#### **4.3.1 Atemfrequenz**

Das isolierte Thoraxtrauma schien im Vergleich zur Kontrolle, wie bereits in der Literatur beschrieben, zur kompensatorischen Tachypnoe zu führen [41]. Am stärksten ausgeprägt und statistisch signifikant war dies vor allem im Bereich der ersten Stunde nach Trauma. Ursache ist wahrscheinlich die pulmonale Funktionsverschlechterung mit Bildung eines Ödems im Interstitium, respektive von Atelektasen. Es erfolgt ein Abfall des Sauerstoffpartialdruckes bei Ansteigen des Kohlendioxidpartialdruckes im arteriellen Blut, was beides eine Steigerung des Atemantriebes zur Folge hat [56]. In unserem vorliegenden Modell unterschieden sich nun aber weder Tiere mit Schock alleine, noch Tiere mit Thoraxtrauma und Schock bzgl. der Atemfrequenzen im Vergleich zur Kontrolle. Dies lässt vermuten, dass der Blutungsschock allein kaum Auswirkungen auf die pulmonale Funktion der Maus hat. Bei gleichzeitig vorliegendem Thoraxtrauma verschlimmert sich die Situation bedeutend. Die Versuche, durch Hyperventilation die Oxygenation zu verbessern, sind kaum noch so ausgeprägt. Eine im Verlauf vergrößerte Sauerstoffschuld könnte die Folge sein, was durch weiterführende Untersuchungen, wie Serumlaktatbestimmungen untermauert werden könnte.

#### **4.3.2 Herzfrequenz**

Die Herzfrequenzen der Tiere mit Thoraxtrauma, Blutverlust oder Kombination aus beidem fielen nach Versuchsbeginn allesamt ab im Vergleich zu den Kontrolltieren. In den ersten zehn Minuten verhielten sich TXT- und TXT+HÄM-Tiere noch sehr ähnlich. Diese posttraumatische Bradykardie wurde bereits in mehreren Studien beschrieben [9, 17, 41, 47, 56]. Sie war teils schnell reversibel, teils persistent bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes. Sie kann als vagale Reaktion auf das Trauma, analog der bekannten Klinik beim Menschen, interpretiert werden [61]. Auch eine okkulte myokardiale Dysfunktion als Ausdruck der Kontusion des Herzmuskels und seines Erregungsbildungs- und Erregungs-

leitungssystems wurde bereits diskutiert [74]. Die Tiere mit Thoraxtrauma und nachfolgendem hypovolämem Schock (TXT+HÄM) reagierten dann aber während der einstündigen Hypotensionsphase analog wie die Tiere, die nur einen Schock erhalten hatten (HÄM) mit erneutem Herzfrequenzabfall. Nach der Reinfusion mit Ringerlösung steigerten sich die Frequenzen der HÄM-Tiere wieder auf Werte knapp unter den Kontrolltieren, während die TXT+HÄM-Tiere weitaus bradykarder blieben. Analog der Beobachtungen aus 4.3.1. lässt sich auch hier auf eine Verschlechterung der kardialen Chrono- und Dromotropie in der TXT+HÄM-Gruppe schließen, die den Beobachtungszeitraum überdauert. Thoraxtrauma und Schock wirken vermutlich auch hier additiv.

### 4.3.3 Mittlerer arterieller Blutdruck

Ganz ähnlich den Herzfrequenzen verhielten sich auch die mittleren arteriellen Blutdrücke der Versuchstiere. Ähnlich den Beobachtungen in früheren Untersuchungen war nur die Kontrollgruppe normotensiv, Tiere mit Schock oder Trauma fielen im Verlauf ab, stiegen je nachdem zeitlich versetzt wieder an, erreichten jedoch nie mehr die Werte der Kontrolltiere. Kombinationstiere mit Thoraxtrauma und Schock hatten tendenziell hypotensivere Werte während der Reinfusion und fielen danach wieder auf signifikant schlechtere arterielle Mitteldrücke als alle anderen Versuchstiergruppen ab. Dies steht im Einklang mit Studien, die Druckabfälle nach Thoraxtrauma zeigten [26, 47]. Da es sich im vorliegenden Modell um ein auf das entnommene Blutvolumen standardisiertes Reinfusionsregime nach Blutungsschock handelte, konnte dem zusätzlichen Volumenverlust in intrathorakale Gewebe bei den TXT+HÄM-Tieren nicht Rechnung getragen werden. Möglicherweise konnten solche Tiere ihren Blutdruck nicht mehr in dem Maße stabilisieren wie die Tiere nach Thoraxtrauma oder Schock alleine. Ab der 140. Minute kam es zum erneuten, signifikanten Blutdruckabfall im Vergleich zu den Tieren der HÄM- oder TXT-Gruppe. Im vorliegenden Modell lässt sich also die Blutdrucksituation der TXT+HÄM-Tiergruppe noch vor Ablauf der Beobachtungszeit als dekompensiert deklarieren. Alle anderen Gruppen scheinen auf Ihrem Niveau kompensiert zu sein. Eine Kombination aus vagaler Reflexantwort und Pumpversagen nach direkter Myokardkontusion, aber auch durch Zunahme des pulmonalarteriellen Widerstandes infolge Atelektasenbildung, kann diskutiert werden.

