

UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM
ZENTRUM FÜR CHIRURGIE

Klinik für Unfallchirurgie, Hand-, Plastische- und
Wiederherstellungschirurgie
Ärztlicher Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. F. Gebhard

APOPTOSE UND AKTIVIERUNG VON
POLYMORPHKERNIGEN GRANULOZYTEN UND DEREN
EINFLUSS AUF DIE LOKALE UND SYSTEMISCHE
ENTZÜNDUNGSREAKTION NACH EINEM STUMPFEN
THORAXTRAUMA

Dissertation

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

vorgelegt von

MANUEL ALEXANDER KIENINGER

geboren in Ellwangen

2012

AMTIERENDER DEKAN: Prof. Dr. T. Wirth

1. BERICHTERSTATTER: Prof. Dr. M. Perl

2. BERICHTERSTATTER: Prof. Dr. H.-J. Groß

TAG DER PROMOTION: 16.11.2012

Meinen wunderbaren Eltern

Inhaltsverzeichnis	I
INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Bedeutung des Traumas	1
1.2 Thoraxtrauma	1
1.2.1 Bedeutung des Thoraxtraumas	1
1.2.2 Pathophysiologie des Thoraxtraumas	2
1.3 Bedeutung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN)	4
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	6
2 MATERIAL UND METHODIK	8
2.1 Versuchsaufbau	8
2.1.1 Druckwellengenerator	8
2.1.2 Druckwellenentstehung	8
2.1.3 Narkose	8
2.1.4 Versuchstiere	9
2.2 Hauptversuche	9
2.2.1 Gruppeneinteilung	9
2.2.2 Versuchsablauf	10
2.2.3 Analysen	11
2.3 Statistik	19
3 ERGEBNISSE	21
3.1 Hauptversuche	21
3.1.1 Versuch 1: Aktivierung und Apoptose von PMN	21
3.1.2 Versuch 2: Depletion von PMN	23
4 DISKUSSION	34
4.1 Oberflächenrezeptoren	35
4.2 Apoptose	38
4.3 PMN-Verhalten im Blut und der BAL sowie MPO-Aktivität	40

Inhaltsverzeichnis	II	
<hr/>		
4.4	Entzündungsantwort	42
4.5	Organschädigung der Lunge	49
4.6	Schlussfolgerungen	50
5	ZUSAMMENFASSUNG	51
6	LITERATURVERZEICHNIS	53

ANHANG

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ALI	Acute lung injury
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
DNA	Desoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FiO ₂	Sauerstoffanteil der Atemluft
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde(n)
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IL	Interleukin
ISS	Injury Severity Score
i.v.	intravenös
KC	Cytokine-induced neutrophil chemoattractant
kg	Kilogramm
LPS	Lipopolysaccharid
MAC-1	Macrophage-1 antigen
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
Min	Minute(n)
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein-1 α
MIP-2	Macrophage inflammatory protein-2
ml	Milliliter
MOF	Multiple Organ Failure
MPO	Myeloperoxidase
PaO ₂	Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut
PBS	Phosphate Buffered Saline

PE	R-Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
pH	Potentia Hydrogenii
PMN	Polymorphkernige Granulozyten
RNA	Ribonucleic acid
Rpm	Revolutions per minute
SEM	Standard error of the mean
Sham	Kontrollgruppe
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SNK	Student-Newman-Keuls Test
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TxT	Thoraxtrauma
x g	Vielfaches der relativen Zentrifugalkraft
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D

1 EINLEITUNG

1.1 Bedeutung des Traumas

Das Trauma stellt die häufigste Todesursache der unter 44-jährigen dar (4) und ist verbunden mit jährlichen Ausgaben des Gesundheitssystems in den USA von 44 Milliarden US-Dollar (29). In Deutschland versterben jährlich etwa 20.000 Menschen an den Folgen eines Unfalls (187). Es wird einerseits unterschieden zwischen dem frühen Tod von Unfallpatienten, z.B. durch traumatisch-hämorrhagischen Schock oder Schädel-Hirn-Trauma (9), und andererseits einer bedeutsamen Spätletalität, z.B. durch Sepsis und Multiorganversagen (MOF) (128).

1.2 Thoraxtrauma

1.2.1 Bedeutung des Thoraxtraumas

Das Thoraxtrauma stellt die zweithäufigste Todesursache bei Unfallopfern dar und verursacht damit 25 % der durch ein Trauma bedingten Todesfälle (177,180). Die Einteilung des Thoraxtraumas erfolgt in penetrierend und stumpf (59). Nach klinischen Erhebungen ist das Thoraxtrauma bei polytraumatisierten Patienten zu etwa 50 % am Verletzungsmuster beteiligt (66,92). Im Rahmen einer Polytraumatisierung bei einer Studie in der Bundesrepublik stellte das Thoraxtrauma mit 45 % die häufigste relevante Verletzung dar, noch vor den Extremitätenverletzungen mit 42 % (9). Die Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie bestätigt ebenso im Traumaregister das Thoraxtrauma als hochrelevante Verletzungsform. Beim Polytrauma (Injury-Severity-Score (ISS) > 16) kommt es in 62 % zu einer Mitverletzung im Thoraxbereich. Somit ist der Brustkorb neben dem Schädel-Hirn-Bereich die am häufigsten betroffene Körperregion (43).

Die Lungenkontusion ist eine häufige Folge des Thoraxtraumas. Beim stumpfen Thoraxtrauma kommt es in ca. 26 % der Fälle zu einer Kontusion des Lungengewebes (107). Auch für das Auftreten eines Multiorganversagens im Sinne extrapulmonaler Organfunktionsstörungen ist das Thoraxtrauma bzw. die Lungenkontusion ein bedeutender Wegbereiter (200).

Liegt die Letalität bei Patienten mit isoliertem Thoraxtrauma nur bei 0-5 % (87), bedeutet eine Kombination von Thoraxtrauma und einer weiteren Zusatzverletzung eine Erhöhung der Sterblichkeitsraten bei Patienten unter 60 Jahren auf 15-20 %. Bei Menschen über 60

Jahren steigt die Letalität sogar bis zu 40 % an (189,200). Wird eine begleitende Lungenkontusion beim polytraumatisierten Unfallverletzten diagnostiziert, erhöht sich die Sterblichkeit im Vergleich zum Polytrauma ohne Thoraxkomponente von 27 % auf 56 % (66).

Die möglichen Ursachen, die zu einer derart hohen Letalität in Verbindung mit dem Thoraxtrauma bzw. der Lungenkontusion führen, sind bis dato noch unzureichend geklärt. Das Thoraxtrauma nimmt einerseits wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung später auftretender Komplikationen wie z. B. Pneumonie und „Acute Respiratory Distress Syndrome“ (ARDS). Diesbezüglich variiert die Inzidenz von ARDS zwischen 22 % nach moderater bis 82 % nach schwerer Lungenkontusion (126). Andererseits bewirkt ein begleitendes Thoraxtrauma auch ein vermehrtes Auftreten extrapulmonaler Organfunktionsstörungen bis hin zur posttraumatischen Multiorgandysfunktion und führt somit zu einer schlechteren Prognose des Polytraumas (142,180,200).

Beim akuten Lungenversagen wird zwischen der akuten Lungenschädigung (ALI) und dem ARDS unterschieden. Pathophysiologisch entwickeln sich beide gleich, man unterscheidet allein anhand der unterschiedlichen Werte der $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ -Ratio, welche für ALI < 300 und für ARDS < 200 ist. Die ALI stellt somit die leichtere, das ARDS die im Ausmaß schwerere Form der Lungenfunktionsstörung dar (205). Die akute Lungenschädigung kann direkte (pulmonale) oder indirekte (extrapulmonale) Auslöser haben (119). Ungefähr 55 % der akuten Lungenschädigung werden der direkten Schädigung (z.B. Pneumonie oder Aspiration) zugeschrieben, wohingegen die indirekte Schädigung in 20 % der Fälle beobachtet wird. Beispiele hierfür sind extrapulmonale Sepsis und Trauma (14,148,205). In ca. 21 % wird die akute Lungenschädigung durch Mischformen ausgelöst. Bei den verbliebenen 4 % bleibt die Pathophysiologie ungeklärt (22). Die Inzidenz von ALI und ARDS in den USA beträgt 79 bzw. 59 pro 100.000 Personen pro Jahr

Zusammenfassend besitzt das Thoraxtrauma somit als Monoverletzung sowie vor allem auch als Begleitverletzung beim Polytrauma eine hohe Morbidität. Im Rahmen einer Mehrfachverletzung nimmt es zudem bedeutsamen Einfluss auf die Letalität.

1.2.2 Pathophysiologie des Thoraxtraumas

1.2.2.1 Klinische Auswirkungen

Im Vordergrund steht nach Traumatisierung des Thoraxes mit Lungenschädigung die Beeinträchtigung der respiratorischen Funktion. Die ALI und das ARDS stellen eine Form

der Lungendysfunktion dar, welche durch Hypoxämie und diffuse bilaterale Infiltrate der Lunge charakterisiert ist. Als Folge treten ein Lungenödem, eine Reduktion der funktionellen Residualkapazität sowie der Lungencompliance auf (13,209). Ursächlich hierfür ist eine Beeinträchtigung der alveolokapillären Membran mit nachfolgendem interstitiellem und alveolärem Ödem. Dies behindert den Gasaustausch und führt zur pulmonalen Organdysfunktion mit respiratorischem Versagen (205).

1.2.2.2 Histologische Veränderungen

Histologische Schädigungen des Lungenparenchyms korrelieren ebenfalls mit den genannten Funktionseinschränkungen. Nach Thoraxtrauma beobachtet man dys- bis atelektatische Lungenbereiche mit Verbreiterung der Alveolarsepten und Destruktion der Alveolararchitektur (40,98). Des Weiteren werden Endothelschwellung, perivaskuläre Ödeme und Fettembolien gefunden (163). Auch alveoläre und intrabronchiale Einblutungen lassen sich darstellen (98). Im weiteren Verlauf kann es dann durch Beeinträchtigung der alveolokapillären Barriere zu einer Permeabilitätsstörung und dadurch bedingt zu interstitiellen pulmonalen Ödemen kommen (163). Auch eine Aktivierung und Rekrutierung von Abwehrzellen, insbesondere polymorphkerniger Granulozyten (PMN) (163) sowie von Monozyten/ Makrophagen, die ihrerseits pro- und antiinflammatorische Mediatoren freisetzen, kann nachgewiesen werden (5,104,149).

Die Akkumulation aktivierter PMN im Lungenparenchym scheint in der Pathophysiologie der ALI von besonderer Bedeutung zu sein (77,205).

1.2.2.3 Inflammatorische Antwort und Immunsuppression nach Thoraxtrauma

Schon früh nach der Verletzung des Lungenparenchyms kommt es zu lokalen entzündlichen Reaktionen wie Einwanderung aktivierter PMN mit zunehmender Degranulation und Mediatorfreisetzung (5,138,163). Ebenfalls kann eine lokale Inaktivierung des Surfactants verzeichnet werden (163). Diese Veränderungen lassen sich bei einseitiger pulmonaler Traumatisierung nicht nur in der kontusionierten, sondern auch in der unverletzten Lunge nachweisen (40). Das metabolisch hochaktive Lungenparenchym selbst ist ebenfalls reich an präformierten Entzündungsmediatoren, die nach mechanischem Trauma freigesetzt werden (152). Klinischen Studien zur Folge scheint ein systemischer Anstieg vasoaktiver Prostaglandine nach Schädigung des Lungengewebes an der Entstehung des ARDS mitbeteiligt zu sein (40,72). Wird Blut von Tieren mit Thoraxtrauma auf gesunde Tiere transfundiert, lässt sich bei diesen eine Verschlechterung der Compliance der Lungenfunktion darstellen (124).

Daneben können oben genannte systemische Einflüsse des Traumas durch zirkulierende Entzündungsmediatoren für die Entwicklung einer generalisierten inflammatorischen Reaktion und für den weiteren Verlauf, zum Beispiel einer konsekutiven Immunsuppression, eine bedeutsame Rolle spielen. Verschiedene Arbeitsgruppen wiesen diese posttraumatische Immunsuppression nach hämorrhagischem Schock, Verbrennung, Verletzung von Weichteilgewebe oder Fraktur nach (10,123,211,215). Im Rahmen des Thoraxtraumas zeigte sich ebenfalls eine verminderte Zytokinproduktion der Splenozyten und Makrophagen in der Milz (97). Darüber hinaus kam es zu einer Funktionsbeeinträchtigung der Peritonealmakrophagen nach Thoraxtrauma im Kleintiermodell der Maus (151). Diese posttraumatische Immundysfunktion scheint für eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber infektiösen Komplikationen verantwortlich zu sein (137,178,211). Bezüglich des Thoraxtraumas wurde hier gezeigt, dass eine nachfolgende Sepsis zu einer signifikant höheren Letalität führt als eine Sepsis bzw. ein Thoraxtrauma allein (151).

Die immunologischen Veränderungen nach Thoraxtrauma mit ihren Auswirkungen auf den Gesamtorganismus, aber auch die Mechanismen, die letztendlich zur Entwicklung eines respiratorischen Versagens führen, sind nur unzureichend geklärt. Daher sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um die Pathophysiologie des Thoraxtraumas näher zu beleuchten und somit ggf. neue Therapieansätze entwickeln zu können.

1.3 Bedeutung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN)

PMN bilden den Hauptteil der Granulozyten im Blut und sind essentieller Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie besitzen eine zentrale Stellung in der Bekämpfung bakterieller und durch Pilze bedingter Infektionen. Als terminal differenzierte Zellen haben sie nur eine kurze Lebenszeit; in Abwesenheit adäquater aktivierender Stimuli beträgt diese in der Zirkulation 8 bis 20 Stunden (54).

Allerdings können PMN auch an der Entstehung von Organschäden beteiligt sein. Früh während einer Infektion kommt es zu einer Migration der PMN aus dem Blut in Richtung des Entzündungsherdes mit der Zielsetzung, eingedrungene Pathogene zu eliminieren. Dies geschieht sowohl über Phagozytose als auch über freigesetzte toxische Mediatoren wie z.B. reaktive Sauerstoffmetabolite, Arachidonsäurederivate und proteolytische Enzyme (81,207). Interessanterweise lässt sich die extravasale Migration von PMN ins Gewebe auch beim Vorliegen einer Entzündung ohne Infektion beobachten (149).

Die Migration und Extravasation von PMN durch das Gefäßendothel in das umliegende Gewebe, so auch in die Lunge, läuft in verschiedenen Schritten ab (24,186). Auf der Oberfläche des Endothels befindliche Chemokine fördern dabei die Auswanderung der PMN. Für IL-8, das für die PMN stark chemotaktisch wirksam ist, wurde gezeigt, dass es auf mikrovilli-ähnlichen Ausstülpungen der luminalen Oberfläche des Endothels präsentiert wird und somit die Transmigration der PMN unterstützt (125).

Während des initialen Gleitvorgangs („Rolling“) der PMN entlang der Gefäßwände scheint vor allem der Oberflächenrezeptor CD62L für eine erste Interaktion der PMN mit dem Endothel verantwortlich zu sein (21,69). Über CD11b/CD18 (Mac-1) wird dann eine festere Anhaftung der PMN an die Endothelzelle gewährleistet (34,182,217). Schließlich benötigen die PMN in einem letzten Schritt CD31 für die Diapedese in den extravaskulären Raum (131,135).

Am Ende ihrer Lebenszeit unterlaufen PMN, wie viele andere Zellen, charakteristischen Veränderungen, die unter dem Begriff der Apoptose, einer Form des programmierten Zelltods, zusammengefasst werden. Expression von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche, Zellschrumpfung, DNA-Fragmentation und Chromatinkondensation im Kern sind hier zu beobachten (84). Zugleich verlieren PMN wichtige zelluläre Komponenten wie Oberflächenrezeptoren und Funktionen wie Chemotaxis, Phagozytose und Degranulation (53,83,210). Bevor die apoptotischen PMN ihre zytotoxischen Inhaltsstoffe im Rahmen der sekundären Nekrose durch Verlust der Membranintegrität freisetzen und dadurch zu Schäden des umgebenden Gewebes führen können (207), werden sie idealerweise von Makrophagen erkannt und phagozytiert (32). Das trägt dazu bei, eine übermäßige Akkumulation aktivierter PMN in einem Organ zu vermeiden, den dadurch assoziierten Gewebeschaden zu begrenzen, ein systemisches Inflammationssyndrom zu verhindern und eine antiinflammatorische Gegenregulation einzuleiten (58). Seitz et al. fanden dazu eine gesteigerte Phagozytose apoptotischer Zellen durch Alveolarmakrophagen nach Thoraxtrauma. Zudem setzten diese nach Ingestion apoptotischer Zellen weniger IL-1 β und MIP-1 α frei (174).

In vivo vollzieht sich die Apoptose der PMN im Blut innerhalb von 1 bis 2 Tagen. Im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens können die PMN jedoch z.B. über freigesetzte Zytokine aktiviert und deren Apoptoserate gesenkt werden. Dadurch wird die Lebensdauer der aktivierten PMN verlängert (5,55,93).

Die lokale Entzündungsreaktion ist ein bedeutsamer Pathomechanismus der akuten Lungenschädigung. Bei Patienten mit akuter Lungenschädigung konnten erhöhte

Konzentrationen an IL-1 und IL-8 in der Lunge gefunden werden (51,155). Die dauerhafte Erhöhung von Zytokinen korrelierte mit einem schlechteren Outcome dieser Patienten (122). Einige Mediatoren, wie z.B. Komplement-Faktoren, Zytokine und Chemokine sind in der Lage, eine vermehrte Expression von Oberflächenmolekülen auf den Endothelzellen zu induzieren und dadurch eine Rekrutierung der PMN zu fördern (143,216). TNF- α und IL-1 β stellen hierbei zwei wichtige Zytokine dar, deren Konzentrationen regelmäßig in der BAL von Patienten mit ARDS erhöht sind (168,193). Proinflammatorische Zytokine können jedoch auch von aktivierten PMN, die in die Lunge wandern, freigesetzt werden (199). PMN scheinen v.a. IL-1 β auszuschütten, welches wiederum die Freisetzung weiterer Mediatoren fördert, wie z.B. TNF- α , MIP-2 oder IL-8 (145,179).