#### 4.3.4 Pulmonale Hämorrhagie

Die in den Abschnitten 3.2 und 4.2.2 dargestellten Untersuchungsbefunde unterstellten ein physikalisch vorwiegend gleichförmiges Druckwellentrauma, das sich zwischen den Tieren der TXT- und der TXT+HÄM-Gruppe nicht signifikant unterschied. Dass die Tiere der Gruppe mit Trauma und Blutungsschock im Vergleich zu Tieren mit alleinigem Trauma tendenziell weniger Lungeneinblutung präsentierten, könnte durch weniger zur Verfügung stehendes Blutvolumen in Kombination mit erniedrigtem Perfusionsdruck erklärt werden. Die in beiden Gruppen signifikant geringeren Einblutungen des rechten Unterlappens schienen modellbedingt zu sein und unbedeutend. Eine Erklärung könnten die im Vergleich zum Menschen veränderten anatomischen Verhältnisse bei der Maus sein. Der rechte Unterlappen scheint hier mehr durch das Mediastinum verdeckt zu werden. Ähnlich kann man den signifikanten Unterschied zwischen linkem Lungenlappen und Herzlappen in der Gruppe TXT+HÄM erklären. Der Herzlappen gehört zwar dank seiner rechtsseitig bronchialen Insertion definitionsgemäß zur rechten Lunge der Maus, ein Großteil seines Parenchyms liegt aber links parakardial bis ventral vor dem linken Lungenlappen. Der in Abb. 7 sichtbar stärker geschädigte Herzlappen könnte hier also mehr Energie absorbiert und somit den linken Unterlappen geschützt haben. Ferner darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Quantifizierung des Lungenschadens mittels menschlichem Auge subjektiv ist. Nur die Lungenoberfläche und nicht ihre tieferen Schichten können erfasst werden. Letztlich bleibt die Messtoleranz dieses Verfahrens unbekannt. Sinn sollte in erster Linie die grobe Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Thoraxtraumainduktion sein. Beides scheint auch in Hinblick auf die anderen beteiligten Messwerte erfüllt zu sein. Perspektivisch wäre interessant, ob die Verwendung von hypertonen hyperonkotischen Infusionslösungen zur Reinfusion nach Blutungsschock Vorteile bezüglich einer geringeren Ausbildung des makroskopisch sichtbaren pulmonalen Schadens erbringen würde. Jüngste Untersuchungen am Schwein haben hier ermutigende Ergebnisse erbracht [40].

## 4.4. Biochemische Parameter

Die Auswirkungen der im Modell induzierten Pathomechanismen auf die zellvermittelte Immunfunktion wurden anhand der Veränderung der Mediatoren TNF- $\alpha$ , IL-6, und IL-10 20 Stunden nach Versuchsbeginn im Plasma der Tiere einerseits und in den Zellkulturüberständen stimulierter Makrophagen aus Leber, Milz und Blut andererseits untersucht.

### 4.4.1 Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Setzen sich Makrophagen mit Pathogenen auseinander, sezernieren sie TNF- $\alpha$ , ein proinflammatorisches Zytokin [52, 86]. Dieses ist ein potenter Aktivator von z.B. Endothelzellen. Lokale Freisetzung von TNF- $\alpha$  führt zu den klassischen Infektionszeichen Hitze, Rötung, Schwellung, Schmerz, bei systemischer Erhöhung löst TNF- $\alpha$  im Körper Reaktionen wie Fieber, Kachexie und Schock aus. Die hepatischen Kupffer-Sternzellmakrophagen sind eine potente TNF- $\alpha$ -Quelle [11]. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung nach schwerem Trauma recht schnell wieder abklingt [105]. In unserer Untersuchung zeigten sich nach 20 Stunden erhöhte TNF- $\alpha$ -Werte im Plasma von Tieren, die entweder nur ein Thoraxtrauma oder selbiges in Kombination mit einem Blutverlust erhalten hatten. Tiere die nur einen Schock erlitten hatten, wiesen ähnliche Plasma-TNF- $\alpha$ -Werte wie Kontrolltiere auf. Unsere Untersuchung impliziert, dass Lungenverletzungen eine signifikant größere bzw. länger andauernde TNF- $\alpha$ -Erhöhung im Plasma liefert als ein isolierter Blutverlust. Bei Kombinationsverletzung zeigten Kupffer-Sternzellmakrophagen erhöhte, Monozyten im peripheren Blut hingegen verminderte TNF- $\alpha$ -Sekretion. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Kombination beider Pathomechanismen eine stärker proinflammatorische Wirkung auf Kupffer-Sternzellen der Leber hat als die Einzelverletzungen.

### 4.4.2 Interleukin-6

Interleukin-6 wird u.a. nach Stimulation durch TNF- $\alpha$  von Endothelzellen und Fibroblasten aus geschädigten Geweben einerseits und von aktivierten T-Zellen und Makrophagen andererseits abgegeben [52]. Es kann in Lebermakrophagen

immense Ausschüttung von Akutphase-Proteinen hervorrufen und in Plasmazellen die Immunglobulinsynthese steigern [86]. Klinische Studien haben gezeigt, dass Traumapatienten sehr früh erhöhte IL-6-Konzentrationen im Blut aufwiesen und deren Ausmaß mit Verletzungsschwere und Outcome dieser Patienten korrelierten [38, 50, 78, 106]. Bei unseren Versuchstieren zeigten sich 20 Stunden nach Versuchbeginn kaum relevante Plasma-IL-6-Konzentrationsunterschiede. Dies ist vereinbar mit der niedrigen Plasmahalbwertszeit von IL-6, die nur wenige Minuten beträgt [57]. Es kann somit unterstellt werden, dass sich die IL-6-Ausschüttung zum Zeitpunkt 20 Stunden nach Trauma bereits wieder normalisiert hat, die Produzenten aber noch hochreguliert sind. Letzteres kann man an der Freisetzung durch stimulierte Kupffer-Sternzellen ablesen. Diese war bei TXT+HÄM-Tieren signifikant erhöht, dicht gefolgt von den TXT-Tieren. Die Monozyten im peripheren Blut von TXT+HÄM-Tieren hingegen produzierten nach Stimulation weniger IL-6 als die Kontrollen. Nach zwanzig Stunden waren kaum IL-6-Sekretionsunterschiede bei den Milzmakrophagen der Versuchstiere zu entdecken, die jeweils nur Trauma oder Schock erlitten hatten. Nicht signifikant höhere Werte bei den TXT+HÄM-Tieren könnten ein Hinweis auf die Potenzierung der Einzeleffekte Thoraxtrauma und Blutungsschock sein. In diesem Zusammenhang widerspricht eine abgeklungene IL-6-Ausschüttung zum Zeitpunkt 20 Stunden in keiner Weise der Relevanz des Traumas. Vielmehr unterstreicht sie den hier vorliegenden Ansatz eines nicht-letalen Thoraxtraumas, eines nicht-letalen Blutungsschocks und deren Kombination. Somit werden Untersuchungen auch zu späteren Zeitpunkten ermöglicht.