Trotz dieser Erkenntnisse bleibt die Rolle der PMN in der direkten Lungenschädigung und im Speziellen nach Lungenkontusion weitgehend ungeklärt. Vor allem stellt sich die Frage, ob die Migration aktivierter PMN nach Thoraxtrauma in die verletzte Lunge eine sekundäre Aggravation der initial rein mechanischen Lungenschädigung zur Folge hat.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Die Aktivierung und Rekrutierung von PMN stellen einen bedeutenden Schritt im Rahmen der posttraumatischen Entzündungsantwort dar. Weitgehend ungeklärt ist jedoch, welche Veränderungen sich bei den PMN nach einem stumpfen Thoraxtrauma mit isolierter Lungenkontusion abspielen und ob es durch die Emigration von PMN in die Lunge zu einer zusätzlichen Schädigung der Lunge kommt. Somit zielten die hier beschriebenen Versuche zuerst daraufhin ab, anhand von Oberflächenrezeptoren und Apoptosemarkern das Verhalten der PMN nach Thoraxtrauma näher zu beleuchten.

Welche Rolle die PMN im Rahmen der lokalen und systemischen Immunreaktion nach Thoraxtrauma spielen ist deskriptiv nicht zu klären. Deshalb wurde in weiterführenden Experimenten eine Depletion der PMN vor der Induktion des Thoraxtraumas vorgenommen, um so den Einfluss der PMN auf die Inflammationsreaktion und die Ausprägung des Lungenschadens nach Thoraxtrauma zu erfassen.

Folgende Hypothesen wurden formuliert:

1. Bei isolierter Lungenkontusion im Rahmen eines Thoraxtraumas kommt es zu einer zeitabhängigen Aktivierung zirkulierender PMN mit Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren (CD62L, CD11b, CD31) sowie zu einer gesteigerten Transmigration der PMN in die Lunge bei gleichzeitiger Verzögerung der Apoptoserate.

2. Eine Depletion der PMN vor dem Thoraxtrauma führt zu einer verminderten Sequestration der PMN in die Lunge und somit zu einer Reduktion der pulmonalen Inflammation und zu einer Abmilderung des Lungenschadens.

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 Versuchsaufbau

2.1.1 Druckwellengenerator

Ausgelöst wurde das Thoraxtrauma durch eine Druckwelle, die von einem Druckwellengenerator generiert wurde (97,98,150,151). Der Druckwellengenerator (eigene Herstellung: Wissenschaftliche Werkstatt Feinwerktechnik, Universität Ulm, Oberer Eselsberg, Ulm) bestand aus zwei Zylindern. Der obere war als Druckkammer an einer Seite mit einem Verbindungsstück zu einer Gasleitung angeschlossen und an der anderen Seite offen. Der untere Zylinder war offen und besaß eine Länge von 2 cm und einen Innendurchmesser von 1,6 cm. Beide Zylinder waren fest miteinander verschraubt. Zwischen diesen wurde eine 50 µm dicke Mylarfolie (Typ 50A, Du Pont GmbH, Bad Homburg) eingespannt, damit die Hohlräume der beiden Zylinder von einander getrennt waren. Die Öffnung des Unterteils wurde auf die Versuchstiere gerichtet, wohingegen das Oberteil über ein elektronisch auslösbares Hochgeschwindigkeitsventil (Hee-D-24, Festo, Esslingen) und einen Druckminderer (Flaschendruckminderer Zinser, Ebersbach) an eine Gasflasche mit Druckluft für Atemzwecke (MTI, Eichingen) angebracht wurde. Die Einstellung des Druckminderers erfolgte auf 13 bar.

2.1.2 Druckwellenentstehung

Über den elektronischen Auslöser wurde das Hochgeschwindigkeitsventil geöffnet. Nachdem der ansteigende Druck die Berstspannung der Mylarfolie erreicht hatte, kam es zum schlagartigen Zerreißen der Folie. Die entstandene Druckwelle konnte über die untere Öffnung des Zylinders entweichen.

2.1.3 Narkose

Die Narkotisierung der Versuchstiere wurde über eine Spülmaskennarkose vorgenommen. Eingeleitet wurde in einer Sevofluran-Atmosphäre (Sevorane, Abbott GmbH, Wiesbaden). Die Spülmaske wurde über die Schnauze des Versuchstiers platziert und von einem Gemisch aus medizinischem Sauerstoff (Westfalen AG, Münster) und Sevofluran durchströmt. Über einen Rotameter (Drägerwerk AG, Lübeck) wurde der Sauerstofffluss von 0,8 l pro Minute reguliert. Die Sevofluranbeimischung geschah über einen Vapor

(Drägerwerk AG, Lübeck). Die Anpassung der Narkosetiefe des Tieres wurde über den Anteil des Narkosegases bei 2 bis 2,5 % über den Vapor reguliert.

Bei der Auswahl der Narkoseverfahren zeigt sich ein klarer Vorteil für die Maskennarkose mit Sevofluran. Wie auch beim Thoraxtrauma des Menschen bleibt bei dieser Vorgehensweise die Spontanatmung erhalten. Sevofluran besitzt nur eine geringe Blutlöslichkeit. Dadurch kann eine schnelle Narkoseinduktion sowie eine präzise Regulation der Narkosetiefe erfolgen. Zusätzlich besitzt Sevofluran nur ein geringes hepatotoxisches Potential im Vergleich mit anderen inhalativen Narkosemittel (156). Auch die regelrechte Funktion der Makrophagen, die mikroskopische Architektur der Milz und Leber und die Nieren- und Leberfunktion bleiben erhalten (156). Diese Eigenschaften des Sevoflurans sind vor allem in Hinblick auf die nachfolgend dargelegten immunologischen Versuche von Bedeutung.

2.1.4 Versuchstiere

Alle vorgenommenen Tierversuche waren vorher durch die zuständige Behörde im Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Registrierungsnummer: 771). Für alle Versuche wurden männliche C3H/HeN Mäuse des Zuchtbetriebes Charles River (Sulzfeld) in einem Alter von 8-9 Wochen benutzt. Die Haltung der Tiere erfolgte in den Ställen der Bereichstierhaltung des Tierforschungszentrums Haus IV, Untergeschoss Safranberg (Ulm). Bei einer Raumtemperatur von 21° C wurden maximal 10 Tieren pro Käfig gehalten. Die Hell-Dunkel-Phasen wurden in einen zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus aufgeteilt. Alle Tiere besaßen freien Zugang zu Wasser und Futter. Dabei bestand das Futter aus einer standardisierten Versuchstiernahrung (Altromin 1314 Forti, Altromin GmbH, Lage-Lippe).

2.2 Hauptversuche

2.2.1 Gruppeneinteilung

2.2.1.1 Versuch 1

Die Versuchstiere wurden in Kontroll- und Traumatiere eingeteilt. Es wurden unterschiedliche Zeitabstände nach Verabreichung des Traumas bzw. der Kontrolltierbehandlung untersucht. Kontrolltiere erhielten bis auf die Verabreichung des

Thoraxtraumas die gleiche Prozedur wie die Traumatiere (d.h. Narkose, Fixierung etc.). Jede Gruppe bestand aus n = 8-10 Tieren.

Nach Ablauf von 0,5, 2, 12 oder 24 h wurden die Tiere durch Punktion des rechten Herzventrikels getötet und das erforderliche Zellmaterial bzw. Gewebe entnommen.

Es wurden folgende Versuchsgruppen definiert:

Gruppe 1: Kontrolltier (Sham) 0,5 h

Gruppe 2: Traumatier (TxT) 0,5 h

Gruppe 3: Kontrolltier (Sham) 2 h

Gruppe 4: Traumatier (TxT) 2 h

Gruppe 5: Kontrolltier (Sham) 12 h

Gruppe 6: Traumatier (TxT) 12 h

Gruppe 7: Kontrolltier (Sham) 24 h

Gruppe 8: Traumatier (TxT) 24 h

2.2.1.2 Versuch 2

In diesem Versuch wurde zusätzlich nach Gabe eines Antikörpers zur Depletion der PMN (PMN-AK) oder der entsprechenden Immunglobulin-Isotypkontrolle (IgG-AK) eingeteilt. Die Gruppen bestanden aus n= 8-10 Tieren. Es wurden folgende Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1: Kontrolltier (Sham) 3 h + PMN-AK

Gruppe 2: Traumatier (TxT) 3 h + PMN-AK

Gruppe 3: Kontrolltier (Sham) 3 h + IgG-AK

Gruppe 4: Traumatier (TxT) 3 h + IgG-AK

Gruppe 5: Traumatier (TxT) 30 h + IgG-AK

Gruppe 6: Traumatier (TxT) 30 h + PMN-AK

2.2.2 Versuchsablauf

Die beiden Versuche unterschieden sich in den Vorbereitungen dadurch, dass bei Versuch 2 die Verabreichung des gegen die PMN gerichteten Antikörpers (Purified rat anti-mouse Ly-6G and Ly-6C (Gr-1) monoclonal antibody (no azide/low endotoxin), Fa. BD Biosciences, Heidelberg) bzw. der entsprechenden Immunglobulin-Isotypkontrolle (Purified rat IgG_{2b}, κ monoclonal immunglobulin isotype standard (no azide/low endotoxin, Fa. BD Biosciences, Heidelberg) 48 h vor Beginn der Behandlung der Tiere

vorgenommen wurde. Mehrere Studien konnten bereits die Effizienz dieses Antikörpers bei der Depletion der PMN belegen (5,31,149). Das vom Antikörper erkannte Oberflächenantigen Gr-1 wird hauptsächlich von PMN exprimiert (61). Die Penisvene der Mäuse wurde 48 h vor Trauma- bzw. Kontrolltierbehandlung mit einer 30 G-Kanüle (Fa. BD Biosciences, Heidelberg) in Sevofluran-Narkose unter zur Hilfenahme eines Operationsmikroskops (OpMi-1 S. Nr.: 86189 mit fünfstufigem Vergrößerungswechsler und einem 12,5-fach Okular, Zeiss, Oberkochen) punktiert und 0,5 mg des Antikörpers bzw. 0,5 mg der Immunglobulin-Isotypkontrolle, in 100 µl Phosphatpuffer (PBS Dulbecco's, Fa. Invitrogen, Karlsruhe) gelöst, injiziert. Danach wurde das Thoraxtrauma ausgelöst. Dazu wurden die Tiere in Narkose an allen abgespreizten Extremitäten in Rückenlage mit Klebestreifen fixiert und von der Schulter bis zum Rippenbogen rasiert. Zur Auslösung des Thoraxtraumas wurden die Tiere zentral mit dem Thorax unter dem Druckwellengenerator platziert. Der Abstand des Druckwellengenerators zum Tier wurde über einen verstellbaren Haltearm auf 1,6 cm eingestellt. In Inspirationsstellung wurde die Druckwelle elektronisch gesteuert ausgelöst. Nach erfolgtem Thoraxtrauma oder Kontrolltierbehandlung wurde jedem Tier zur Analgesie Temgesic (1ml, Essex Pharma, München) mit einem Anteil von 0,3 mg pro ml Buprenorphinhydrochlorid verabreicht. Dieses wurde in 100 ml isotonische NaCl-Lösung (DeltaSelect, Pfullingen) verdünnt und in der Dosierung 0,01 mg pro kg Körpergewicht subkutan in die Nackenhaut injiziert. Anschließend wurden die Tiere bis zur vollständigen Erholung beobachtet und dann zum jeweiligen Beobachtungszeitpunkt getötet.

Bei den Kontrolltieren wurde die gleiche Prozedur unter Narkose vorgenommen, jedoch kein Thoraxtrauma ausgelöst. Nach den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten wurden die gleichen Eingriffe zur Tötung und anschließenden Probengewinnung wie bei den Traumatieren vollzogen.

2.2.3 Analysen

2.2.3.1 Probengewinnung

Durch Erhöhung des Narkosegasanteils in der Atemluft auf 4 % wurden die Tiere getötet. Der Thorax wurde nach vollständigem Erlöschen der Atembewegungen eröffnet. Zur Blutgewinnung wurde der rechte Ventrikel des Herzens mit einer 22G Kanüle und 1 ml Spritze (Fa. BD Biosciences, Heidelberg) punktiert. Für Versuch I wurde das Blut in ein EDTA-Röhrchen (S-Monovette 1,2 ml, K3E, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) verbracht, bei

Versuch 2 wurde eine 1 ml Spritze mit Heparin-Konus (Heparin-Natrium, Braun, Melsungen) verwendet und das gewonnene Blut anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf, Hamburg) umgefüllt und sofort auf 4° C gekühlt.

Zur Gewinnung der bronchoalveolären Lavage (BAL) wurde die Trachea der Tiere präpariert. Diese wurde semizirkulär inzidiert und ein Katheter (Kathetermaterial 0,58 x 0,2, Fa. VWR, Darmstadt) eingelegt und mit einem Faden fixiert. Zunächst wurde 0,7 ml kaltes PBS instilliert und langsam wieder aspiriert. Die Probe wurde als BAL 1 in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 1 µl bereits vorliegendem Proteaseinhibitorcocktail (Gemisch aus 12 µl Leupeptin, 10 µl Trypsininhibitor, 5 µl Aprotinin und 2 µl Pepstatin (alle Fa. Sigma, Deisenhofen)) umgefüllt und bei 4° C gekühlt. BAL 1 diente zur anschließenden Konzentrationsbestimmung der Zytokine sowie des Proteingehaltes. Anschließend wurde 0,7 ml PBS Dulbecco's (Biochrom KG, Berlin) 3-malig wiederholt instilliert und aspiriert. Diese Probe wurde als BAL 2 etikettiert und in ein 2 ml Eppendorf Gefäß verbracht und auf Eis gelagert. BAL 2 diente zur späteren zytologischen Auswertung der angefertigten Zytospinpräparate.

Die Lungen wurden anschließend entnommen. Im Rahmen des Versuchs 1 wurden zusätzlich 6 Tiere pro Gruppe der Trauma- bzw. Kontrolltierbehandlung unterzogen. Für die spätere histologische Aufarbeitung wurden deren Lungenhälften nach Seiten getrennt in Kunststoffgefäße (Poly Q- Vial 18 ml Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) verbracht und mit 10 %-iger Formaldehydlösung (J.T. Baker, Malinckrodt Baker B.V. Deventer, Niederlande) in PBS Dulbecco's fixiert.

Bis zur weiteren Verarbeitung für die Zytokinmessungen wurden die Lungen aus Versuch 2 bei -80° C eingefroren.

2.2.3.2 Probenverarbeitung

2.2.3.2.1 Blutprobe

In Versuch 1 wurde die Quantifizierung der Oberflächenrezeptoren und der Apoptoserate der PMN mit Hilfe der Durchflusszytometrie (EPICS XL, Fa. Beckman Coulter, Krefeld) durchgeführt.

Es wurde die Expression folgender Rezeptoren auf der PMN-Oberfläche nach isolierter Lungenkontusion bestimmt: CD62L (L-Selektin), CD11b als Teil des MAC-1 Moleküls und CD31 (PECAM-1).

In drei FACS-Röhrchen (Falcon 5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol, Fa. BD Biosciences, Heidelberg) wurde jeweils 50 µl Vollblut pipettiert. In jedes der Röhrchen

wurde 5 μ l monoklonaler Maus-Antikörper CD11b-PE (rat anti-mouse CD11b-PE monoclonal antibody, Fa. Immunotech, Krefeld) zugegeben. Zusätzlich wurde in das erste Röhrchen 2,5 μ l Maus-Antikörper CD62L-FITC (rat anti-mouse CD62L-FITC monoclonal antibody, Fa. Invitrogen, Karlsruhe), in das zweite 5 μ l monoklonaler Maus-Antikörper CD18-FITC (rat anti-mouse CD18-FITC monoclonal antibody, Fa. Immunotech, Krefeld) und in das dritte 5 μ l monoklonaler Maus-Antikörper CD31-FITC (rat anti-mouse CD31-FITC monoclonal antibody, Fa. Immunogen, Krefeld) gegeben. Nach gründlicher Vermischung wurden die Proben lichtgeschützt über 15 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde jedes Röhrchen mit 1 ml VersaLyse Lysing Solution (Fa. Beckmann Coulter, Krefeld) vermischt und erneut für 15 Min lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 150 x g (Varifuge 3.0 RS, Fa. Heraeus, Hanau) bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Es erfolgte dann eine zweimalige Waschung mit 3 ml PBS. Schließlich wurde das Zellpellet in 0,5 ml 1x Fixierlösung (IOTest 3 Fixative Solution 10x concentrated, Fa. Beckman Coulter, Krefeld) resuspendiert. Die Analysen erfolgten mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Analog dem beschriebenen Verfahren wurde eine Vollblutprobe mit monoklonalem Maus-Antikörper CD45-PE (rat anti-mouse CD45-PE monoclonal antibody, Fa. Immunotech, Krefeld) gefärbt, was zur durchflusszytometrischen Eingrenzung („Gating“) der Leukozyten herangezogen wurde. Die PMN wurden dann in den folgenden Messungen über Einstellung des Vorwärtsstreulichts (Zellgröße) und des Seitwärtsstreulichts (Zellgranularität) von den anderen Leukozyten-Subpopulationen (Lymphozyten, Monozyten) abgegrenzt.

Zu jeder Messung wurde zusätzlich eine Isotypkontrolle durchgeführt um die unspezifische Bindung der Antikörper an den Fc-Rezeptor der Zelle von der spezifischen Färbung abzugrenzen. Dazu wurde das Vollblut mit 5 μ l IgG2b-PE (Rat IgG2b-PE, Fa. Immunotech, Krefeld) und 5 μ l IgG2a-FITC (Rat IgG2a-FITC, Fa. Immunotech, Krefeld) für 15 Min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde nach dem gleichen Verfahren, wie bei den Oberflächenmarkern geschildert, vorgegangen.

Eine Zellzahl von 10 000 PMN wurde erfasst bzw. eine Messzeit von 10 Min pro Probe angesetzt. Die Ergebnisse wurden als Verhältnis Antigen positiver Zellen zur Gesamtzahl der PMN dargestellt.

Als Marker für die Apoptose der PMN wurden Annexin V und aktive Capsase-3 ausgewählt. Nekrotische Zellen wurden über die Färbung mit 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) ausselektiert.