#### 4.4.3 Interleukin-10

Interleukin-10 ist ein zentrales antiinflammatorisches Zytokin, das einerseits von Zellen des zentralen Nerven- und Immunsystems, andererseits durch die Wirkung von Pharmaka wie z.B. Katecholaminen freigesetzt wird [89]. Es wird im Blut vor allem von CD8(+)T- und CD4(+)Th1-Helferzellen produziert, aktiviert dann Makrophagen und Mastzellen, welche dann ihrerseits ebenfalls IL-10 sezernieren. Es hemmt die Chemotaxis der Monozyten durch Regulation der Makrophagen-Inflammatorischen-Proteine MIP-1 $\alpha$  und -2 [97] und wirkt apoptoseinduzierend auf Th1-Zellen [12]. Fiorentino et al. konnten zeigen, dass IL-10, von ihm auch „cytokine synthesis inhibitory factor“ genannt, die Produktion von Zytokinen wie IL-

2, IL-3, TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und des Wachstumsfaktors GM-CSF in Th1-Zellen hemmt, die Funktion der Th2-Zellen hingegen verschont [32]. IL-10-Ausschüttung reguliert offenbar die Aktivität der ins Gewebe einwandernden neutrophilen Granulozyten [101] und schützt ferner im Rattenmodell vor dem, von TNF- $\alpha$  mitinduzierten Reperfusionsschaden im Lungengewebe [31]. Im Sinne eines negativen Feedbacks schützt es somit den Organismus vor immunologischer Überantwort. Bei dessen Überproduktion, z.B. im Rahmen eines SIRS, scheint es aber zu einer derart starken Verschiebung des Verhältnisses von Th1- zu Th2-Zellen hin zu kommen, dass es für die nachfolgende persistierende Immundepression verantwortlich gemacht wird [48]. Relevant scheint dies bei Patienten mit septischem Krankheitsbild [12, 100] wie auch beim Traumapatienten zu sein. Neutrophile Granulozyten im Blut Schwerverletzter produzieren in der Frühphase nach Trauma vermehrt IL-10 [59]. Erhöhte IL-10-Konzentrationen in der Alveolarflüssigkeit von Lungen polytraumatisierter Patienten korrelierten mit dem Auftreten nosokomialer Pneumonien [76]. Hämorrhagischer Schock hingegen vermindert die Expression von IL-10 in Alveolarmakrophagen der Lunge und könnte somit durch Hemmung antiinflammatorischer Einflüsse die Entstehung von Organschäden begünstigen [53]. Interventionsstudien an männlichen Mäusen im septischen Schock zeigen verbessertes Überleben bei frühzeitiger intraperitonealer IL-10-Substitution [51]. Bei annähernd gleichen IL-10-Konzentrationen im Blut aller Versuchstiergruppen 20 Stunden nach Versuchsbeginn (Abb. 10) scheinen die dort vorhandenen Produzenten, die PBMCs, zu diesem Zeitpunkt keine vermehrte Syntheseleistung für dieses Zytokin aufzuweisen (Abb. 13). Betrachtet man hingegen die hepatischen Kupffer-Sternzellen, zeigen sich hier erhöhte Produktionsmengen in allen Gruppen gegenüber der Kontrolle (Abb. 16). Am deutlichsten fällt dies bei den Kombinationstieren aus, was auf die Potenzierung der immunsuppressiven Effekte beider Pathomechanismen hinweist. Es scheint hier der Einfluss des Thoraxtraumas insgesamt bedeutender. Interessanterweise verhält es sich in der Milz anders (Abb. 19). Tiere, die nur den Blutungsschock erlitten, wiesen die weitaus höchste IL-10-Produktion durch die hier ortsansässigen Makrophagen auf. Das Thoraxtrauma allein scheint keine relevante Immunsuppression in der Milz zum Zeitpunkt 20 Stunden nach Versuchsbeginn auszulösen. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen an der Maus, die zeigten, dass die

Immunodepression bei Milzmakrophagen erst im Bereich von 24 Stunden nach Thoraxtrauma relevant wird [57]. Im Gegensatz dazu scheint die Immunantwort der Kupffer-Sternzellen unmittelbar nach Trauma systemisch wirksam zu werden [11].

#### **4.5 Schlussfolgerungen**

Das vorliegende Modell ist offenbar in der Lage, die Pathomechanismen der schweren Lungenkontusion mit anschließendem hämorrhagischem Schock reproduzierbar zu simulieren, ohne begleitende Letalität hervorzurufen. Atem-, Herzfrequenz- und arterielle Mitteldruckmessung ließen vermuten, dass die physiologischen Kompensationsmechanismen, wie kompensatorische Hyperventilation und Reflextachykardie bei Kombination von Thoraxtrauma und Blutungsschock, geringer ausfielen, sich ferner sogar ins Gegenteil verkehrten. Je nach Verletzungskombination sezernierten hepatische Kupffer-Sternzellen vermehrt  $\text{TNF-}\alpha$  und Interleukin-6. Monozyten im peripheren Blut und Milzmakrophagen erwiesen sich als wichtige Produzenten von Interleukin-10. Das hier vorliegende Thoraxtrauma scheint im Vergleich zum Blutungsschock den größeren Beitrag zur zellulären Immunantwort auf die Kombinationsverletzung zu leisten. Die typischen Veränderungen physiologischer und inflammatorischer Parameter sind nachvollziehbar und stehen im Einklang mit den Ergebnissen bisheriger Untersuchungen. Die hohe klinische Relevanz der Kombination beider Pathomechanismen ist gegeben. Somit scheint das Modell geeignet, weiterführende Untersuchungen durchzuführen.

## 5. Zusammenfassung

Mehrfachverletzungen führen in einer Vielzahl der Fälle zu Komplikationen, die für tausende von Unfallopfern jährlich und weltweit tödlich enden. Sowohl Lungenkontusion als auch Blutungsschock können wie viele andere Verletzungsentitäten für sich alleine bereits relevante Störungen der Immunkompetenz des betroffenen Organismus auslösen. Welche Interaktionen beim Zusammentreffen beider Pathomechanismen auftreten ist bisher nur ansatzweise geklärt. Ziel dieser Studie war es ein nicht letales Kombinationsmodell dieser Verletzungen zu entwickeln und mit den einzelnen Verletzungen zu vergleichen.

Dazu wurden narkotisierte männliche Mäuse in Inhalationsanästhesie mittels Sevofluran entweder einem stumpfen Thoraxtrauma, einem hämorrhagischen Schock, der Kombination aus beidem oder einem Kontrolleingriff unterzogen. Die Brustkorbverletzung wurde hierbei mittels berührungslosem Druckwellentrauma ausgelöst, der Blutungsschock druckkontrolliert mit anschließender Reinfusion der vierfachen Menge an Ringerlaktatlösung etabliert. Dabei wurden die Vitalparameter aller Tiere über 180 Minuten postinterventionell überwacht. Nach 20 Stunden wurden die Lungen der getöteten Tiere operationsmikroskopisch inspiziert und der makroskopische Lungenschaden dokumentiert. Blut, Leber und Milz wurden entnommen. Die Konzentrationen von Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin-6 und -10 wurden einerseits im Plasma und andererseits in den Zellkulturüberständen von isolierten, mit Lipopolysaccharid stimulierten, hepatischen Kupffer-Sternzellen, mononukleären Zellen des peripheren Blutes und Milzmakrophagen gemessen.

Tiergewichte und Druckwellen ergaben keinerlei statistische Unterschiede. Tiere nach alleinigem Thoraxtrauma hyperventilierten signifikant gegenüber der Kontrolle. Blutdruck und Herzfrequenz von Kombinationstieren waren stärker erniedrigt im Vergleich zu den Einzelverletzungen. Die makroskopisch beurteilten Einblutungen der Lungen ergaben subjektiv vergleichbare Intensitäten aller Traumatiergruppen. Die Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Konzentrationen waren 20 Stunden nach Versuchsbeginn im Plasma von den Tieren erhöht, die das Thoraxtrauma alleine oder in Kombination mit einem Blutverlust erhalten hatten. Bei Kombinationstrauma zeigten Kupffer-Sternzellen erhöhte, Monozyten des

peripheren Blutes verminderte Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Sekretion im Vergleich zur Kontrolle. Bei Interleukin-6 waren keine relevanten Konzentrationsunterschiede im Plasma nachweisbar. Kupffer-Sternzellen von Tieren mit alleinigem und kombiniertem Thoraxtrauma sezernierten hiervon mehr, die Monozyten im peripheren Blut nach Kombinationstrauma weniger als die Kontrollen. Bei allen Versuchstiergruppen waren die Plasmakonzentrationen von Interleukin-10 20 Stunden nach Versuchsbeginn annähernd gleich hoch. Zu diesem Zeitpunkt synthetisierten hepatische Kupffer-Sternzellen nach isoliertem und kombiniertem Thoraxtrauma letzteres noch vermehrt. Ebenso verhielten sich die Milzmakrophagen nach alleinigem Blutungsschock.

Der Vergleich physikalischer Messgrößen deutete auf eine gleichwertige Intensität der Pathomechanismen in den entsprechenden Versuchstiergruppen hin. Die Vitalparameter schienen beim Kombinationstrauma jeweils mehr gestört zu sein, was hier auf einen Summationseffekt der Schwere der Einzelverletzungen hindeutete. Die immunologischen Untersuchungsergebnisse ließen vermuten, dass zum Zeitpunkt 20 Stunden nach Thoraxtrauma mit anschließendem Blutungsschock und kristalloidem Volumenersatz die proinflammatorische Immunantwort der hepatischen Kupffer-Sternzellen bereits zum Tragen kam, während die antiinflammatorischen Effekte der Milzmakrophagen noch kaum nachweisbar waren. Der dem Thoraxtrauma folgende Schock verstärkte die Immunantwort nur unerheblich. In Zusammenschau der Befunde ließ sich aber vermuten, dass das Thoraxtrauma im Vergleich zum Blutungsschock den größeren Stimulus für die Immunantwort darstellt und somit führend für die Prognose nach Kombinationsverletzung sein könnte.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse daraufhin, dass das entwickelte, nicht-letale Modell reproduzierbare Ergebnisse liefert und typische Veränderungen inflammatorischer Parameter nach stumpfem Thoraxtrauma mit anschließendem Blutungsschock erfasst.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abraham E, Chang YH: Generation of functionally active suppressor cells by haemorrhage and haemorrhagic serum. *Clin Exp Immunol* 72: 238-242 (1988)
2. Abraham E, Freitas AA: Hemorrhage in mice induces alterations in immunoglobulin-secreting B cells. *Crit Care Med* 17: 1015-1019 (1989)
3. Angele MK, Knöferl MW, Schwacha MG, Ayala A, Bland KI, Cioffi WG, Josephson SL, Chaudry IH: Hemorrhage decreases macrophage inflammatory protein 2 and interleukin-6 release: a possible mechanism for increased wound infection. *Ann Surg* 229: 651-660 (1999)
4. Angele MK, Knöferl MW, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Sex steroids regulate pro- and anti-inflammatory cytokine release by macrophages after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol* 277: C35-C42 (1999)
5. Arbabi S, Jurkovich GJ, Wahl WL, Franklin GA, Hemmila MR, Taheri PA, Maier RV: A comparison of prehospital and hospital data in trauma patients. *J Trauma* 56: 1029-1032 (2004)
6. Arroliga AC, Ghamra ZW, Perez Trepichio A, Perez Trepichio P, Komara JJ, Jr., Smith A, Wiedemann HP: Incidence of ARDS in an adult population of northeast Ohio. *Chest* 121: 1972-6 (2002)
7. Aufmkolk M, Ruchholtz S, Hering M, Waydhas C, Nast-Kolb D: The value of subjective estimation of the severity of thoracic injuries by the emergency surgeon. *Unfallchirurg* 106: 746-753 (2003)
8. Avecillas JF, Freire AX, Arroliga AC: Clinical epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: incidence, diagnosis, and outcomes. *Clin Chest Med* 27: 549-57; abstract vii (2006)