Zum Nachweis von externalisierten Phosphatidylinositolresten der PMN mittels Annexin V wurden 100 µl Vollblut mit 1 ml VersaLyse Lysing Solution (Fa. Beckman Coulter, Krefeld) für 15 Min lichtgeschützt inkubiert und die Erythrozyten so lysiert. Es erfolgte dann eine Zentrifugation bei 150 x g bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgenommen, mit 4 ml PBS versetzt, gründlich gemischt und erneut für 5 Min bei 500 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das nun verbleibende Pellet wurde in 100 µl 4° C kaltem Bindungs-Puffer (Annexin V-FITC/7-AAD Kit, Fa. Beckman Coulter, Krefeld) resuspendiert. Zur Probe wurden dann 10 µl Annexin V-FITC, 20 µl 7-AAD und 5 µl monoklonaler Maus-Antikörper CD45-PE zugegeben. Es erfolgte eine lichtgeschützte Inkubation über 15 Min bei 4° C. Nach Zugabe von 400 µl 4° C kaltem Bindungs-Puffer wurde die Messung innerhalb von 30 Min durchgeführt.

Für die durchflusszytometrische Analyse von aktiver Caspase-3 wurde zunächst 0,5 % Formaldehyd-PBS aus PBS Dulbecco's und Formalin (Fa. Sigma, Deisenhofen) vorbereitet. Zu jeweils 50 µl Vollblut wurden 5 µl CD45-PE zugegeben und bei Raumtemperatur für 15 Min lichtgeschützt inkubiert. Daraufhin wurden 100 µl „Intra Prep Permeabilisations-Reagenz 1“ (Fa. Beckmann Coulter, Krefeld) zur Fixation der Zellen zugemischt, für 15 Min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend mit 4 ml PBS gewaschen. Zum Pellet wurde anschließend 100 µl „Intra Prep Permeabilisations-Reagenz 2“ (Fa. Beckmann Coulter, Krefeld) zur Permeabilisierung der Leukozyten und Lyse der Erythrozyten hinzugegeben und für 5 Min inkubiert. Es wurde dann mit 20 µl anti-aktiver Caspase-3-FITC (rabbit anti-active Caspase-3-FITC monoclonal antibody, Fa. BD Biosciences, Heidelberg) markiert und für 60 Min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Es erfolgte anschließend ein zweimaliges Waschen mit 4 ml PBS und Zentrifugation bei 300 x g über 5 Min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl 0,5 % Formaldehyd-PBS resuspendiert. Die Probenmessung fand ebenfalls innerhalb 30 Min statt.

Auch hier erfolgte parallel die Durchführung einer Isotypkontrolle. Hierbei wurde das gleiche Verfahren wie zur Färbung mit anti-aktiver Caspase-3-FITC angewendet, jedoch zunächst 5 µl IgG2b-PE zu 50 µl Vollblut gegeben und anstatt anti-aktiver Caspase-3-FITC 10 µl IgG-Isotypkontrolle-FITC (rabbit IgG-Isotypkontrolle-FITC, Fa. Southern Biotech, Birmingham, Alabama) zugegeben.

Die Abgrenzung der PMN von Zelldetritus und anderen Leukozyten-Subpopulationen erfolgte wieder anhand der Morphologie in der Vorwärts- und

Seitwärtsstreulichtdarstellung und zusätzlich über die Markierung des leukozytären CD45 Antigens mit CD45-PE Antikörper.

Für das Ende der Messung galten dieselben Kriterien wie bei den Oberflächenrezeptoren bereits beschrieben.

Bei Versuch 2 wurde ein Teil des venösen Blutes aus dem rechten Herzventrikel zur Quantifizierung der PMN-Anzahl mittels Durchflusszytometrie verwendet. Die PMN wurden auch hier über Einstellung des Vorwärts- und des Seitwärtsstreulichts und Markierung mit CD45-PE abgegrenzt. Der Vorgang der Färbung mit CD45-PE Antikörper und die anschließende Lyse der Erythrozyten erfolgte analog der Färbung der oben genannten Oberflächenmarker aus Versuch 1.

Der restliche Teil der venösen Blutprobe wurde im Reaktionsgefäß bei 16.000 x g für 15 Min bei 4° C zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert, in Mengen von jeweils 120 µl in Reaktionsgefäße überführt und bei -80° C gelagert.

2.2.3.2.2 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die BAL 1 (siehe 2.2.3.1) wurde für 15 Min bei 380 x g und 4° C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zu je 120 µl bei -80° C zur späteren Analyse mittels ELISA eingefroren.

Das Zellpellet wurde mit der gemessenen Menge an entnommener BAL 1 in PBS Dulbecco's resuspendiert und mit der BAL 2 zusammengeführt. 150 µl daraus wurden zur Fertigung eines Zytospinpräparats mit der Zytospin 3-Zytozentrifuge (Fa. Shandon, Frankfurt) genutzt. Die Proben wurden über 3 Min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Präparate 10 Min lang luftgetrocknet, nachfolgend für 10 Min mit 100 % Methanol (Fa. Fluka, Deisenhofen) fixiert und schließlich modifiziert nach Pappenheim gefärbt (Fa. Merck, Darmstadt). Es erfolgte eine Auszählung von 200 Leukozyten differenziert in PMN, Alveolarmakrophagen und Lymphozyten anhand morphologischer Kriterien durch eine verblindete Person.

2.2.3.2.3 Lungen Myeloperoxidaseaktivität (MPO)

Die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) in der Lunge als Maß der PMN-Anzahl und Aktivierung im Gewebe wurde modifiziert nach dem Verfahren von Suzuki et al. (194) und wie bei Perl et al. vorbeschrieben durchgeführt (151). Die Lunge wurde in 1,5 ml Puffer homogenisiert (Ultra-Turax T25, Jahnke und Kunkel, Staufen). Dieser Puffer

bestand aus 6,12 g KH_2PO_4 (Fa. Merck, Darmstadt) in 900 ml Aqua dest., welcher mittels 1,14 g K_2HPO_4 (Fa. Merck, Darmstadt) in 100 ml Aqua dest. auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt wurde. Zusätzlich enthielt der Puffer 0,5%-iges Hexadecyltriethylammoniumbromid (Fa. Sigma, Deisenhofen). Die homogenisierten Gewebe wurden anschließend bei 60°C für 2 h inkubiert und dann bei Raumtemperatur für 15 Min bei $3.950 \times g$ zentrifugiert (Minifuge T, Fa. Heraeus, Hanau). 25 μl des Überstandes bzw. der Verdünnungsreihe der Standardlösung (Fa. Novabiochem, Schwalbach) wurden mit 25 μl Tetramethylbenzidin (Fa. Sigma, Deisenhofen) und 200 μl 30 % H_2O_2 (Fa. Fluka, Deisenhofen) gemischt und für 5 Min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 μl 2 M H_2SO_4 (Fa. Sigma, Deisenhofen) gestoppt und die Extinktionsänderung bei 450 nm photometrisch gemessen (Photometer SLT 340 ATTC, Fluostar Labinstruments, Crailsheim).

Der MPO-Gehalt wurde auf den Proteingehalt der Lungengewebes-Probe bezogen (siehe 2.2.3.2.4).

2.2.3.2.4 Proteingehalt der Lunge

Die Proteinbestimmung wurde modifiziert nach Smith et al. durchgeführt (183). Hierzu wurde den MPO-Proben je 100 μl 10 M Perchlorsäure (Fa. Sigma, Deisenhofen) zugegeben und bei Raumtemperatur für 15 Min bei $3.950 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen, zum Sediment 3 ml Aqua dest. zugegeben, erneut zentrifugiert, der Überstand erneut abgegossen und wiederum mit 3 ml Aqua dest. gewaschen. Das Sediment wurde dann mit 2 ml 0,5 N NaOH (Fa. Sigma, Deisenhofen) vermischt und 30 Min bei 56°C inkubiert. Nach Abkühlung wurden 20 μl der Proben mit 80 μl Aqua dest. verdünnt und 15 μl dieser Verdünnung mit 300 μl Reagenz C gemischt. Dieses Reagenz wurde aus 4 % Kupfersulfatlösung (Fa. Merck, Darmstadt) und Bicinchoninic Acid Solution-Reagenz (Fa. Sigma, Deisenhofen) im Verhältnis 1:51 hergestellt. Zum Vergleich wurde eine Verdünnungsreihe der Standardlösung (Bovines Serum Albumin, Fa. Sigma, Deisenhofen) hergestellt und ebenfalls jeweils 15 μl der Verdünnungsreihe mit 300 μl Reagenz C versetzt. Es wurde dann für 30 Min bei 37°C inkubiert und die Extinktionsänderung nachfolgend bei 562 nm photometrisch bestimmt. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der aus den Standards berechneten Eichgeraden ermittelt.

2.2.3.2.5 Proteingehalt in der BAL

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in der BAL wurde nach Herstellerangaben mit dem „BCA Protein Assay Kit“ (Fa. Pierce, Rockford, USA) durchgeführt. Nach 1:10 Verdünnung mit Aqua dest. wurden 10 µl der BAL-Proben anschließend mit 200 µl Arbeitslösung vermischt. Diese setzte sich im Verhältnis 50:1 zusammen aus BCA Reagenz A (Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat, Bicinchoninsäure (BCA), Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid) und BCA Reagenz B (4%iges Kupfersulfat). Zum Vergleich wurde eine Verdünnungsreihe der Standardlösung (BSA) hergestellt und ebenfalls jeweils 10 µl der entsprechenden Verdünnung mit 200 µl Arbeitslösung vermischt. Danach wurde über 30 Min bei 37° C inkubiert. Die Extinktionsänderung wurde bei 562 nm photometrisch gemessen und der Proteingehalt aus den Daten der Standardkurve (BSA-Standard) und dem Verdünnungsfaktor berechnet.

2.2.3.2.6 Mikroskopische Beurteilung des Lungenschadens

Die entnommenen Lungen der Studie 1 wurden nach 48 h aus der Fixierlösung (siehe Kapitel 2.2.3.1) entnommen, in eine für jedes Tier beschriftete Plastikeinbettkassette überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung in 70 %-iger Isopropanollösung (Fa. Sigma, Deisenhofen) gehalten. Die Organe wurden zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (Tissue-Tek Automat, Sakura, Torrance, CA, USA) und anschließend in Einbettkassetten mit Paraffin (Fa. Vogel, Gießen) ausgegossen. Nach Aushärten des Paraffins wurden die entstandenen Blöcke mithilfe eines Schlittenmikrotoms (Microm HM 450, Fa. Microm GmbH, Walldorf, Germany) in einer Dicke von 20 µm angeschnitten und auf eine Kühlplatte mit ca. -10° C gelegt. Im Anschluss an die Kühlphase wurden Schnitte in einer Dicke von 1 µm angefertigt und auf einen Objektträger aufgezogen. Mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte dann wieder entparaffiniert. Die Kernfärbung der entparaffinierten Schnitte wurde mit Hämalaun vorgenommen (Fa. AppliChem, Darmstadt). Die Gegenfärbung erfolgte mit Eosin.

Die nun HE-gefärbten Lungenschnitte wurden zur exakten Beurteilung des Lungenschadens mikroskopisch untersucht. Hierbei wurde auf typische Veränderungen geachtet, die in der Literatur nach Auftreten eines Thoraxtraumas beschrieben wurden (136,163). Der Untersucher war vorher von einem erfahrenen Pathologen auf die histologischen Veränderungen eingewiesen worden. Zudem war er gegenüber der Gruppenzugehörigkeit der Tiere verblindet.

2.2.3.2.7 Gewebehomogenisierung für Zytokin- und Chemokinmessung

Die tiefgefrorenen Lungenhälften des Versuchs 2 wurden unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (Fa. Falcon, Heidelberg) umgefüllt und mit einer Proteinaseinhibitorstocklösung bestehend aus 15 µl Trypsininhibitor, 3 µl Aprotinin, 7,5 µl Leupeptin, 1,5 µl Pepstatin, 1,9 µl N-Ethylmaleimid, 750 µl EDTA (alle Fa. Sigma, Deisenhofen) und 721 µl PBS Dulbecco's - wie vorbeschrieben - versetzt (152). Bei 4° C wurden die zellulären Bestandteile der Proben mittels Ultraschall (Sonifier, Fa. Branson, Hannover) weiter aufgeschlossen und bei 5.000 x g für 10 Min bei 4° C zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils abpipettiert und in 2 ml Eppendorf Röhrchen überführt. Anschließend wurde bei 16.000 x g für 10 Min bei 4° C zentrifugiert und die Überstände zu 100 µl für die Proteinbestimmung und 230 µl für die Zytokinbestimmung aliquotiert und bei -80° C eingefroren.

2.2.3.2.8 Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

Mittels ELISA wurden die folgenden Konzentrationen an Zyto- und Chemokinen bestimmt: IL-6 und KC im Plasma; IL-6, IL-10, KC, MCP-1 und MIP-2 in der BAL; IL-6, KC, MCP-1 und MIP-2 in der homogenisierten Lunge.

Hierfür wurden die handelsüblichen ELISAs für MIP-2 und KC (Duo Set, R&D Systems, Minneapolis) und für IL-6, IL-10 und MCP-1 (OptEIA Set, Fa. BD Biosciences, Heidelberg) für die Maus verwendet. Die Sets wiesen folgende Spezifikationen auf:

Sensitivität: 15,6 - 1000 pg/ml für IL-6, MCP-1, MIP-2 und KC

31,3 – 2000 pg/ml für IL-10

Spezifität für OptEIA Sets: Keine Kreuzreaktion mit rekombinanten Mauszytokinen vom Typ IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL12 (p70), IL-15, IFN-γ, GM-CSF, sowie
IL-6 bei den Assays für IL-10 und MCP-1;
IL-10 bei den Assays für IL-6 und MCP-1.

Spezifität für Duo Sets: Keine Kreuzreaktion mit rekombinanten Mauszytokinen vom Typ C10, JE, MIP-1α, MIP-1β und KC für MIP-2;
MIP-1α, MIP-1β und MIP-2 für KC.

Nach den Empfehlungen des Herstellers wurden die Tests durchgeführt. Bei den OptEIA Sets und den Duo Sets wurde zu Beginn 100 µl des anti-Zytokin Antikörpers mit Coating-Puffer (0,1 mol Natrium-Carbonat pH 9,5) verdünnt, auf die 96-well Mikrotiterplatte (C96 MaxiSorp, NUNC, Wiesbaden) pipettiert und bei 4° C inkubiert.

Nach 12 h folgten mehrere Waschschritte mit Waschpuffer (8,0 g NaCl, 0,2 g KCL, 1,5 g Na₂HPO₄ × 2H₂O, 0,4 g KH₂PO₄, 0,5 g Tween 20, 1000 ml Aqua bidest. auf pH 7,0 eingestellt). Danach wurde zum Blockieren unspezifischer Bindungen mit „Assay Diluent“, bestehend aus PBS Dulbecco mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (Fa. Biochrom KG, Berlin), für 2 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proben und die Verdünnungen des Standards (Fa. BD Biosciences, Heidelberg, 1000 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) jeweils als Doppelbestimmung in die Mikrotiterplatte pipettiert und über Nacht bei 4° C inkubiert. Darauf folgend wurde nach erneuten Waschschritten entweder der entsprechende, bereits mit Avidin-Meerrettichperoxidase gekoppelte, zweite Antikörper (Fa. BD Biosciences, Heidelberg) in „Assay Diluent“ verdünnt auf die Mikrotiterplatte hinzugegeben (für IL-6, IL-10 und MCP-1) bzw. zunächst der Detektions-Antikörper mit nachfolgender Zugabe des Enzym Reagenz (Avidin-HRP) (für MIP-2 und KC). Bei letzterem Vorgehen wurde nach Inkubation des Detektions-Antikörpers mehrmals gewaschen, bevor die Avidin-Meerrettichperoxidase angekoppelt wurde. Danach wurde nach erneutem Waschen für 30 Min mit Tetramethylbenzidin Substrat (Fa. BD Biosciences, Heidelberg) inkubiert und durch Stoppen der Reaktion mit 2 N H₂SO₄ die Absorption bei 450 nm photometrisch bestimmt. Mit Hilfe der aus den Standards erzeugten Eichgerade wurden die Konzentrationen berechnet.

2.3 Statistik

Alle Ergebnisse wurden in Excel-Tabellen eingetragen. Im Folgenden wurden Diagramme mit SigmaPlot 2001 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath) erstellt. Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm SigmaStat Version 2.0 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath) benutzt. Die Ergebnisse aus den Messungen der Oberflächen- und Apoptosemarker, Zytokin- und Chemokinbestimmungen, Zellzahlen, MPO-Aktivität und des Proteingehaltes wurden auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht.

Nach Ermittlung der Normalverteilung der Grundgesamtheit wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) für unabhängige Stichproben vollzogen. Zur

Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede wurde dieser Varianzanalyse der Student-Newman-Keuls Test angeschlossen. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde festgelegt. Die Ergebnisse sind in den Diagrammen als Mittelwerte \pm standard error of the mean (SEM) als Fehlerbalken dargestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Hauptversuche

3.1.1 Versuch 1: Aktivierung und Apoptose von PMN

Versuch 1 diente dazu, das Aktivierungs- und Apoptoseverhalten der PMN nach stumpfem Thoraxtrauma näher zu beleuchten. Insbesondere sollten hierbei die für die Interaktion mit dem Gefäß-Endothel bedeutsamen Oberflächenrezeptoren CD62L, CD11b und CD31 auf den PMN untersucht werden. Zur Verlaufsbeurteilung der Apoptose der PMN wurden die Marker Annexin V und aktive Caspase-3 ausgewählt.

3.1.1.1 Versuchstiere

Hinsichtlich des Körpergewichtes der Mäuse ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Gruppeneinteilung siehe 2.2.1.1). Das Gewicht lag bei $27,7 \pm 0,9$ g (Mittelwert \pm SEM) in Gruppe 1, $27,8 \pm 0,9$ g in Gruppe 2, $27,5 \pm 0,7$ g in Gruppe 3, $28,3 \pm 0,6$ g in Gruppe 4, $27,7 \pm 0,7$ g in Gruppe 5, $28,2 \pm 0,7$ g in Gruppe 6, $28,3 \pm 0,7$ g in Gruppe 7 und $27,6 \pm 0,7$ g in Gruppe 8.

3.1.1.2 Beobachtungszeit

Die Beobachtungszeit nach Applikation des Traumas (TxT) bzw. der Kontrollprozedur (Sham) bis zum Versuchsende betrug je nach Gruppeneinteilung 0,5, 2, 12 oder 24 h. Kein Versuchstier starb vor Ablauf des Beobachtungszeitraumes.