9. Axelsson H, Hjelmqvist H, Medin A, Persson JK, Suneson A: Physiological changes in pigs exposed to a blast wave from a detonating high-explosive charge. *Mil Med* 165: 119-126 (2000)
10. Ayala A, Perrin MM, Wang P, Ertel W, Chaudry IH: Hemorrhage induces enhanced Kupffer cell cytotoxicity while decreasing peritoneal or splenic macrophage capacity. Involvement of cell-associated tumor necrosis factor and reactive nitrogen. *J Immunol* 147: 4147-4154 (1991)
11. Ayala A, Perrin MM, Ertel W, Chaudry IH: Differential effects of hemorrhage on Kupffer cells: decreased antigen presentation despite increased inflammatory cytokine (IL-1, IL-6 and TNF) release. *Cytokine* 4: 66-75 (1992)
12. Ayala A, Chung CS, Song GY, Chaudry IH: IL-10 mediation of activation-induced TH1 cell apoptosis and lymphoid dysfunction in polymicrobial sepsis. *Cytokine* 14: 37-48 (2001)
13. Baillie HM: Understanding shock: a brief history. *Can J Gen Intern Med* 3: 22-25 (2008)
14. Banks P, Franks NP, Dickinson R: Competitive inhibition at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor mediates xenon neuroprotection against hypoxia-ischemia. *Anesthesiology* 112: 614-622 (2010)
15. Bansal V, Fortlage D, Lee JG, Costantini T, Potenza B, Coimbra R: Hemorrhage is more prevalent than brain injury in early trauma deaths: the golden six hours. *Eur J Trauma Emerg Surg* 35: 26-30 (2009)
16. Bansch P, Lundblad C, Grande PO, Bentzer P: A model for evaluating the effects of blunt skeletal muscle trauma on microvascular permeability and plasma volume in the rat. *Shock* 33: 399-404 (2010)

17. Batchinsky AI, Skinner JE, Necsoiu C, Jordan BS, Weiss D, Cancio LC: New measures of heart-rate complexity: effect of chest trauma and hemorrhage. *J Trauma* 68: 1178-1185 (2010)
18. Beck-Schimmer B, Breitenstein S, Urech S, De Conno E, Wittlinger M, Puhan M, Jochum W, Spahn DR, Graf R, Clavien PA: A randomized controlled trial on pharmacological preconditioning in liver surgery using a volatile anesthetic. *Ann Surg* 248: 909-918 (2008)
19. Chakkarapani E, Dingley J, Liu X, Hoque N, Aquilina K, Porter H, Thoresen M: Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. *Ann Neurol* 68: 330-341 (2010)
20. Champion H, Copes W, Sacco W, Lawnick M, Keast S, Bain L, Jr., Flanagan M, Frey C: The Major Trauma Outcome Study: establishing national norms for trauma care. *J Trauma* 30: 1356-1365 (1990)
21. Clark GC, Schechter WP, Trunkey DD: Variables affecting outcome in blunt chest trauma: flail chest vs. pulmonary contusion. *J Trauma* 28: 298-304 (1988)
22. Damon EG, Richmond DR, White CS: Effects of ambient pressure on the tolerance of mice to air blast. *Aerosp Med* 37: 341-347 (1966)
23. Dancewicz R, Barcikowski S, Ceder A, Nowak H: Lung injuries caused by explosion in rabbits. 1. The experimental model of the injury. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe* 21: 85-90 (1988)
24. Deitch E: Multiple organ failure: pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 216: 117-134 (1992)
25. Deitch EA: Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* 9: 1-11 (1998)
26. Dodd KT, Mundie TG, Lagutchik MS, Morris JR: Cardiopulmonary effects of high-impulse noise exposure. *J Trauma* 43: 656-666 (1997)

27. Dutton RP, Mackenzie CF, Scalea TM: Hypotensive resuscitation during active hemorrhage: impact on in-hospital mortality. *J Trauma* 52: 1141-1146 (2002)
28. Ehrlich PF, Seidman PS, Atallah O, Haque A, Helmkamp J: Endotracheal intubations in rural pediatric trauma patients. *J Pediatr Surg* 39: 1376-1380 (2004)
29. Einsiedel T, Liener U, Brinkmann A, Träger K, Liewald F, Perner S, Kinzl L, Gebhard F: Fatal outcome after multiple trauma. The thoracic injury as the decisive factor. *Unfallchirurg* 106: 771-776 (2003)
30. Elena G, Amerio N, Ferrero P, Bay ML, Valenti J, Colucci D, Puig NR: Effects of repetitive sevoflurane anaesthesia on immune response, select biochemical parameters and organ histology in mice. *Lab Anim* 37: 193-203 (2003)
31. Eppinger MJ, Ward PA, Bolling SF, Deeb GM: Regulatory effects of interleukin-10 on lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112: 1301-1305 (1996)
32. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR: Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170: 2081-2095 (1989)
33. Flier S, Post J, Concepcion AN, Kappen TH, Kalkman CJ, Buhre WF: Influence of propofol-opioid vs isoflurane-opioid anaesthesia on postoperative troponin release in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Br J Anaesth* 105: 122-130 (2010)
34. Fowler R, Pepe PE: Fluid resuscitation of the patient with major trauma. *Curr Opin Anaesthesiol* 15: 173-178 (2002)
35. Fricke R, Bartel M: Animal experimental model of lung contusion. *Z Exp Chir* 15: 172-176 (1982)