3.1.1.3 Expression von CD62L (L-Selektin)

Da der Oberflächenrezeptor CD62L bereits bei den Kontrolltieren zu ca. 96 % exprimiert wurde, konnte durch das ausgelöste Thoraxtrauma keine signifikante Steigerung beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch bei den Traumatieren nach 24 h eine signifikante Reduktion der CD62L Expression gegenüber den Traumatieren nach 2 h und den Kontrolltieren (Abb. 1A).

3.1.1.4 Expression von CD11b

Bereits 30 Min nach Applikation des Thoraxtraumas kam es bei den PMN zu einer signifikant erhöhten Expression des für die Interaktion von PMN und vaskulärem Endothel benötigten CD11b Rezeptors der Traumatiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 1B).

3.1.1.5 Expression von CD31 (PECAM-1)

Die Expression von CD31 auf den PMN war bei den Tieren 2 h nach Thoraxtrauma signifikant reduziert gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren. 24 h nach Traumaapplikation fand sich hingegen eine signifikant höhere Expression von CD31 auf den PMN bei den Traumatieren verglichen mit den Kontrolltieren. Im Vergleich der Traumatiere untereinander wiesen die Tiere nach 0,5, 2 und 12 h eine signifikant niedrigere prozentuale CD31 Expression auf den PMN auf als die Tiere 24 h nach Thoraxtrauma (Abb. 1C).

3.1.1.6 Annexin V

Annexin V positive PMN waren bei den Traumatieren bereits nach 0,5 sowie nach 2 h signifikant vermindert gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren. 12 und 24 h nach Thoraxtrauma bestand hinsichtlich der Annexin V Positivität der PMN kein Unterschied zwischen den Kontroll- und Traumatieren mehr (Abb. 1D).

3.1.1.7 Aktive Caspase-3

30 Min nach Thoraxtrauma konnte bei den Traumatieren eine signifikante Reduktion der aktiven Caspase-3 in PMN im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren beobachtet werden. Auch 2 h nach Trauma persistierte dieser Unterschied. 12 und 24 h nach Thoraxtrauma konnte keine Differenz mehr zwischen den Trauma- und Kontrolltieren nachgewiesen werden. Zu diesen beiden Zeitpunkten bestand eine signifikant höhere Aktivität der aktiven Caspase-3 in PMN im Vergleich zu 0,5 und 2 h nach Trauma (Abb. 1E).

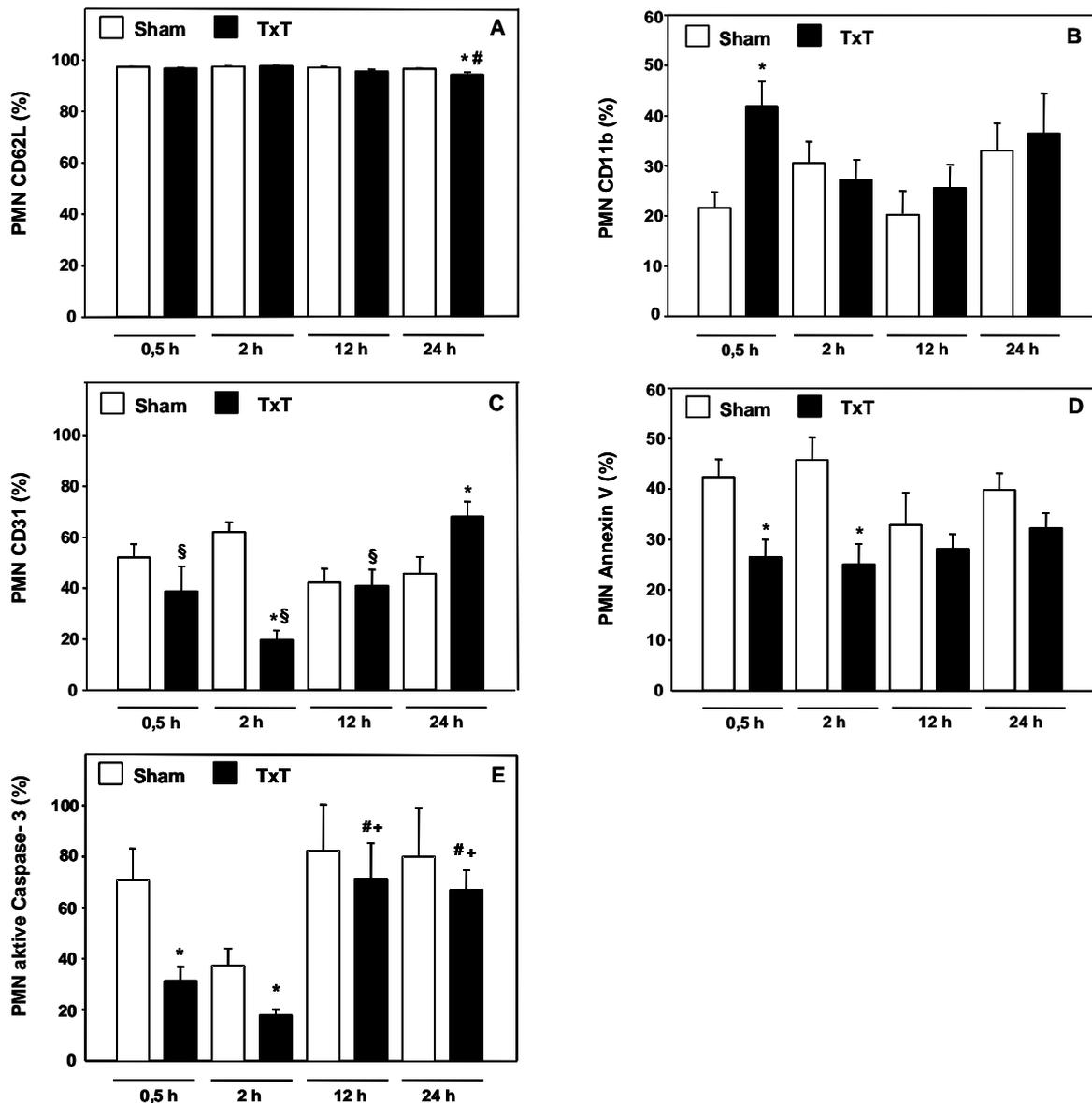


Abb. 1: Durchflusszytometrische Analyse der prozentualen cluster of differentiation 62L- (CD62L-) (A), CD11b- (B), CD31- (C), Annexin V- (D) und aktiven Caspase-3-Expression (E) von polymorphkernigen Granulozyten (PMN) 0,5, 2, 12 und 24 Stunden (h) nach Thoraxtrauma (TxT) bzw. Kontrollprozedur (Sham) bei männlichen C3H/HeN-Mäusen. * $p < 0,05$ vs. korrespondierendem Sham, + $p < 0,05$ vs. 0,5 h TxT, # $p < 0,05$ vs. 2 h TxT, § $p < 0,05$ vs. 24 h TxT, One-Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Test (SNK), $n = 8-10$.

3.1.2 Versuch 2: Depletion von PMN

Versuch 2 diente dazu, den Beitrag der PMN an der lokalen und systemischen Inflammationsreaktion sowie der Lungenschädigung nach Thoraxtrauma näher zu beleuchten. Vor Applikation des Thoraxtraumas wurde eine Depletion der PMN mit einem gegen das Gr-1 Antigen gerichteten Antikörper (PMN-AK) vorgenommen. Den Kontrolltieren wurde die entsprechende Immunglobulin-Isotypkontrolle (IgG-AK) appliziert.

Zum besseren Verständnis werden im Folgenden nicht-traumatisierte Tiere als „Kontrolltiere“ (Sham) bezeichnet, Tiere mit Thoraxtrauma als „Traumatiere“ (TxT). Die Tiere mit Immunglobulin-Isotypkontrolle (IgG-AK) erhalten zusätzlich die Bezeichnung „ohne Depletion“, wohingegen die Tiere mit PMN-AK als Tiere „mit Depletion“ bezeichnet werden.

3.1.2.1 Versuchstiere

Hinsichtlich des Körpergewichtes der Mäuse ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Gruppeneinteilung siehe 2.2.1.2). Das Gewicht lag bei $24,3 \pm 0,3$ g (Mittelwert \pm SEM) in Gruppe 1, $25,6 \pm 0,3$ g in Gruppe 2, $23,8 \pm 0,3$ g in Gruppe 3, $24,8 \pm 0,4$ g in Gruppe 4, $25,4 \pm 0,4$ g in Gruppe 5 und $25,3 \pm 0,3$ g in Gruppe 6.

3.1.2.2 Beobachtungszeit

Die Beobachtungszeit nach Applikation des Traumas (TxT) bzw. der Kontrollprozedur (Sham) bis zum Versuchende betrug je nach Gruppeneinteilung 3 bzw. 30 h. Kein Versuchstier starb vor Ablauf des Beobachtungszeitraumes.

3.1.2.3 PMN-Anzahl im Blut

Durch das Thoraxtrauma ausgelöst konnte nach 3 h bei den Traumatieren ohne Depletion ein signifikant höherer Anteil an PMN im peripheren Blut nachgewiesen werden im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Depletion. Diese Erhöhung war auch gegenüber den Traumatieren ohne Depletion nach 30 h signifikant (Abb. 2A).

Sowohl Kontroll- als auch Traumatiere mit Depletion zeigten keinerlei Unterschiede hinsichtlich der PMN-Anzahl im Blut im zeitlichen Verlauf nach Thoraxtrauma.

Eine signifikante Reduktion der PMN-Anzahl im Blut durch Gabe des PMN-Antikörpers (mit Depletion) konnte sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Traumatieren 3 und 30 h nach Thoraxtrauma, verglichen mit den Kontroll- und Traumatieren ohne Depletion, dargelegt werden. Die durchflusszytometrische Analyse der Wirksamkeit des PMN-AK ist beispielhaft in Abb. 3 graphisch dargestellt.

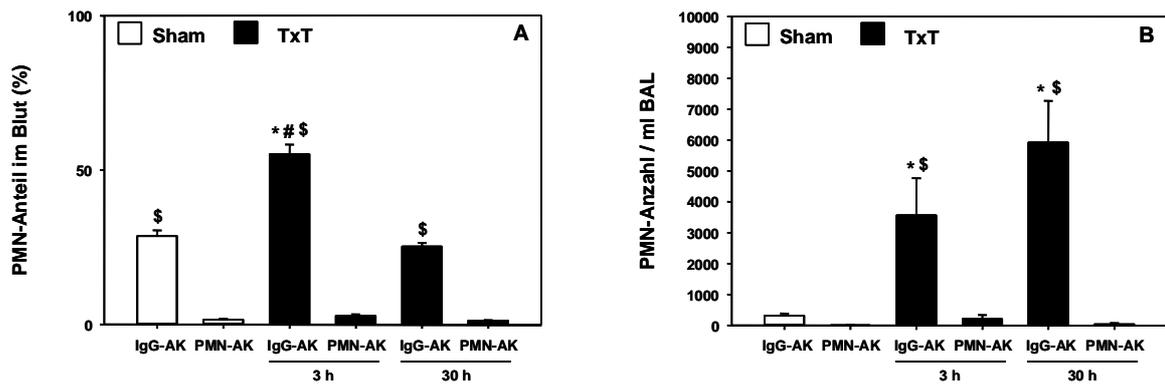


Abb. 2: Anteil der polymorphkernigen Granulozyten (PMN) an den Leukozyten im peripheren Blut (A) und PMN-Anzahl in der bronchoalveolären Lavage (BAL) (B) 3 und 30 Stunden (h) nach Thoraxtrauma (TxT) bzw. Kontrollprozedur (Sham) mit (Polymorphkernige Granulozyten-Antikörper (PMN-AK)) und ohne (Immunglobulin-Isotypkontrolle (IgG-AK)) PMN-Depletion bei männlichen C3H/HeN-Mäusen. * $p < 0,05$ vs. korrespondierendem Sham, \$ $p < 0,05$ vs. korrespondierendem PMN-AK, # $p < 0,05$ vs. korrespondierendem 30 h TxT, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Test (SNK), $n = 8-10$.

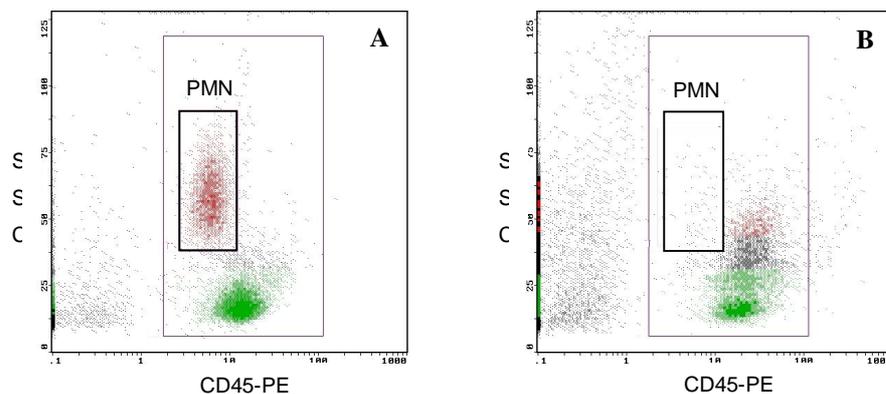


Abb. 3: Beispielhafte durchflusszytometrische Darstellung der polymorphkernigen Granulozyten (PMN)-Reduktion ohne (A) und 48 Stunden nach (B) Gabe des PMN-Antikörpers bei einem Kontrolltier bei männlichen C3H/HeN-Mäusen. Differenzierung der Leukozyten mittels cluster of differentiation 45-R-Phycoerythrin (CD45-PE) und Seitwärtsstreulicht (SSC).

3.1.2.4 PMN-Anzahl in der BAL

Bei den Traumatieren ohne Depletion war nach dem Thoraxtrauma ein Anstieg der PMN-Anzahl in der BAL zu beobachten, welcher zum 3 und 30 h Zeitpunkt statistische Signifikanz zu den Kontrolltieren ohne Depletion erreichte (Abb. 2B). 3 h nach Thoraxtrauma stieg die Anzahl bei den Traumatieren ohne Depletion auf 3.563 ± 1.206 PMN/ ml BAL (Mittelwert \pm SEM) an, nach 30 h erhöhte sich dieser Wert weiter auf 5.920 ± 1.353 PMN/ ml BAL. Kontrolltiere ohne Depletion wiesen lediglich 312 ± 77 PMN/ ml BAL auf.

Sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Traumatieren mit Depletion konnte keine Veränderung in der PMN-Anzahl in der BAL im zeitlichen Verlauf nach Trauma aufgezeigt werden.

Analog zum peripheren Blut, konnte auch in der BAL eine signifikante Reduktion der PMN-Anzahl nach Gabe des PMN-AK (mit Depletion) festgestellt werden. Bei den Traumatieren ohne Depletion fand sich eine signifikant höhere PMN-Anzahl in der BAL 3 und 30 h nach Thoraxtrauma verglichen mit den Traumatieren mit Depletion (3.563 ± 1.206 PMN/ ml BAL vs. 206 ± 103 PMN/ ml BAL nach 3 h bzw. 5.920 ± 1.353 PMN/ ml BAL vs. 40 ± 40 PMN/ ml BAL nach 30 h).

3.1.2.5 Zytokine und Chemokine in der Lunge

Die pulmonale IL-6 Konzentration zeigte sich bei den Traumatieren ohne Depletion 3 h nach Trauma ($120,5 \pm 14,9$ pg/ mg) annähernd doppelt so hoch und signifikant erhöht gegenüber den Kontrolltieren ohne Depletion ($65,8 \pm 9,4$ pg/ mg) (Abb. 4A). Auch hinsichtlich des 30 h Beobachtungszeitpunktes war diese Konzentration signifikant erhöht ($60,6 \pm 6,5$ pg/ mg).

Bei den Traumatieren mit Depletion vollzog sich ein gleichartiger Verlauf. Drei h nach Thoraxtrauma stellte sich eine signifikante Erhöhung von IL-6 im Vergleich zu den Kontrolltieren mit Depletion und den Traumatieren mit Depletion 30 h nach Thoraxtrauma dar. Ein Unterschied zwischen Tieren (Kontroll- und Traumatiere) mit und ohne Depletion bestand nicht.

Wie bei IL-6 wurde auch bei der pulmonalen MIP-2 Konzentration der Traumatiere ohne Depletion 3 h nach Thoraxtrauma ein signifikanter Anstieg beobachtet verglichen mit den Kontrolltieren ohne Depletion (Abb. 4B).

Der Gipfel der MIP-2 Konzentration bei den Traumatieren mit Depletion fand sich 3 h nach ausgelöstem Thoraxtrauma. Diese war signifikant erhöht gegenüber den Kontroll- und Traumatieren mit Depletion 30 h nach Trauma.

Im Vergleich der Tiere mit und ohne Depletion zeigte sich 3 h nach Trauma eine signifikant höhere MIP-2 Konzentration bei den Traumatieren mit Depletion.

30 h postkontusionell kam es bei beiden Gruppen zu einem Konzentrationsabfall auf das Ausgangsniveau der Kontrolltiere mit und ohne Depletion.

In Bezug auf die MCP-1 Gewebekonzentration in der Lunge (Abb. 4C) zeigte sich 3 und 30 h nach Thoraxtrauma bei den Traumatieren ohne Depletion ein signifikanter Anstieg gegenüber den Kontrolltieren, wobei die Spitze nach 3 h erreicht wurde und die Konzentration zu diesem Zeitpunkt zudem signifikant höher war als 30 h nach Thoraxtrauma (25 ± 3 pg/ mg (Sham IgG-AK) vs. 75 ± 8 pg/ mg (TxT IgG-AK 3 h) vs. 51 ± 9 pg/ mg (TxT IgG-AK 30 h)).

Ebenfalls ergab sich 3 h nach Traumaapplikation bei den Traumatieren mit Depletion ein signifikanter Anstieg von MCP-1 im Vergleich zu den Kontrolltieren mit Depletion. Zu diesem Zeitpunkt war dies auch noch signifikant erhöht gegenüber den Traumatieren mit Depletion nach 30 h.

Nach Gabe des PMN-Antikörpers wiesen Kontrolltiere mit Depletion signifikant höhere Konzentrationen an MCP-1 auf als die Kontrolltiere ohne Depletion (139 ± 13 pg/ mg vs. 25 ± 3 pg/ mg). Dieser signifikante Unterschied bestand auch bei den Traumatieren mit Depletion 3 und 30 h nach Applikation des Thoraxtraumas verglichen mit den Traumatieren ohne Depletion.

Die Konzentration von KC in der Lunge zeigte 3 h nach Thoraxtrauma bei den Traumatieren ohne Depletion signifikant höhere Werte gegenüber den Kontrolltieren ohne Depletion (Abb. 4D). 30 h nach Trauma fanden sich im Vergleich zum 3 h Zeitpunkt bei den Traumatieren ohne Depletion wieder signifikant niedrigere Konzentrationen.

Traumatiere mit Depletion wiesen 3 und 30 h nach Trauma signifikant höhere Gewebekonzentrationen an KC auf als die entsprechenden Kontrolltiere mit Depletion. Auch hier vollzog sich 30 h nach Trauma wieder ein Abfall der Konzentration verglichen mit dem 3 h Zeitpunkt.

30 h nach Thoraxtrauma war die Konzentration von KC zudem bei den Traumatieren mit Depletion signifikant höher als bei den Traumatieren ohne Depletion.

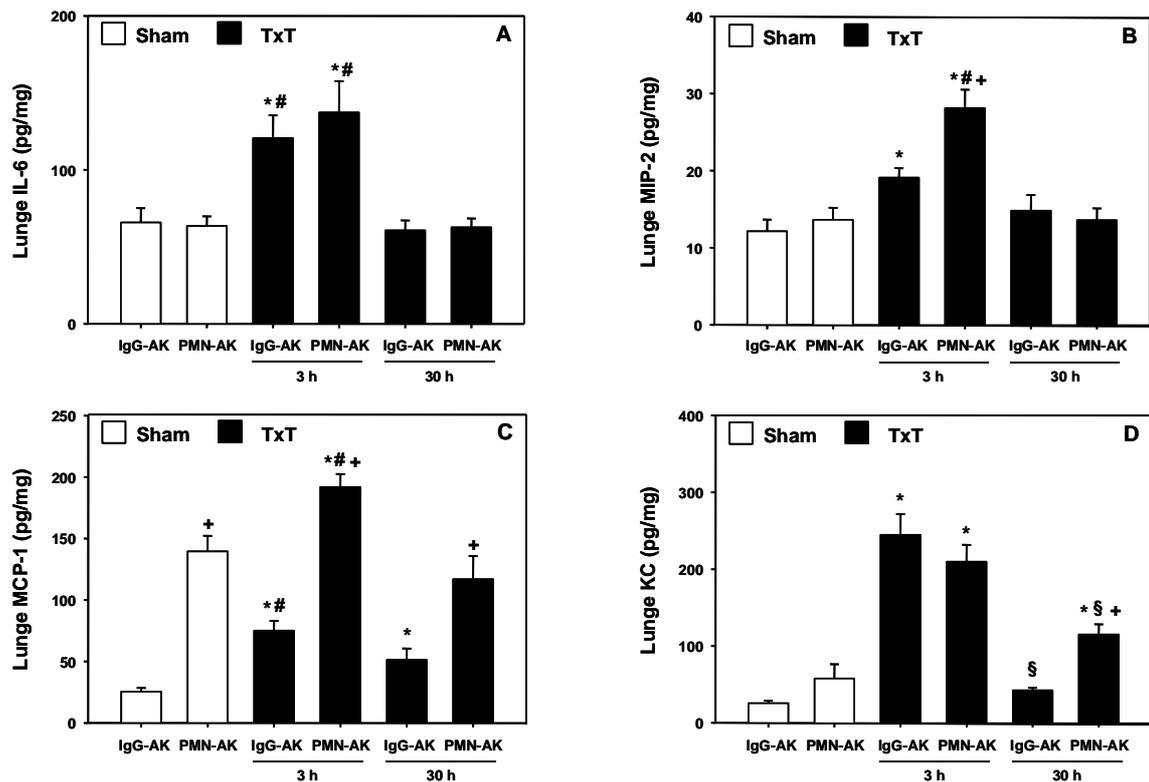


Abb. 4: Konzentrationen von Interleukin-6 (IL-6) (A), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) (B), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (C) und cytokine-induced neutrophil chemoattractant (KC) (D) in der Lunge 3 und 30 Stunden (h) nach Thoraxtrauma (TxT) bzw. Kontrollprozedur (Sham) mit (Polymorphkernige Granulozyten-Antikörper (PMN-AK)) und ohne (Immunglobulin-Isotypkontrolle (IgG-AK)) PMN-Depletion bei männlichen C3H/HeN-Mäusen. * $p < 0,05$ vs. korrespondierendem Sham, + $p < 0,05$ vs. korrespondierendem IgG-AK, § $p < 0,05$ vs. korrespondierendem 3 h TxT, # $p < 0,05$ vs. korrespondierendem 30 h TxT, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Test (SNK), $n = 8-10$.

3.1.2.6 Zytokine und Chemokine in der BAL

3 h nach Thoraxtrauma zeigte die IL-6 Konzentration in der bronchoalveolären Lavage (BAL) bei den Traumatieren ohne Depletion signifikant höhere Werte einerseits gegenüber den Kontrolltieren, andererseits auch gegenüber den Traumatieren ohne Depletion 30 h nach Trauma (Abb. 5A).

Dieser Verlauf mit über 20-facher Konzentrationserhöhung konnte auch bei den Traumatieren mit Depletion beobachtet werden. 30 h nach Thoraxtrauma erfolgte wieder ein Rückgang der Werte nahe dem Ausgangsniveau der Kontrolltiere mit Depletion.

Ein Unterschied zwischen den Tieren mit und ohne Depletion bestand weder bei Kontrolltieren noch bei den Traumatieren.

Ebenfalls wurde beim chemotaktisch wirkenden MIP-2 ein Konzentrationsanstieg in der BAL beobachtet (Abb. 5B). Drei und 30 h nach Thoraxtrauma wiesen Traumatiere ohne

Depletion signifikant erhöhte Konzentrationen an MIP-2 auf (75 ± 9 pg/ ml bzw. 73 ± 5 pg/ ml) im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Depletion (40 ± 2 pg/ ml).

Ein gleichsinniger Verlauf mit signifikantem Unterschied zeigte sich bei den Traumatieren mit Depletion.

Drei Stunden nach Thoraxtrauma wiesen Traumatiere mit Depletion jedoch signifikant höhere Konzentrationen von MIP-2 auf als die entsprechenden Traumatiere ohne Depletion.

Bei der Messung von MCP-1 (Abb. 5C) und KC (Abb. 5D) in der BAL wurde bei den Traumatieren mit und ohne Depletion 3 und 30 h nach Thoraxtrauma ein zeitabhängiger stetiger Konzentrationsanstieg mit signifikant höheren Werten im Vergleich zu den Kontrolltieren mit und ohne Depletion beobachtet. Die Werte gipfelten zum 30 h Beobachtungszeitpunkt und waren damit in beiden Gruppen höher als bei den Traumatieren 3 h nach Trauma.

Traumatiere mit Depletion hatten zu beiden Beobachtungszeitpunkten signifikant höhere Werte an MCP-1 als die Traumatiere ohne Depletion. Bei KC hingegen bestand dieser Unterschied nur zum 3 h Zeitpunkt.

Im zeitlichen Verlauf des vorwiegend antiinflammatorisch wirkenden IL-10 (Abb. 5E) konnte eine signifikante Konzentrationserhöhung in der BAL 30 h nach Thoraxtrauma bei den Traumatieren mit Depletion beobachtet werden. Dies war signifikant im Vergleich zu den Kontrolltieren und den Traumatieren mit Depletion zum 3 h Zeitpunkt.

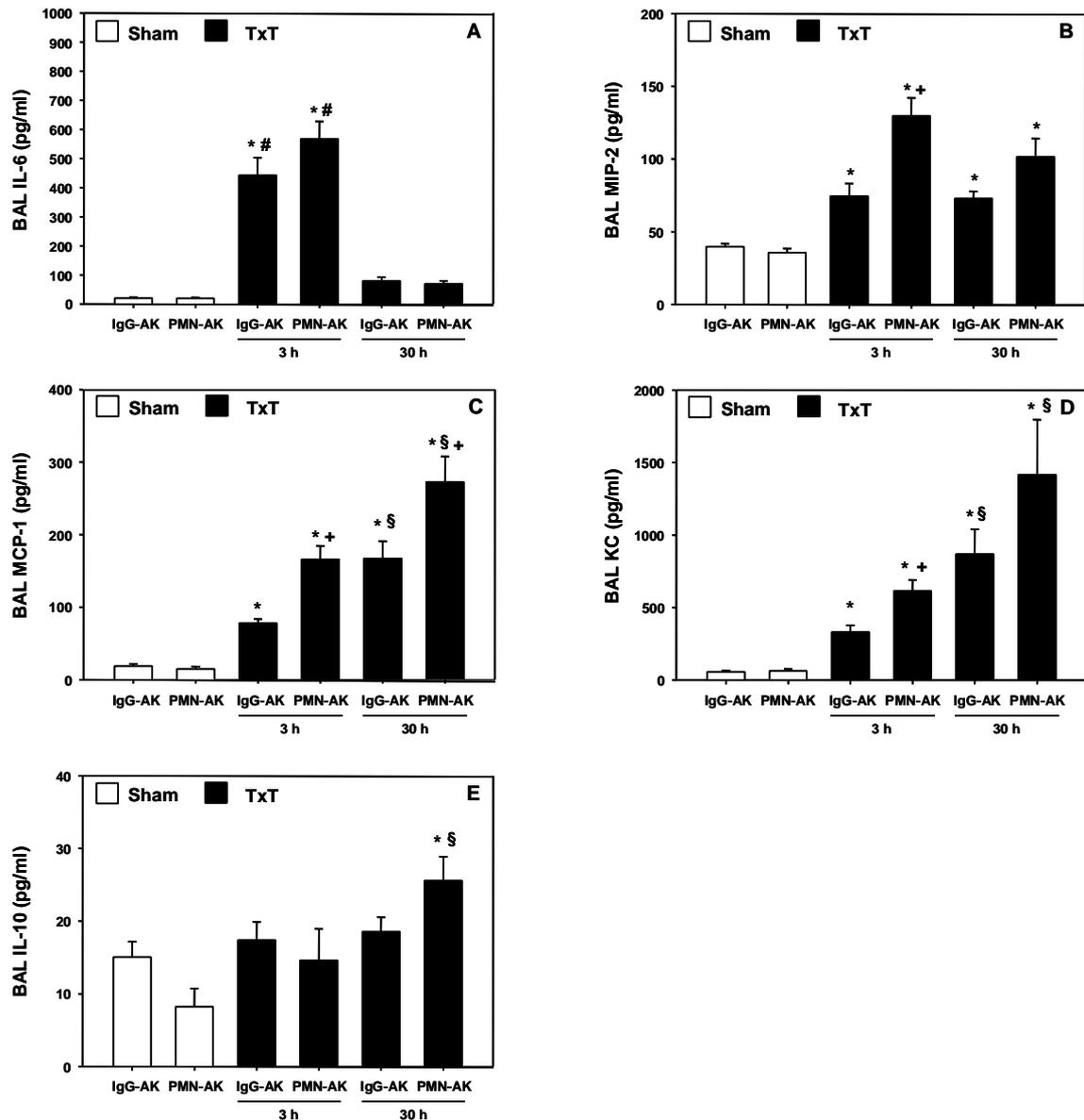


Abb. 5: Konzentrationen von Interleukin-6 (IL-6) (A), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) (B), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) (C), cytokine-induced neutrophil chemoattractant (KC) (D) und IL-10 (E) in der bronchoalveolären Lavage (BAL) 3 und 30 Stunden (h) nach Thoraxtrauma (TxT) bzw. Kontrollprozedur (Sham) mit (Polymorphkernige Granulozyten-Antikörper (PMN-AK)) und ohne (Immunglobulin-Isotypkontrolle (IgG-AK)) PMN-Depletion bei männlichen C3H/HeN-Mäusen. * $p < 0,05$ vs. korrespondierendem Sham, + $p < 0,05$ vs. korrespondierendem IgG-AK, § $p < 0,05$ vs. korrespondierendem 3 h TxT, # $p < 0,05$ vs. korrespondierendem 30 h TxT, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Test (SNK), $n = 8-10$.

3.1.2.7 Zytokine und Chemokine im Plasma

Parallel zum IL-6 Konzentrationsanstieg der Traumatiere ohne Depletion in der BAL und der Lunge 3 h nach Thoraxtrauma, bestanden auch systemisch bei den Traumatieren ohne Depletion signifikant höhere IL-6 Konzentrationen ($154,2 \pm 41,8$ pg/ml) im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Depletion (20 ± 4 pg/ml) (Abb. 6A). Zu diesem Zeitpunkt zeigten

sich auch signifikant höhere Werte gegenüber den Traumatieren ohne Depletion 30 h nach Lungenkontusion (16 ± 4 pg/ml). Ein gleichsinniger Verlauf mit entsprechenden signifikanten Unterschieden wurde auch bei den Traumatieren mit Depletion beobachtet. 30 h, jedoch nicht 3 h nach Thoraxtrauma wiesen Traumatiere mit Depletion signifikant höhere Konzentrationen an IL-6 auf als die entsprechenden Traumatiere ohne Depletion ($84,4 \pm 20,7$ pg/ml vs. $16,1 \pm 3,8$ pg/ml).

Bei der Quantifizierung von KC im Plasma (Abb. 6B) ergab sich 3 h nach Thoraxtrauma ein signifikanter Spiegelanstieg bei den Traumatieren ohne Depletion verglichen mit den Kontrolltieren ohne Depletion. 30 h nach Trauma wurde ein signifikanter Konzentrationsabfall gegenüber dem 3 h Zeitpunkt beobachtet.

Traumatiere mit Depletion wiesen im zeitlichen Verlauf nach Thoraxtrauma keine Unterschiede hinsichtlich der KC-Konzentrationen im Plasma auf. Zu allen Zeitpunkten konnten jedoch bei den Tieren mit Depletion signifikant höhere Konzentrationen an KC aufgezeigt werden im Vergleich zu den Tieren ohne Depletion.

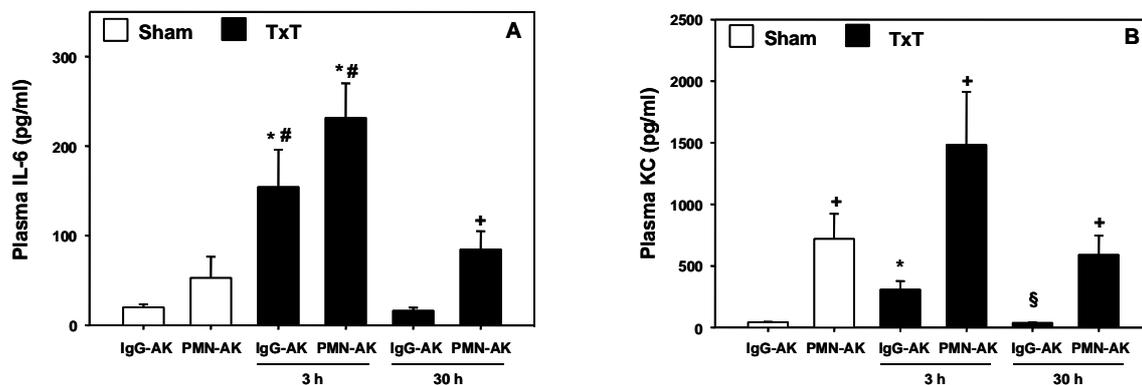


Abb. 6: Konzentrationen von Interleukin-6 (IL-6) (A) und cytokine-induced neutrophil chemoattractant (KC) (B) im Plasma 3 und 30 Stunden (h) nach Thoraxtrauma (TxT) bzw. Kontrollprozedur (Sham) mit (Polymorphkernige Granulozyten-Antikörper (PMN-AK)) und ohne (Immunglobulin-Isotypkontrolle (IgG-AK)) PMN-Depletion bei männlichen C3H/HeN-Mäusen. * $p < 0,05$ vs. korrespondierendem Sham, + $p < 0,05$ vs. korrespondierendem IgG-AK, § $p < 0,05$ vs. korrespondierendem 3 h TxT, # $p < 0,05$ vs. korrespondierendem 30 h TxT, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Test (SNK), $n = 8-10$.

3.1.2.8 Myeloperoxidaseaktivität (MPO) der Lunge

Als Maß für die Transmigration aktivierter PMN in das Lungengewebe nach Thoraxtrauma wurde die Aktivität der Myeloperoxidase in der Lunge quantifiziert (Abb. 7A).

Traumatiere ohne Depletion wiesen 3 h nach Thoraxtrauma im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Depletion eine signifikant höhere Myeloperoxidaseaktivität auf (719 ± 88 U/ g vs. 129 ± 17 U/ g). Diese war auch gegenüber dem Wert der Traumatiere ohne Depletion nach 30 h signifikant erhöht (169 ± 25 U/ g). Auch bei den Traumatieren mit Depletion wurde 3 h nach Applikation des Traumas eine höhere MPO-Aktivität als bei den Kontrolltieren mit Depletion nachgewiesen. Die Traumatiere ohne Depletion besaßen zu diesem Zeitpunkt jedoch signifikant höhere Werte als die Traumatiere mit Depletion (719 ± 88 U/ g vs. 224 ± 25 U/ g). 30 h nach Trauma konnte weder bei den Traumatieren ohne Depletion noch bei den Traumatieren mit Depletion eine erhöhte MPO-Aktivität in der Lunge nachgewiesen werden.

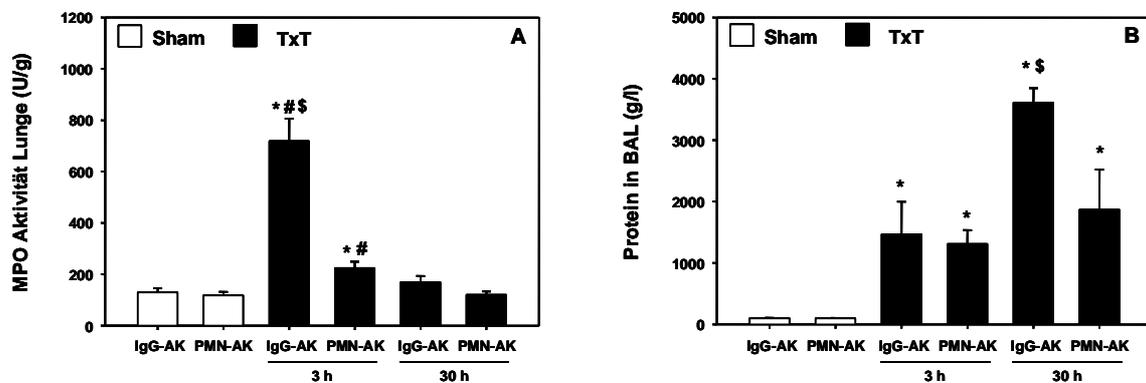


Abb. 7: Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität in der Lunge (A) sowie Proteingehalt in der bronchoalveolären Lavage (BAL) (B) 3 und 30 Stunden (h) nach Thoraxtrauma (TxT) bzw. Kontrollprozedur (Sham) mit (Polymorphkernige Granulozyten-Antikörper (PMN-AK)) und ohne (Immunglobulin-Isotypkontrolle (IgG-AK)) PMN-Depletion bei männlichen C3H/HeN-Mäusen. * $p < 0,05$ vs. korrespondierendem Sham, + $p < 0,05$ vs. korrespondierendem IgG-AK, \$ $p < 0,05$ vs. korrespondierendem PMN-AK, # $p < 0,05$ vs. korrespondierendem 30 h TxT, One Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Test (SNK), $n = 8-10$.