36. Gaillard M, Herve C, Mandin L, Raynaud P: Mortality prognostic factors in chest injury. *J Trauma* 30: 93-96 (1990)
37. Gavelli G, Canini R, Bertaccini P, Battista G, Bna C, Fattori R: Traumatic injuries: imaging of thoracic injuries. *Eur Radiol* 12: 1273-1294 (2002)
38. Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, Strecker W, Kinzl L, Brückner UB: Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? *Arch Surg* 135: 291-295 (2000)
39. Goris RJ: MODS/SIRS: Result of an overwhelming inflammatory response? *World J Surg* 20: 418–421 (1996)
40. Gryth D, Rocksen D, Drobin D, Druid H, Weitzberg E, Bursell J, Olsson LG, Arborelius UP: Effects of fluid resuscitation with hypertonic saline dextrane or Ringer's acetate after nonhemorrhagic shock caused by pulmonary contusion. *J Trauma* 69: 741-748 (2010)
41. Guy RJ, Kirkman E, Watkins PE, Cooper GJ: Physiologic responses to primary blast. *J Trauma* 45: 983-987 (1998)
42. Haupt WJ: Die Bedeutung der Monozytenfunktion für die Entwicklung einer Sepsis nach chirurgischen Eingriffen und Perspektiven der immunomodulatorischen Intervention. Medizinische Habilitationsschrift, Universität Erlangen (1996)
43. Hietbrink F, Koenderman L, Rijkers G, Leenen L: Trauma: the role of the innate immune system. *World J Emerg Surg* 1: 15 (2006)
44. Hoff SJ, Shotts SD, Eddy VA, Morris JA, Jr.: Outcome of isolated pulmonary contusion in blunt trauma patients. *Am Surg* 60: 138-142 (1994)
45. Inthorn D, Huf R: Thoracic trauma in multiple trauma. *AINS* 27: 498-501 (1992)

46. Inthorn D: Effect of Antithrombin III (AT III) on Inflammatory Immune Response in Patients with Sepsis. *Shock* 8: 328-334 (1997)
47. Irwin RJ, Lerner MR, Bealer JF, Brackett DJ, Tuggle DW: Cardiopulmonary physiology of primary blast injury. *J Trauma* 43: 650-655 (1997)
48. Iwasaka H, Noguchi T: Th1/Th2 balance in systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Nippon Rinsho* 62: 2237-2243 (2004)
49. Jaffin JH, McKinney L, Kinney RC, Cunningham JA, Moritz DM, Kraimer JM, Graeber GM, Moe JB, Salander JM, Harmon JW: A laboratory model for studying blast overpressure injury. *J Trauma* 27: 349-356 (1987)
50. Jawa RS, Anillo S, Huntoon K, Baumann H, Kulaylat M: Interleukin 6 in Surgery, Trauma, and Critical Care--Part II: Clinical Applications. *J Intensive Care Med*: <http://jic.sagepub.com/content/early/2010/11/17/0885066610384188.abstract> 19.02.2011 (2010 published online before print)
51. Kahlke V, Dohm C, Mees T, Brotzmann K, Schreiber S, Schroder J: Early interleukin-10 treatment improves survival and enhances immune function only in males after hemorrhage and subsequent sepsis. *Shock* 18: 24-28 (2002)
52. Kelley J: Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 141: 765-788 (1990)
53. Khadaroo RG, Fan J, Powers KA, Fann B, Kapus A, Rotstein OD: Impaired induction of IL-10 expression in the lung following hemorrhagic shock. *Shock* 22: 333-339 (2004)
54. Knöferl MW, Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Do different rates of fluid resuscitation adversely or beneficially influence immune responses after trauma-hemorrhage? *J Trauma* 46: 23-33 (1999)
55. Knöferl MW, Diodato MD, Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Do female sex steroids adversely or beneficially affect the

- depressed immune responses in males after trauma-hemorrhage? Arch Surg 135: 425-433 (2000)
56. Knöferl MW, Liener UC, Seitz DH, Perl M, Brückner U, Kinzl L, Gebhard F: Cardiopulmonary, histological and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. Shock 19: 519-525 (2003)
  57. Knöferl MW, Liener UC, Perl M, Brückner UB, Kinzl L, Gebhard F: Blunt chest trauma induces delayed splenic immunosuppression. Shock 22: 51-56 (2004)
  58. Koch T, Heller S: Sepsis, SIRS: Pathomechanismen und therapeutische Ansätze. Anästhesiologie & Intensivmedizin 7/8: 386-403 (1996)
  59. Koller M, Clasbrummel B, Kollig E, Hahn MP, Muhr G: Major injury induces increased production of interleukin-10 in human granulocyte fractions. Langenbecks Arch Chir 383: 460-465 (1998)
  60. Kreimeier U, Lackner CK, Pruckner S, Ruppert M, Peter K: Permissive hypotension in severe trauma. Anaesthesist 51: 787-799 (2002)
  61. Krohn PL, Whitteridge D, Zuckerman SH: Physiological effects of blast. Lancet 28: 252-258 (1942)
  62. Lawin P, Prien T: Der schwerverletzte Patient. AINS 27: 489-492 (1992)
  63. Le Tulzo Y, Shenkar R, Kaneko D, Moine P, Fantuzzi G, Dinarello CA, Abraham E: Hemorrhage increases cytokine expression in lung mononuclear cells in mice: involvement of catecholamines in nuclear factor-kappaB regulation and cytokine expression. J Clin Invest 99: 1516-1524 (1997)
  64. Liener UC, Gebhard F, Kinzl L: Unfallchirurgie 2020. Entwicklungen der Vergangenheit - Herausforderungen und Perspektiven der Zukunft. Teil 1: Unfallchirurgische Versorgung. Unfallchirurg 102: 413-420 (1999)