3.1.2.9 Protein in der BAL

Drei und 30 h nach Applikation des Thoraxtraumas war bei den Traumatieren ohne Depletion ein signifikanter Anstieg des Proteingehaltes in der BAL im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Depletion zu beobachten (Abb. 7B). Auch bei den Traumatieren mit Depletion wurde nach 3 und 30 h ein signifikanter Anstieg des Proteingehalts in der BAL im Vergleich zu den Kontrolltieren mit Depletion aufgezeigt. Gegenüber den Traumatieren ohne Depletion ergab sich 30 h nach Trauma bei den Traumatieren mit Depletion ein signifikant niedriger Gehalt an Protein in der BAL (1864 ± 657 g/ l vs. 3612 ± 237 g/ l).

3.1.2.10 Lungen-Histologie

Die Auswertung der HE-gefärbten Schnitte der Lunge hinsichtlich histologischer Folgen des Thoraxtraumas ergab bei allen Traumatieren intraalveoläre Hämorrhagien mit überwiegend großflächigen Ansammlungen von Erythrozyten (flächenhafte Einblutung). Zusätzlich fanden sich bei einem Teil der Traumatiere perivaskuläre Einblutungen, welche bei den Traumatieren mit Depletion reduziert waren. Weitere bei der histologischen Auswertung untersuchte Parameter wie intrabronchiale Einblutung, interstitielles Ödem, Pleura- und Endothelschwellung waren bei Traumatieren ohne Depletion nachweisbar. Auffallend war bei den Traumatieren zudem eine Invasion von PMN sowie eine Beeinträchtigung der Lungenarchitektur.

Die Gabe des PMN-AK bewirkte bei den Kontrolltieren keine Unterschiede, wohingegen bei den Traumatieren zu beiden Beobachtungszeitpunkten reduzierte PMN-Anzahlen im Lungengewebe sowie ein vermindertes interstitielles Ödem nachgewiesen werden konnte. 30 h nach Thoraxtrauma war das Ausmaß des Ödems weiter reduziert. Abb. 8 zeigt beispielhaft für jedes Tier einer Versuchsgruppe den entsprechenden histologischen Lungenbefund nach HE-Färbung mit den Auswirkungen einer Kontroll- oder Traumabehandlung sowie der Gabe von Immunglobulin-Isotypkontrolle (IgG-AK) oder PMN-AK.

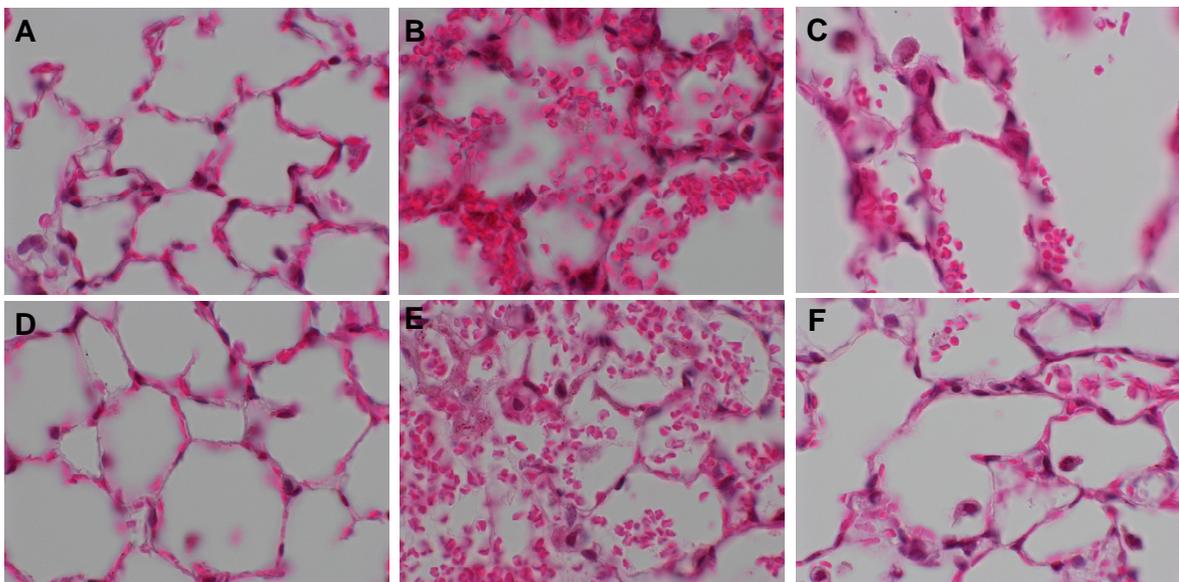


Abb. 8: Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbte mikroskopische Lungenbefunde eines Kontrolltiers mit Immunglobulin-Isotypkontrolle (IgG-AK) (A) oder polymorphkernigem Granulozyten-Antikörper (PMN-AK) (D) im Vergleich zu einem Traumatier 3 Stunden (h) nach Thoraxtrauma mit IgG-AK (B) oder PMN-AK (E) sowie einem Traumatier 30 h nach Thoraxtrauma mit IgG-AK (C) oder PMN-AK (F) bei männlichen C3H/HeN-Mäusen.

4 DISKUSSION

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, stellt das Thoraxtrauma sowohl als Einzelverletzung als auch im Rahmen eines Polytraumas eine bedeutsame Verletzung dar. Dabei auftretende lokale und systemische inflammatorische Auswirkungen einer Lungenkontusion sind jedoch nur unzureichend erforscht. Posttraumatisch stellen die Transmigration von PMN in die Lunge, die Erhöhung der alveolokapillären Permeabilität sowie die Entzündungsreaktion in der Lunge wichtige pathophysiologische Veränderungen dar.

In verschiedenen klinischen Studien konnte sowohl beim Menschen als auch in Tierversuchen eine für die Transmigration der PMN wesentliche Aktivierung von Oberflächenrezeptoren auf den PMN durch unterschiedliche inflammatorische Stimuli wie z.B. Trauma (28), LPS (129), GM-CSF (76), TNF- α (184) oder Sepsis (5,109) nachgewiesen werden. Die für diese Arbeit getroffene Auswahl der Oberflächenrezeptoren CD62L, CD11b und CD31 beruhte auf den in der Literatur als wesentlich für die Transmigration der PMN beschriebenen Parameter (35,70,135,202).

Mit Aktivierung der PMN ist ebenso eine Verzögerung ihrer Apoptoserate im Rahmen von Inflammation bzw. Infektion beschrieben. Ayala et al. konnten nach hämorrhagischem Schock allein oder aber auch in Kombination mit einer nachfolgenden Sepsis eine verminderte Apoptoserate der PMN bei gleichzeitig gesteigerter Bildung von O₂ Radikalen beobachten (5). Auch eine isolierte Sepsis kann eine reduzierte PMN-Apoptoserate bedingen (116,195). Während der Apoptose kommt es zu mannigfaltigen morphologischen Veränderungen der PMN (146). Als Marker haben sich in der Literatur u.a. Annexin V und aktive Caspase-3 als geeignet erwiesen, die Apoptose zu erfassen (2,99,146).

Die pathomechanistische Rolle der PMN nach Thoraxtrauma ist bisher nicht geklärt. Insbesondere bleibt offen, inwiefern die PMN nach isolierter Verletzung der Lunge aktiviert werden, in die Lunge auswandern und dort an der Modulation der lokalen Entzündungsreaktion teilnehmen. Ziel des ersten Versuchs war es daher, die zeitliche Expression der Oberflächenrezeptoren CD62L, CD11b und CD31 auf den PMN während der Transmigration zu verfolgen und das Apoptoseverhalten der PMN mittels der Marker Annexin V und aktiver Caspase-3 zu analysieren.

Aufgrund der Tatsache, dass PMN bereits früh während einer Entzündungsreaktion an den Ort der Inflammation rekrutiert werden, scheinen diese Zellen in der Entstehung der Inflammation eine zentrale Stellung einzunehmen. Während einer akuten

Lungenschädigung kann eine Dysregulation mit vermehrter Sequestration der PMN in die Lunge stattfinden. Dies korrelierte in Studien nachweislich mit einer erhöhten Gewebsschädigung (108,139). Hierbei kam es zunächst nicht nur lokal zu einer Änderung der Zytokinproduktion, sondern im Verlauf auch zu einer systemischen (97,98,150,151). Bis dato ist jedoch nicht geklärt, inwiefern aktivierte PMN an der lokalen pulmonalen und systemischen Inflammation, sowie an der Modulation des Schweregrades des Lungenschadens nach Thoraxtrauma mit isolierter Lungenkontusion beteiligt sind. Ziel des zweiten Versuchs war es daher, nach einer Depletion der PMN die Auswirkung auf die Zytokinproduktion lokal in der Lunge, aber auch systemisch anhand der Plasmakonzentrationen darzustellen und das Ausmaß der Lungenschädigung zu beurteilen. Für die entzündlichen Veränderungen nach Trauma wurden das vorwiegend proinflammatorische Zytokin IL-6 (44,191) sowie die Chemokine KC, MIP-2 und MCP-1 ausgewählt (79,91). Von den vorwiegend antiinflammatorischen Zytokinen wurde IL-10 quantitativ erfasst. (41,45).

4.1 Oberflächenrezeptoren

Den ersten Schritt während der Transmigration stellt das „Rolling“ der PMN über die Endothelzellen dar, wobei es zu einer vorübergehend schwachen Interaktion zwischen den Adhäsionsmolekülen beider Zellen kommt (171,197). Im Gegensatz zu den meisten anderen Organen, wo die PMN Sequestration im Bereich der post-kapillären Venolen stattfindet, stellt das alveoläre Kapillarbett der Lunge eine Besonderheit dar. Die Transmigration findet hier direkt in den pulmonalen Kapillaren statt, welche aus einem komplex verzweigten Netzwerk aus kleinen Kapillarsegmenten bestehen (23). Der Weg von Arteriole zu Venole durchbricht einige Alveolarwände (manchmal über 8) und enthält oft über 50 Kapillarsegmente (23). Vergleicht man den Gehalt an PMN mit großen Gefäßen der meisten Kapillarbetten, so zeigt sich in der Lunge eine ungefähr 50-fach erhöhte Konzentration dieser Zellart (49). Die durchschnittliche Verweildauer der PMN in den Kapillaren beträgt im Mittel 6,1 Sekunden (23). Es ergeben sich daher weitere Aspekte hinsichtlich des ursprünglich beschriebenen „multi-step Paradigma“ von Butcher und Springer mit „Rolling“, fester Anhaftung und Diapedese. Der Durchmesser eines sphärischen PMN beträgt ca. 6-8 μm und ist damit oft größer als der vieler Kapillarsegmenten (2-15 μm) (23). Somit kann das Rollen entlang der Gefäßwand oftmals nicht stattfinden und die PMN müssen aktiv ihre Form ändern um die Kapillaren passieren zu können (48,117). Doyle et al. zeigten an CD62L defizienten Mäusen, dass diese

während einer bakteriellen Pneumonie den gleichen Pool an PMN in der Lunge wie die Kontrollmäuse besaßen (52). Somit geht man davon aus, dass auch mechanische Eigenschaften für die Sequestration in der Lunge verantwortlich sind. Diesbezüglich könnten Mediatoren wie z.B. der Komplementfaktor C5a, an Rezeptoren der PMN binden und dadurch zu einer verminderten Verformbarkeit dieser führen. Das dadurch vergrößerte Zellvolumen bedingt eine Verzögerung der Kapillarpassage (23). Hilfreich könnte diese verlängerte Verweildauer für die PMN sein, einen möglichen inflammatorischen Prozess wahrzunehmen und dadurch aktiviert zu werden. Nach dieser initialen Sequestration sind CD62L und Integrine jedoch essentiell, um die PMN für einige weitere Minuten im Kapillargebiet festzuhalten (46,100). Eine Blockade dieser Rezeptoren durch monoklonale Antikörper zeigte in mehreren Studien eine gesteigerte Freisetzung von PMN aus der Lunge (46,50,52). Zudem konnte dargestellt werden, dass durch die Antikörpergabe eine im Ausmaß reduzierte Lungenschädigung nach infrarenaler Ischämie und Reperfusion bei Schafen auftrat (170) und auch eine geringere mikrovaskuläre Permeabilität der Lunge nach Verbrennung und Rauchinhalation zur Folge hatte (96). Bei Pavianen wurde eine höhere Überlebensrate mit geringerer Organschädigung 24 h nach traumatisch-hämorrhagischem Schock beobachtet (164). Somit scheinen extravasierte PMN pathomechanistisch an der Entwicklung einer akuten Lungenschädigung beteiligt zu sein. In den vorliegenden Versuchen wurde CD62L bereits zu 96% von den Kontrolltieren exprimiert. Dieser Wert wurde durch das Trauma nicht weiter gesteigert.

12 h nach Traumaapplikation kam es zu einem Absinken der CD62L Expression auf den PMN, welche statistische Signifikanz 24 h nach Lungentrauma erreichte. Möglich ist hier ein Abspalten („Shedding“) von CD62L von der Oberfläche der PMN. Seekamp et al. beobachteten diesen Vorgang nach elektiven Operationen an Extremitäten sowie nach Polytraumata (ISS über 20) beim Menschen (172). Auch 24 h nach elektiven Operationen der unteren Extremität wurde eine erniedrigte CD62L Expression auf den PMN verzeichnet. Mommsen et al. beobachteten diesen Effekt nach vorheriger Inkubation des Blutes mit TNF- α (127). Durch das Abspalten kann möglicherweise der Übergang von der Anhaftung der PMN zur Extravasation erleichtert werden (95). Das abgespaltene, lösliche L-Selektin (sL-Selektin) kann dann entweder an seinem Ligand an der Endotheloberfläche gebunden bleiben oder frei in die Zirkulation gelangen. Dadurch kann ein übermäßige PMN-Rekrutierung zum Ort der Inflammation über blockierte Rezeptoren der Endothelzellen erreicht werden (80,165). Durch Blockierung der enzymatischen

Abspaltung von L-Selektin konnte so z.B. gezeigt werden, dass PMN länger am aktivierten Endothel anhafteten (80).

Locker angehaftete PMN können aufgrund des engen Kontaktes zum vaskulären Endothel von chemotaktischen Zytokinen, die auf der apikalen Oberfläche der Endothelzellen präsentiert werden, aktiviert werden (25,182). Durch nachfolgende Aktivierung intrazellulärer Signalwege z.B. via CD62L, kommt es in einem weiteren Schritt zur festen Anhaftung der PMN an das Endothel (34,74,182,217). Integrine stellen während diesem Prozess einen wichtigen Bestandteil dar und können nach Stimulation schnell aus intrazellulär gespeicherten Vesikeln und Granula auf die Oberfläche der PMN mobilisiert werden (19,75,204). Die PMN benutzen in diesem Stadium v.a. die Rezeptoren CD11b/CD18 (Macrophage-1 antigen, Mac-1), das eine Kombination aus einer α_M - und einer β_2 -Kette darstellt (111,202). Der entsprechende Gegenrezeptor auf Seite des Endothels ist ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1), das durch Stimulation (z.B. inflammatorische Zytokine) vermehrt exprimiert wird (73,82).

30 Min nach Traumapplikation zeigte sich in unseren Versuchen eine signifikant erhöhte CD11b Expression auf den PMN bei den Traumatieren. In der Literatur lassen sich diesbezüglich ebenfalls Hinweise für eine Veränderung der CD11b Expression auf PMN nach unterschiedlichen Traumata finden. So beschrieben Maekawa et al. bei polytraumatisierten Patienten mit $ISS \geq 16$ eine frühzeitig erhöhte CD11b Expression auf den PMN bereits nach 3 h (112). Auch nach elektiven chirurgischen Eingriffen bei Patienten mit nachfolgender Sepsis wurde am ersten postoperativen Tag eine erhöhte Expression von CD11b auf PMN nachgewiesen (203). Hoth et al. konnten nach pulmonaler Kontusion (ausgelöst durch einen Schlag mit einem Kolben nach vorheriger Thorakotomie) bei der Ratte eine Hochregulation von CD11b auf PMN nach 3 h beobachten (89). Auch andere Stimuli wie z.B. Verbrennungen können eine Hochregulation von CD11b auf den PMN bedingen (94). Unsere Ergebnisse bestätigen somit eine posttraumatische Aktivierung der PMN und zeigen, dass diese früh im Rahmen einer bilateralen Lungenkontusion zu beobachten ist.

Im letzten Schritt der Transmigration kommt es zur Wanderung der PMN über die luminale Oberfläche der Endothelzellen. Dort zwängen sich die PMN durch die interzellulären Spalten des Endothels (Diapedese) und gelangen nach Passage der Basalmembran in den extravaskulären Raum (133). Neben den Integrinen spielt hierbei CD31 (PECAM-1, Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) eine wichtige Rolle (103). Dieser Rezeptor ist auf der Oberfläche zirkulierender PMN exprimiert (140,190).

Bisher wurde angenommen, dass die entsprechenden Gegenrezeptoren auf den Endothelzellen hauptsächlich im Bereich der interzellulären Verbindungen zwischen den Endothelzellen lokalisiert sind (132). Feng et al. konnten hingegen nachweisen, dass CD31 über die gesamte Oberfläche des vaskulären Endothels verteilt ist (60). Dies ermöglicht eine homophile Interaktion zwischen CD31 auf den PMN und dem ebenfalls auf den Endothelzellen exprimierten CD31 (135,154).

Die Notwendigkeit von CD31 auf PMN im Transmigrationsprozess konnte mit gegen CD31 gerichteten Antikörpern näher beleuchtet werden. Hierbei wurde eine Reduktion der transendothelialen Migration von PMN in Zellkulturversuchen um ca. 70 – 90 % erreicht (133). Im Rahmen einer Peritonitis wurde durch eine i.v. Antikörperapplikation gegen CD31 eine reduzierte Emigration von Leukozyten in das Peritoneum beobachtet (27). Weitere Studien konnten eine reduzierte Migration der PMN zum Ort der Inflammation nach Gabe von CD31-Antikörpern bei Katzen nach myokardialer Ischämie und Reperfusion belegen mit dem Resultat einer Reduktion des Infarktareals (78).

In unseren Versuchen zeigte sich 2 h nach Thoraxtrauma eine verminderte Expression von CD31 auf den PMN, wohingegen sich nach 24 h eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren ergab. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit Studien, die darauf hinweisen, dass dieser Rezeptor zu einem frühen Zeitpunkt während des Transmigrationsprozesses der PMN nicht benötigt wird. Galinanes et al. beobachteten diesbezüglich bereits 1 h nach Bypass-Operation auf PMN eine Herunterregulation von CD31 mit darauffolgendem Anstieg nach 48 h (68). Auch Bhatia et al. fanden nach schweren Verletzungen beim Menschen (ISS= 22) eine Herunterregulation der CD31 Expression auf PMN 24 h nach Trauma mit Normalisierung in der Kontrolle an Tag 5 (15). Wang et al. postulierten ein Abspalten von CD31 von der Oberfläche der PMN während „Respiratory Syncytial Virus“-Bronchiolitis (15). Die in den hier dargelegten Versuchen verminderte CD31 Expression 2 h nach Thoraxtrauma könnte somit daher resultieren, dass zu diesem Zeitpunkt andere Rezeptoren (wie z.B. CD11b) aktiviert sind und es kompensatorisch zu einer Herunterregulation von CD31 auf den PMN kommt, wohingegen die erhöhte CD31 Expression nach 24 h auf eine weitere Aktivierung der PMN zum späteren Zeitpunkt des Inflammationsprozesses hinweisen könnte.

4.2 Apoptose

Während der Apoptose verlieren die PMN zeitgleich zur Chromatinkondensation im Zellkern die Asymmetrie ihrer Membranphospholipide bei primär weiterhin erhaltener

Zellmembranintegrität (83,99,162). Phosphatidylserin, ein negativ geladenes Phospholipid, wird dabei von der Innen- auf die Außenseite der Zelloberfläche externalisiert (99,146). Durch die Bindung von Farbstoff markiertem Annexin V können diese Phosphatidylserinreste markiert und damit PMN in diesem Stadium der Apoptose aufgrund der emittierten Fluoreszenz durchflusszytometrisch gemessen werden (99).

Caspasen stellen eine Klasse von proteolytischen Enzymen dar, die zelluläre Substrate spalten und dadurch zur Aktivierung bzw. Inaktivierung von Proteinen führen, die am Aufspalten der RNA, der Reparatur von DNA oder dem Erhalt der Zellstruktur beteiligt sind (56,118,161). Die Aktivierung von Caspase-3 über eine intrazelluläre Signalkaskade kann hierbei über mindestens zwei verschiedene Wege erfolgen. Erstens einen extrinsischen, rezeptorabhängigen (134) oder aber zweitens einen intrinsischen, mitochondrienabhängigen Weg (39,181). Caspase-3 als „Effektor-Caspase“ besitzt die Eigenschaft zur Spaltung von Inhibitoren der caspase-aktivierten DNase (ICAD) mit nachfolgender Spaltung der DNA im Zellkern (146,208).

Bereits 30 Min nach Thoraxtrauma wiesen die PMN der Tiere in unseren Versuchen eine signifikant niedrigere Phosphatidylserin-Externalisierung im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Parallel hierzu ließ sich 30 Min nach Thoraxtrauma eine erniedrigte Caspase-3-Aktivität bei den PMN der Traumatiere mit dann nachfolgend niedrigstem Wert zum Beobachtungszeitpunkt nach 2 h nachweisen. Diese Daten legen dar, dass es durch ein Lungentrauma zu einer verminderten Apoptoserate der PMN und damit möglicherweise zu einer verlängerten Überlebensdauer kommt. Parsey et al. beschrieben diesbezüglich erniedrigte Apoptoseraten der PMN bei Mäusen bereits 1 h nach hämorrhagischem Schock sowie bei muriner Endotoxinämie mit Normalisierung nach 48 h (144). Matute-Bello et al. zeigten eine verminderte Apoptose von PMN in der BAL bei Patienten mit ARDS am 1. Tag der Erkrankung (120). PMN von Ratten wiesen bereits 2 h nach Verbrennung erniedrigte Apoptoseraten mit verminderter Phosphatidylserin- und aktiver Caspase-3 Expression auf (90).

Auch für eine frühe Inhibition der aktiven Caspase-3 finden sich Hinweise in der Literatur. Taneja et al. zeigten während einer Sepsis bei Patienten eine verminderte Caspase-3 Aktivität bei reduzierter Apoptoserate der PMN nach 24-stündiger Anzüchtung in Zellkulturen auf (195). Während einer akuten Pankreatitis mit SIRS wurde eine verzögerte Apoptose der PMN mit erniedrigter Aktivität der Caspase-3 beim Menschen nachgewiesen (176). Chello et al. zeigten nach koronarer Bypassoperation eine erniedrigte Caspase-3 Aktivität in PMN mit verlängerter Lebenszeit in Zellkulturen nach 18 und 24 h (26).

Als Ursache der initial reduzierten Apoptoserate der PMN kommen proinflammatorische Signale im Rahmen der Entzündungsreaktion infrage, wie z.B. G-CSF, GM-CSF, TNF- α , IL-6 oder IL-8 (30,121). Passend hierzu fanden sich in unseren Versuchen 3 h nach Thoraxtrauma lokal in der Lunge und BAL erhöhte Konzentrationen an IL-6, MIP-2, MCP-1 und KC. Auch systemisch im Plasma konnten bei den Tieren 3 h nach Traumaauslösung höhere Spiegel an IL-6 und KC beobachtet werden.

Die verminderte Apoptoserate der PMN erlaubt eine längere Verweildauer am Ort der Inflammation. Wie noch unten dargelegt zeigt sich dies in unseren Versuchen an einer erhöhten PMN-Anzahl in der BAL 30 h nach Thoraxtrauma. Eine verlängerte Verweildauer der PMN in der Lunge kann aber möglicherweise an der Entstehung der akuten Lungenschädigung beteiligt sein. Ayala et al. wiesen diesbezüglich 24 h nach hämorrhagischem Schock bei der Maus eine verminderte Apoptoserate der PMN mit gleichzeitig erhöhter Generierung von O₂-Radikalen nach (5).

Im Gegensatz hierzu finden sich aber auch Hinweise, dass PMN in der Lage sind, einen entstehenden Lungenschaden abzumildern. Perl et al. folgerten dies aus einem „double-hit“ Modell bei Mäusen (149). Die Versuchstiere wurden zunächst einem hämorrhagischen Schock unterzogen, was eine initiale Aktivierung („priming“) der PMN bewirkte. Abhängig vom „second-hit“ kam es zu einer Modulation des Ausmaßes des Lungenschadens. Bei Entwicklung einer systemischen Inflammationsreaktion (SIRS) ohne Infektion verstärkten PMN den Lungenschaden. Folgte hingegen eine Sepsis, konnten PMN die Lungenschädigung abmildern (149). Ursächlich hierfür könnte die unterschiedliche Ausbalancierung eines antibakteriellen (benefiziellen) und gewebeschädigenden (destruierenden) Effektes sein.

4.3 PMN-Verhalten im Blut und der BAL sowie MPO-Aktivität

Zur weiteren Beurteilung der Rolle der PMN im Rahmen der lokalen und systemischen Inflammation sowie des Lungenschadens nach Thoraxtrauma erfolgte eine Depletion der PMN mittels eines monoklonalen Antikörpers vor Traumaauslösung. Wie bereits vorbeschrieben wurde, führt dies zu einer deutlichen Reduktion der PMN-Anzahl (31,109). Auch in unseren Versuchen wiesen Tiere mit PMN-AK (mit Depletion) zu den verschiedenen Messzeitpunkten im Blut und der BAL eine signifikant niedrigere PMN-Anzahl auf als Tiere mit IgG-Isotypkontrolle (ohne Depletion).

Drei Stunden nach Thoraxtrauma wurde im peripheren Blut eine Zunahme der PMN-Anzahl nachgewiesen. Dies lässt auf eine vermehrte systemische Freisetzung der PMN

schließen. Es ist wahrscheinlich, dass die Zunahme durch eine Freisetzung der PMN aus dem Knochenmark bedingt war. Im Rahmen einer Infektion der distalen Atemwege und des ARDS konnte diesbezüglich eine vermehrte Rekrutierung der PMN aus dem Knochenmark gezeigt werden (47,67). Die Erhöhung des PMN-Anteils im peripheren Blut war jedoch nur temporär. 30 h nach ausgelöstem Thoraxtrauma sank der PMN-Anteil wieder auf Höhe des Ausgangsniveaus.

Durch das Thoraxtrauma ausgelöst fand sich in unseren Versuchen zu beiden Beobachtungszeitpunkten eine erhöhte PMN-Anzahl in der BAL. Der Gipfel wurde hierbei 30 h nach Thoraxtrauma erreicht. Perl et al. konnten zeigen, dass es bereits 0,5, 2 und 24 h nach isolierter Lungenkontusion bei Mäusen zu einem Anstieg der PMN-Anzahl in der BAL kommt (150). Auch 8 h nach unilateraler Lungenkontusion bei Schweinen war eine höhere PMN-Anzahl in der BAL nachzuweisen (192). Im Sinne einer pulmonalen Rekrutierung wandern die PMN daher aus dem Blut in Richtung des Entzündungsherd aus, wobei sich dort im zeitlichen Verlauf eine zunehmende Akkumulation der PMN entwickelt.

Durch die PMN-Depletion konnte in unseren Versuchen 3 und 30 h nach Trauma eine signifikant niedrigere PMN-Anzahl in der BAL nachgewiesen werden. Somit führte die präexpositionelle PMN-AK Behandlung zu einer posttraumatisch reduzierten Rekrutierung von PMN nach intraalveolär. Im Rahmen eines septischen ARDS konnte eine Korrelation zwischen Neutrophilie in der BAL und schlechter Prognose aufgezeigt werden (188). Gestützt wird dies durch Studien von Lomas-Neira et al., in denen eine PMN-Depletion vor hämorrhagischem Schock und Sepsis zu einem geringeren Proteingehalt in der Lunge, einem reduziertem Ausmaß der Entzündung sowie Schwere des akuten Lungenschadens führte (109).

Als weiteres Maß der PMN-Rekrutierung in die Lunge kam es bereits 3 h nach Thoraxtrauma zu einer signifikant erhöhten MPO-Aktivität im Lungengewebe der Traumatiere ohne Depletion. Auch bei den Traumatieren mit Depletion zeigte sich im Vergleich zu den Kontrolltieren ein leichter Anstieg. Dieser war jedoch signifikant geringer ausgeprägt als bei den Traumatieren ohne Depletion. Dass es trotz der PMN-AK Applikation zu einem Anstieg der MPO-Aktivität kam, lässt auf eine nicht vollständige Eliminierung der PMN durch den Antikörper schließen. Aufgrund der bekannten antimikrobiellen Eigenschaften der PMN könnte aber eine therapeutische Reduktion der PMN-Anzahl einer vollständigen Depletion klinisch überlegen sein.

30 h nach Trauma befand sich die messbare MPO-Aktivität beider Gruppen wieder auf Höhe des Ausgangsniveaus der Kontrolltiere.

Diese Ergebnisse verdeutlichen eine frühe Aktivierung der PMN durch das Thoraxtrauma mit Extravasation ins Lungengewebe. Passend zu dieser Dynamik fand sich auch ein Anstieg der PMN-Anzahl in der BAL, welcher wiederum, wie nachfolgend dargestellt, mit einem frühen signifikanten Anstieg der Chemokine MIP-2, KC und MCP-1 in der BAL und der Lunge korrelierte.

4.4 Entzündungsantwort

Die akute Lungenschädigung ist mit einer signifikanten Letalität bei Trauma- und Sepsispatienten vergesellschaftet (206). Die Akkumulation aktivierter PMN im Lungengewebe im Rahmen einer Inflammationsreaktion kann dabei eine entscheidende Rolle für die Entwicklung einer akuten Lungenschädigung spielen (109). Die Rekrutierung von PMN zum Ort der Infektion bzw. Inflammation wird v. a. über lokal oder systemisch freigesetzte Zyto- und Chemokine erreicht (71,213). Einen entscheidenden Schritt der posttraumatischen Entzündungsreaktion stellt hierbei die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine dar (42).

IL-6 wird als zentrales Zytokin den „akute Phase Proteinen“ zugeschrieben (85). Es wirkt vor allem proinflammatorisch, aber es wird auch über antiinflammatorische Effekte, wie z.B. Expressionsverminderung von TNF- α und IL-1 berichtet (42). Dies kann bei übermäßiger Produktion an einer Immunsuppression nach Trauma beteiligt sein (17). Bereits 3 h nach Traumaapplikation kam es in unseren Versuchen im Lungengewebe und der BAL bei den Traumatieren ohne Depletion zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration von IL-6 mit Rückgang der Werte auf das Ausgangsniveau 30 h nach Trauma. Diese Ergebnisse korrelieren mit der bestehenden Datenlage. Perl et al. beobachteten nach isolierter Lungenkontusion bei der Maus ebenfalls einen frühen Anstieg der IL-6 Konzentration in der BAL und dem Lungengewebe 2 h nach Trauma mit Normalisierung der Werte 24 h nach Kontusion (150). Auch im Rahmen eines ARDS, ausgelöst durch indirekte oder direkte Lungenschädigung, fanden sich bei Menschen erhöhte IL-6 Konzentrationen in der BAL (122). Die Lunge scheint somit eine bedeutende Quelle von IL-6 nach direktem mechanischem Trauma zu sein. Endothelzellen, Alveolarmakrophagen und Typ II Alveolarepithelzellen wurden hierbei als intraalveoläre Hauptquelle in der Lunge beschrieben (33,105,152).

Bezüglich einer Verletzung des Lungengewebes wurde von Perl et al. als eine mögliche Ursache für eine frühe Freisetzung von IL-6 das Vorliegen von bereits präformiertem IL-6 im Lungengewebe angenommen, welches in Abhängigkeit des Ausmaßes der Gewebeschädigung freigesetzt wird (152).

Eine Veränderung der IL-6 Kinetik in der Lunge bzw. der BAL konnte nach PMN-Depletion nicht beobachtet werden. Auch in Abwesenheit der PMN kam es nach Traumaauslösung in der Lunge und der BAL zu einem Konzentrationsanstieg. Die An- bzw. Abwesenheit der PMN nahm somit keinen Einfluss auf die lokale IL-6 Freisetzung in der Lunge nach Thoraxtrauma. Aus diesem Grund müssen andere Zellen, wie oben beschrieben, als Produktionsstätte von IL-6 in Frage kommen.

Nicht nur lokal, sondern auch systemisch im Plasma konnte 3 h nach Thoraxtrauma ein signifikanter IL-6 Konzentrationsanstieg bei den Traumatieren mit und ohne Depletion in unseren Untersuchungen beobachtet werden. Dies entspricht einer frühen systemischen posttraumatischen Entzündungsantwort. Bereits 30 h nach Thoraxtrauma trat eine Normalisierung der Werte auf Ausgangsniveau ein. Interessanterweise zeigten Traumatiere mit Depletion zu diesem Beobachtungszeitpunkt signifikant höhere Messwerte als die entsprechenden Traumatiere ohne Depletion.

In verschiedenen Studien wurde ein rascher Anstieg von IL-6 im Plasma nach Thoraxtrauma mit anschließendem wiederum schnellem Konzentrationsabfall beobachtet (97,98,150,151,201). Zudem bestätigte sich dieser zeitabhängige Verlauf bei klinischen Beobachtungen nach Thoraxtrauma (191,196). Mannigfaltige Untersuchungen konnten bei Patienten nach Thorax- und Abdominaltrauma, nach Kopfverletzungen und Frakturen, nach hämorrhagischem Schock, nach experimenteller Ischämie und Reperfusion, nach Verbrennungen und nach chirurgischen Eingriffen erhöhte Konzentrationen an IL-6 im Plasma nachweisen (8,12,36,57,159,169,191,196). Die IL-6 Konzentration im Plasma wird dabei als ein diagnostischer Marker für das Ausmaß und die Schwere einer Verletzung gesehen (152,191). Abhängig vom IL-6 Spiegel können auch prognostische Aussagen zu ARDS und Multiorganversagen getroffen werden (122,160).

Erhöhte IL-6 Konzentrationen sind verbunden mit einer verzögerten Apoptoserate der PMN (16). Dies deckt sich gut mit unseren Ergebnissen einer verminderten Apoptoserate der PMN bei gleichzeitiger lokaler und systemischer Erhöhung von IL-6. Die mit erniedrigter Apoptose verbundene verlängerte Verweildauer der PMN im Lungengewebe könnte so über Freisetzung zytotoxischer Substanzen aus PMN eine aggravierte

Lungenschädigung zur Folge haben und damit die Prognose der akuten Lungenschädigung verschlechtern.

Die erhöhte IL-6 Konzentration im Plasma 30 h nach Thoraxtrauma bei den Traumatikern mit Depletion könnte dadurch zustande kommen, dass von PMN ausgehende hemmende Einflüsse auf andere Zellen fehlen und diese dadurch vermehrt IL-6 produzieren. Kupffer Zellen der Leber wurden hierbei als mögliche Quelle für das systemisch messbare IL-6 identifiziert. Durch Kupffer Zellen Depletion 48 h vor traumatisch-hämorrhagischem Schock wurde so eine signifikant reduzierte IL-6 Konzentration im Plasma nachgewiesen (166).