65. Liener UC, Perl M, Huber-Lang MS, Seitz DH, Bruckner UB, Gebhard F, Knöferl MW: Is the function of alveolar macrophages altered following blunt chest trauma? *Langenbecks Arch Surg* 396: 251-259 (2011)
66. LoCicero J, III, Mattox KL: Epidemiology of chest trauma. *Surg Clin North Am* 69: 15-19 (1989)
67. Mackinnon MA: Permissive hypotension: a change in thinking. *Air Med J* 24: 70-72 (2005)
68. Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ: Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med* 23: 1638-1652 (1995)
69. Melton SM, Davis KA, Moomey CB, Fabian TC, Proctor KG: Mediator-dependent secondary injury after unilateral blunt thoracic trauma. *Shock* 11: 396-402 (1999)
70. Metzler, Poeschel: Gesundheitsbericht für Deutschland. Statistisches Bundesamt (1998)
71. Mongardon N, Dyson A, Singer M: Is MOF an outcome parameter or a transient, adaptive state in critical illness? *Curr Opin Crit Care* 15: 431-436 (2009)
72. Mongardon N, Singer M: The evolutionary role of nutrition and metabolic support in critical illness. *Crit Care Clin* 26: 443-450 (2010)
73. Moomey CB, Fabian TC, Croce MA, Melton SM, Proctor KG: Cardiopulmonary function after pulmonary contusion and partial liquid ventilation. *J Trauma* 45: 283-290 (1998)
74. Moomey CB, Fabian TC, Croce MA, Melton SM, Proctor KG: Determinants of myocardial performance after blunt chest trauma. *J Trauma* 45: 988-996 (1998)

75. Moseley RV, Vernick JJ, Doty DB: Response to blunt chest injury: a new experimental model. *J Trauma* 10: 673-683 (1970)
76. Muehlstedt SG, Lyte M, Rodriguez JL: Increased IL-10 production and HLA-DR suppression in the lungs of injured patients precede the development of nosocomial pneumonia. *Shock* 17: 443-450 (2002)
77. Nast-Kolb D, Waydhas C, Jochum M, Duswald KH, Machleidt W, Spannagl M, Schramm W, Fritz H, Schweiberer L: Biochemical factors as objective parameters for assessing the prognosis in polytrauma. *Unfallchirurg* 95: 59-66 (1992)
78. Nast-Kolb D, Waydhas C, Gippner-Steppert C, Schneider I, Trupka A, Ruchholtz S, Zettl R, Schweiberer L, Jochum M: Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ failure in patients with multiple injuries. *J Trauma* 42: 446-454 (1997)
79. Nathens A, Marshall J: Sepsis, SIRS, and MODS: What's in a Name? *World J Surg* 20: 386-391 (1996)
80. Nelson LD: New advances in the care of critically injured patients. *New Horizons* 7: 1-172 (1999)
81. Neugebauer E, Hensler T, Rose S, Maier B, Holanda M, Raum M, Rixen D, Marzi I: Severe craniocerebral trauma in multiple trauma. An assessment of the interaction of local and systemic mediator responses. *Unfallchirurg* 103: 122-131 (2000)
82. Obertacke U, Neudeck F, Majetschak M, Hellinger A, Kleinschmidt C, Schade FU, Hogasen K, Jochum M, Strohmeier W, Thurnher M, Redl H, Schlag G: Local and systemic reactions after lung contusion: an experimental study in the pig. *Shock* 10: 7-12 (1998)
83. Oppenheimer L, Craven KD, Forkert L, Wood LD: Pathophysiology of pulmonary contusion in dogs. *J Appl Physiol* 47: 718-728 (1979)

84. Pinilla JC: Acute respiratory failure in severe blunt chest trauma. *J Trauma* 22: 221-226 (1982)
85. Puig NR, Ferrero P, Bay ML, Hidalgo G, Valenti J, Amerio N, Elena G: Effects of sevoflurane general anesthesia: immunological studies in mice. *Int Immunopharmacol* 2: 95-104 (2002)
86. Raeburn CD, Sheppard F, Barsness KA, Arya J, Harken AH: Cytokines for surgeons. *Am J Surg* 183: 268-273 (2002)
87. Ratliff JL: The risk of anticoagulation with experimental pulmonary contusion. *Arch Surg* 109: 802-804 (1974)
88. Regel G, Lobenhoffer P, Grotz M, Pape HC, Lehmann U, Tscherne H: Treatment results of patients with multiple trauma: an analysis of 3406 cases treated between 1972 and 1991 at a German Level I Trauma Center. *J Trauma* 38: 70-78 (1995)
89. Reith HB, Mittelkötter U: Markers of inflammation for prognosis and control of therapeutic success in patients with abdominal sepsis - options for using adjuvant intravenous immunoglobulins. In: Faist E. (Hrsg): *Immunological screening and immunotherapy in critically ill patients with abdominal infections*. Springer, Berlin Heidelberg New York: S15-27 (2001)
90. Richmond DR, Damon EG, Fletcher ER, Bowen IG, White CS: The relationship between selected blast-wave parameters and the response of mammals exposed to air blast. *Ann N Y Acad Sci* 152: 103-121 (1968)
91. Ruchholtz S, Lefering R, Paffrath T, Oestern HJ, Neugebauer E, Nast-Kolb D, Pape HC, Bouillon B: Reduction in mortality of severely injured patients in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 105: 225-231 (2008)
92. Sanders RD, Manning HJ, Robertson NJ, Ma D, Edwards AD, Hagberg H, Maze M: Preconditioning and postinsult therapies for perinatal hypoxic-ischemic injury at term. *Anesthesiology* 113: 233-249 (2010)

93. Schmidt U, Muggia-Sullam M, Holch M, Kant CJ, Frame SB, Rowe DW, Nerlich M, Maull KI, Tscherne H: Primärversorgung des Polytraumas-Vergleich eines deutschen und amerikanischen Luftrettungssystems. *Unfallchirurg* 96: 287-291 (1993)
94. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A: Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 114: 5-14 (2004)
95. Schwacha MG, Schneider CP, Chaudry IH: Differential expression and tissue compartmentalization of the inflammatory response following thermal injury. *Cytokine* 17: 266-274 (2002)
96. Seitz DH, Perl M, Liener UC, Tauchmann B, Braumüller ST, Brückner UB, Gebhard F, Knoferl MW: Inflammatory alterations in a novel combination model of blunt chest trauma and hemorrhagic shock. *J Trauma* 70: 189-196 (2011)
97. Shanley TP, Vasi N, Denenberg A: Regulation of chemokine expression by IL-10 in lung inflammation. *Cytokine* 12: 1054-1064 (2000)
98. Shenkar R, Abraham E: Hemorrhage induces rapid in vivo activation of CREB and NF- $\kappa$ B in murine intraparenchymal lung mononuclear cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 145-152 (1997)
99. Shorr RM, Crittenden M, Indeck M, Hartunian SL, Rodriguez A: Blunt thoracic trauma. Analysis of 515 patients. *Ann Surg* 206: 200-205 (1987)
100. Song GY, Chung CS, Chaudry IH, Ayala A: What is the role of interleukin 10 in polymicrobial sepsis: anti-inflammatory agent or immunosuppressant? *Surgery* 126: 378-383 (1999)
101. Standiford TJ, Strieter RM, Greenberger MJ, Kunkel SL: Expression and regulation of chemokines in acute bacterial pneumonia. *Biol Signals* 5: 203-208 (1996)

102. Stellin G: Survival in trauma victims with pulmonary contusion. *Am Surg* 57: 780-784 (1991)
103. Stephan RN, Kupper TS, Geha AS, Baue AE, Chaudry IH: Hemorrhage without tissue trauma produces immunosuppression and enhances susceptibility to sepsis. *Arch Surg* 122: 62-68 (1987)
104. Steurer M, Schlapfer M, Z'Graggen B R, Booy C, Reyes L, Spahn DR, Beck-Schimmer B: The volatile anaesthetic sevoflurane attenuates lipopolysaccharide-induced injury in alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 155: 224-30 (2009)
105. Strecker W, Gebhard F, Rager J, Brückner UB, Steinbach G, Kinzl L: Early biochemical characterization of soft-tissue trauma and fracture trauma. *J Trauma* 47: 358-364 (1999)
106. Strecker W, Gebhard F, Perl M, Rager J, Buttenschön K, Kinzl L, Beck A: Biochemical characterization of individual injury pattern and injury severity. *Injury* 34: 879-887 (2003)
107. Trupka A, Waydhas C, Nast-Kolb D, Schweiberer L: Effect of early intubation on the reduction of post-traumatic organ failure. *Unfallchirurg* 98: 111-117 (1995)
108. Trupka A, Kierse R, Waydhas C, Nast-Kolb D, Blahs U, Schweiberer L, Pfeifer KJ: Shock room diagnosis in polytrauma. Value of thoracic CT. *Unfallchirurg* 100: 469-476 (1997)
109. Trupka A, Waydhas C, Hallfeldt KK, Nast-Kolb D, Pfeifer KJ, Schweiberer L: Value of thoracic computed tomography in the first assessment of severely injured patients with blunt chest trauma: results of a prospective study. *J.Trauma* 43: 405-411 (1997)
110. Trupka A, Nast-Kolb D, Schweiberer L: Thoracic trauma. *Unfallchirurg* 101: 244-258 (1998)

111. Zellweger R, Zhu XH, Wichmann MW, Ayala A, DeMaso CM, Chaudry IH: Prolactin administration following hemorrhagic shock improves macrophage cytokine release capacity and decreases mortality from subsequent sepsis. *J Immunol* 157: 5748-5754 (1996)

## 7. Danksagung

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die seit frühester Kindheit mein Interesse an den Wissenschaften gefördert haben und mir auch in schweren Zeiten stets zur Seite gestanden sind.

Herrn Prof. Dr. L. Kinzl und Herrn Prof. Dr. F. Gebhard danke ich sehr für die freundliche Überlassung des Themas, sowie die mir gewährte Unterstützung in allen Bereichen beim Zustandekommen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. W. Knöferl, meinem Betreuer, gilt besonderer Dank für die intensive Einführung in die Materie und für seine Geduld. Ich konnte stets von seinem großen Erfahrungsschatz, sowohl in klinischen als auch in experimentellen Fragestellungen profitieren.

Frau Sonja Braumüller, unserer MTA im Traumalabor, bin ich ebenfalls zu großem Dank verpflichtet. Von den vielen Techniken und Handgriffen, die sie mir beigebracht hat, werde ich mein Leben lang profitieren.

Meinen Mitdoktoranden Julia Schneider, Dr. Daniel Seitz und Christian Büttner, danke ich für die tolle Zeit, die wir miteinander im Keller von Haus IV erlebt haben.