Für eine Beeinflussung der IL-6 Konzentration durch PMN finden sich weitere Hinweise in der Literatur. Daley et al. konnten diesbezüglich in der Wundflüssigkeit von Mäusen nach PMN-Depletion ebenfalls höhere Konzentrationen an IL-6 und TNF- α messen als bei Mäusen mit normaler PMN-Anzahl (38). Hierbei wurde eine Beeinflussung der Zytokinsekretion der Makrophagen durch PMN beschrieben. Über einen bzw. mehrere bisher nicht definitiv benennbare lösliche Mediatoren, welche von PMN ausgeschüttet werden, wird die Zytokinfreisetzung der Makrophagen supprimiert. Dies geschieht in einem reziproken Verhältnis. Je mehr PMN vorhanden sind, desto geringer ist die Zytokinfreisetzung aus den Makrophagen. Marcinkiewicz et al. beschrieben als Mechanismus eine Freisetzung von Taurinchloramin durch aktivierte PMN als möglichen Mediator (114). Am Ort des Entzündungsgeschehens produzieren PMN ausgiebig Superoxidanionen (O_2^-). Diese können sich zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) verwandeln. Aufgrund fehlender Ladung diffundiert H_2O_2 in entzündetes Gewebe und kann dort akkumulieren. PMN wandeln H_2O_2 durch MPO in die weitaus potentere Hypochlorsäure (HOCl) um. Diese reagiert wiederum mit der in PMN vorhandenen Aminosäure Taurin zu Taurinchloramin (167). Studien belegen eine antiinflammatorische Wirkung von Taurinchloramin (113). Dabei kann Taurinchloramin aktiv in die Zyto- und Chemokin produzierenden Zellen aufgenommen werden (167). So wurde eine geringere Chemokinproduktion (MCP-1 und MIP-2) durch Alveolarmakrophagen beschrieben (106). Auch die Produktion von IL-6, IL-8 und TNF- α wird unterdrückt (113,167). Ob weitere Mediatoren einen ähnlichen Effekt auszulösen vermögen ist derzeit unklar und bedarf weiterführender Untersuchungen.

Die von uns dargelegten Ergebnisse veranschaulichen deutlich, dass PMN antiinflammatorische Eigenschaften in der Entzündungsantwort nach Thoraxtrauma besitzen und die Freisetzung von IL-6 in die Zirkulation vermindert wird.

MIP-2 stellt ein wichtiges Chemokin für PMN dar und sorgt für deren Rekrutierung an den Ort der Inflammation (62). Produziert wird MIP-2 sowohl von Gewebsmakrophagen als auch von bronchoalveolären Epithelzellen als Antwort auf inflammatorische Stimuli (213). Eine Regulierung der Expression von MIP-2 kann z.B. durch TNF- α erfolgen. Czermak et al. wiesen in einem Rattenmodell nach intratrachealer bzw. i.v. Gabe von Antikörpern gegen TNF- α niedrigere Spiegel an MIP-2 in der BAL nach (37).

KC gehört wie auch MIP-2 zur Gruppe der CXC Chemokine und zeichnet sich durch seine Eigenschaft aus, speziell PMN zu aktivieren und zu rekrutieren (7). Strukturell wie auch funktionell weisen KC und MIP-2 Ähnlichkeiten mit dem humanen IL-8 auf. Wie bei MIP-2 kann die Expression z.B. über TNF- α reguliert werden (37,198). Im Unterschied zu MIP-2 wird KC vor allem von Endothel- oder Mesothelzellen gebildet (1,3). Auch PMN selbst scheinen in gewissem Ausmaß KC produzieren zu können (71). Es gibt Hinweise darauf, dass es posttraumatisch über eine MCP-1 Erhöhung zeitlich versetzt zu einer Regulation von KC kommt (64). Da MCP-1 selbst nur geringfügig chemotaktisch für PMN wirkt, kommt es durch MCP-1 getriggert zu einem Anstieg von KC und damit verbunden zur Chemotaxis für PMN. Durch eine Blockade von KC mittels Antikörper nach hämorrhagischem Schock konnten Lomas-Neira et al. einen reduzierten PMN-Influx in die Lunge nachweisen, was konsekutiv zu einer Abmilderung des Lungenschadens führte (110). Auch die Expression von Oberflächenrezeptoren der PMN kann durch KC beeinflusst werden. Frevert et al. beobachteten durch KC ausgelöst eine vermehrte Expression von CD11b/ CD18 auf PMN und eine höhere Generierung von O₂ Radikalen durch PMN nach LPS induzierter pulmonaler Inflammation bei der Ratte (63).

In unseren Untersuchungen zeigten sich 3 h nach Thoraxtrauma bei den Traumatizierten ohne Depletion signifikante Konzentrationsanstiege von MIP-2 und KC lokal in der BAL und der Lunge. In der BAL persistierte die Erhöhung von MIP-2 auch 30 h nach Trauma, wohingegen in der Lunge zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied mehr festzustellen war. Die Bestimmungen von KC in der BAL zeigten 30 h nach Thoraxtrauma auch gegenüber dem Beobachtungszeitpunkt nach 3 h einen weiteren deutlichen Konzentrationsanstieg, während in der Lunge zu diesem Zeitpunkt bereits ein Abfall zu beobachten war. Somit ist das Thoraxtrauma nachweislich mit einer lokalen Chemokinerhöhung assoziiert. Dieser Verlauf wird von Daten aus der Literatur untermauert. Perl et al. fanden 2 und 24 h nach Thoraxtrauma bei der Maus MIP-2 Erhöhungen in der BAL. In der Lunge wurde ebenso ein Anstieg von MIP-2 und KC 2 h nach Thoraxtrauma nachgewiesen (150,151). Die KC

Erhöhung bestand auch 12 h nach Trauma mit nachfolgendem Abfall nach 24 h. Bisherige Studien belegen eine lokale Chemokinerhöhung während Inflammationsreaktionen: Huang et al. stellten einen Anstieg der mRNA von KC und MIP-2 aus Zellen der BAL von Ratten bereits 30 Min nach intratrachealer Applikation von LPS dar (91). Lomas-Neira et al. wiesen in der Lunge erhöhte Konzentrationen an MIP-2 und KC verbunden mit einem gesteigerten PMN-Influx in das Lungengewebe nach hämorrhagischem Schock und Sepsis bei der Maus nach (108,110). Eine vermehrte Synthese und Freisetzung von IL-8 durch Alveolarmakrophagen mit dadurch verbundenem PMN-Influx in die Lunge findet schon 30 Min nach Polytrauma beim Menschen statt (51). Hierbei korreliert die frühe IL-8 Erhöhung in der BAL mit einer nachfolgenden Entwicklung eines ARDS und einer schlechten Prognose (11,51).

Die resultierenden Ergebnisse verdeutlichen somit, dass es auch nach Thoraxtrauma mit isolierter Lungenkontusion zu einer lokalen Mediatorfreisetzung mit Aktivierung und vermehrter Rekrutierung der PMN zum Inflammationsherd kommt.

Systemisch wurde im Plasma bereits 3 h nach Thoraxtrauma bei den Traumatieren ohne Depletion ein Anstieg von KC gemessen mit anschließendem Abfall der Konzentration 30 h nach Thoraxtrauma. Bisher beschrieben sind ähnliche Verläufe nach hämorrhagischem Schock und Sepsis. In einem Mausmodell wurden nach 12 h Erhöhungen von KC im Plasma beobachtet. Nach 24 h kam es auch hier zu einem Konzentrationsabfall, jedoch blieb die Konzentration signifikant höher im Vergleich zu den Kontrolltieren (149). Frink et al. wiesen 4 h nach traumatisch-hämorrhagischem Schock bei Mäusen erhöhte Plasma- und Lungengewebskonzentrationen von KC nach (64). Die Korrelation des systemischen mit dem lokalen Anstieg in der Lunge und der BAL (wie auch bei IL-6) macht eine durch Schädigung des Lungenparenchyms vermehrte Freisetzung dieser Mediatoren in die Zirkulation wahrscheinlich.

Traumatiere mit Depletion wiesen in unseren Versuchen 3 h nach Thoraxtrauma signifikant höhere Werte von MIP-2 in der BAL und der Lunge im Vergleich zu den Traumatieren ohne Depletion auf. Für KC wurden durch die PMN-Depletion in der BAL 3 h und in der Lunge 30 h nach Thoraxtrauma signifikant höhere Konzentrationen bestimmt als bei den Traumatieren ohne Depletion. Im Plasma besaßen sowohl die Kontrolltiere als auch die Traumatiere mit Depletion zu beiden Beobachtungszeitpunkten nach Thoraxtrauma jeweils höhere Konzentrationen an KC gegenüber den entsprechenden Tieren ohne Depletion. Dass bereits bei den Kontrolltieren mit Depletion erhöhte

Plasmaspiegel an KC beobachtet wurden, machen hemmende Einflüsse der PMN auf KC produzierende Zellen wahrscheinlich.

Die PMN-Depletionsdaten belegen somit eine bedeutende Stellung der PMN nach Thoraxtrauma. Wie bereits bei IL-6 dargestellt, scheinen PMN nach erfolgtem Thoraxtrauma an der Regulation der Antiinflammation beteiligt zu sein, indem sie die Freisetzung proinflammatorischer Chemokine reduzieren und somit eine weitere Rekrutierung von PMN an den Ort der Entzündung begrenzen.

Im Gegensatz zu den aufgezeigten Veränderungen nach Thoraxtrauma fanden Lomas-Neira et al. 24 h nach PMN-Depletion und hämorrhagischem Schock mit nachfolgender Sepsis bei Mäusen in der Lunge niedrigere Konzentrationen an MIP-2 und KC als bei den Kontrolltieren mit PMN (109). Diese Konzentrationserniedrigung ist möglicherweise dadurch bedingt, dass es sich bei einem hämorrhagischen Schock mit nachfolgender Sepsis zunächst um ein extrapulmonales Geschehen handelt und die vornehmliche Quelle der Chemokine, die Alveolarmakrophagen, hier nicht direkt stimuliert werden. Eine Lungenkontusion hingegen verursacht eine direkte und lokalisierte Gewebsschädigung mit rascher Aktivierung der Alveolarmakrophagen und auch weiterer Rekrutierung von Monozyten, was zu einer erhöhten Ausschüttung von Chemokinen führt (147,175). Somit kann es bei Lungenkontusion durch direkte Stimulation möglicherweise früher und verstärkt zu einer Aktivierung der Chemokinproduktion durch Alveolarmakrophagen kommen.

MCP-1 wird von mononukleären Zellen wie z.B. Alveolarmakrophagen gebildet und besitzt vor allem für Monozyten und Makrophagen chemotaktische Eigenschaften (18,20,102). Seitz et al. beschrieben eine Freisetzung von MCP-1 aus Alveolarmakrophagen in der BAL von Ratten nach Thoraxtrauma, was wiederum die Migration von Monozyten beeinflusste (173). Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass PMN zur Freisetzung von MCP-1 im Rahmen einer Inflammation, z.B. nach Stimulation durch Monozyten oder nach Gabe von GM-CSF, befähigt sind (212,214). Einen Einfluss auf PMN kann MCP-1, wie bereits oben beschrieben, indirekt über die Regulation von KC ausüben (64).

In unseren Versuchen stellte sich für MCP-1 in der BAL eine übereinstimmende Freisetzungskinetik dar wie bei KC. Drei und 30 h nach Applikation des Thoraxtraumas wurden bei den Traumatieren ohne Depletion signifikant höhere Konzentrationen von MCP-1 gemessen als bei den Kontrolltieren ohne Depletion, wobei das Maximum nach

30 h erreicht wurde. Ebenso wurde im Lungengewebe bei den Traumatieren ohne Depletion ein Konzentrationsanstieg 3 h nach Thoraxtrauma aufgezeigt, welcher auch nach 30 h persistierte. Das Thoraxtrauma hat auch hier einen lokalen Konzentrationsanstieg zur Folge.

Perl et al. fanden ebenfalls 2 h und 24 h nach Thoraxtrauma bei der Maus MCP-1 Erhöhungen in der BAL und der Lunge, wobei hier der Gipfel nach 24 h erreicht wurde (150,151). Lokal und auch systemisch erhöhte Konzentrationen an MCP-1 konnten auch bei Inflammationsreaktionen anderer Organe, z.B. bei akuter Pankreatitis bei Menschen nachgewiesen werden (157).

Bei den Traumatieren mit Depletion konnten in unseren Versuchen in der BAL 3 und 30 h nach Thoraxtrauma signifikant höhere Werte an MCP-1 als bei den Traumatieren ohne Depletion aufgezeigt werden. In der Lunge wurde dieser Unterschied zusätzlich bei den Kontrolltieren mit und ohne Depletion evident. Wie bei den bereits beschriebenen Zyto- und Chemokinen belegen die Depletionsdaten eindrucksvoll den hemmenden Einfluss der PMN auf die Freisetzung proinflammatorischer Chemokine vor und nach Thoraxtrauma mit Lungenkontusion.

IL-10 stellt ein wichtiges antiinflammatorisch wirkendes Zytokin während einer Inflammationsreaktion dar (88,169). Verschiedenste Zellen, wie z.B. TH₂-Zellen, B-Zellen, periphere Monozyten, Makrophagen, eosinophile Granulozyten und Keratinozyten, sind in der Lage, IL-10 zu produzieren. In der immunregulatorischen Antwort nach Inflammation geschieht dies jedoch zu einem späteren Zeitpunkt als die Freisetzung der klassisch proinflammatorischen Zytokine, wie z.B. IL-6 (6,101,130,185).

Unsere Resultate konnten hinsichtlich der IL-10 Konzentration in der Lunge keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nach Thoraxtrauma aufzeigen. Auch in der BAL bestand bei den Tieren mit und ohne Depletion keine Änderung im zeitlichen Verlauf nach Thoraxtrauma. Möglicherweise wurde eine Dynamik von den gewählten Beobachtungszeitpunkten nicht erfasst.

30 h nach Thoraxtrauma konnte jedoch bei den Traumatieren mit Depletion ein signifikanter IL-10 Konzentrationsanstieg in der BAL im Vergleich zu den Kontroll- und den Traumatieren mit Depletion nach 3 h beobachtet werden. Verschiedene Studien der indirekten Lungenschädigung belegen eine Beeinflussung der IL-10 Freisetzung zu einem späteren Zeitpunkt in der Entzündungsantwort. 48 h nach hämorrhagischem Schock bei Mäusen wird nach vorheriger PMN-Depletion über einen Anstieg von IL-10 im

Lungengewebe berichtet (108). Marcinkiewicz et al. beschrieben Taurinchloramin und Taurinbromamin als Mediatoren von PMN, welche konzentrationsabhängig die IL-10 Freisetzung aus Makrophagen hemmen können (115). Dadurch fehlen aufgrund der PMN-Depletion die hemmenden Einflüsse auf die Alveolarmakrophagen, wodurch diese möglicherweise in der Lage sind, mehr IL-10 freizusetzen.

Normalerweise fördert eine MIP-2-Freisetzung durch aktivierte Alveolarmakrophagen die Transmigration von PMN durch das Endothel der Lunge während eine Inflammationsreaktion mit nachfolgend gesteigerter IL-10 Produktion zur Limitierung der Entzündungsreaktion beiträgt (141,158). Über eine Kaskade von Mediatoren und zellulärer Interaktionen wird so eine effiziente inflammatorische Antwort auf eingedrungene Pathogene und Elimination aktivierter PMN generiert (65). Jedoch kann eine Störung der zellulären Interaktionen, wie z.B. die Depletion der PMN, diese Kaskade beeinflussen. IL-10 wiederum verhindert die weitere Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α durch Makrophagen und limitiert so die Entzündungsantwort auf das Trauma (65).

4.5 Organschädigung der Lunge

Die Lungenkontusion ist eine häufige Folge des Thoraxtraumas verbunden mit einer hohen Sterblichkeit. Die Messung der Proteinkonzentration in der BAL lässt das Ausmaß des Lungenschadens über eine Dysfunktion der alveolokapillären Barriere abschätzen.

In unseren Versuchen zeigte sich 3 h nach Thoraxtrauma bei den Traumatieren ohne Depletion eine signifikante Erhöhung der Proteinkonzentration in der BAL mit weiterem Anstieg 30 h nach Thoraxtrauma im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Depletion.

Da die Dysfunktion der alveolokapillären Barriere bereits früh sichtbar wird, dürften hierbei eher direkte mechanische Kräfte während des Traumas verantwortlich sein als eine indirekte Beeinflussung durch die Inflammationsreaktion. Für die weitere Erhöhung nach 30 h sind jedoch zusätzliche Mechanismen wahrscheinlich, um die Schrankenstörung aufrecht zu erhalten.

Durch die PMN-Depletion wurde interessanterweise zum späten Zeitpunkt nach Thoraxtrauma eine signifikant reduzierte alveolokapilläre Permeabilität gegenüber den Traumatieren ohne Depletion nach 30 h festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass 30 h nach Thoraxtrauma aktivierte PMN an der Aufrechterhaltung der Schrankenstörung beteiligt sind und dass durch deren Depletion eine Abmilderung des Lungenschadens erreicht werden kann (109).

Histologische Alterationen der Lunge nach Thoraxtrauma sind mannigfaltig. Es kann dabei u.a. eine Akkumulation aktivierter PMN in der Lunge nachgewiesen werden (153,205). Zudem finden sich dys- bis atelektatische Lungenbereiche mit Verbreiterung der Alveolarsepten und einer Destruktion der Alveolararchitektur (40,86). Ebenso werden Endothelschwellung, perivaskuläre und interstitielle Ödeme, Fettembolien sowie alveoläre und intrabronchiale Einblutungen beobachtet (163).

In den Auswertungen der HE-Färbungen der Lunge konnten bei den traumatisierten Traumatieren ohne Depletion die oben erwähnten histologischen Veränderungen nachgewiesen werden. Bei den Traumatieren mit Depletion wurde jedoch 3 und 30 h nach Thoraxtrauma eine verminderte Invasion der PMN in das Lungengewebe beobachtet mit einem reduzierten Ausmaß der beschriebenen histologischen Veränderungen. Die Abwesenheit der PMN nach ausgelöstem Thoraxtrauma führt daher zu einer Abmilderung des entstehenden Lungenschadens vor allem zu einem späteren Zeitpunkt nach Thoraxtrauma.

4.6 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend veranschaulichen die gewonnenen Ergebnisse nach Thoraxtrauma die Bedeutung einer frühen Aktivierung der PMN mit Auswanderung in die Lunge bei gleichzeitig reduzierter Apoptose. Begleitet wird dieser Vorgang von einem lokalen und systemischen Konzentrationsanstieg verschiedener Zyto- und Chemokine.

Eine PMN-Depletion vor dem Thoraxtrauma hat eine übermäßige Zyto- und Chemokinantwort zur Folge mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die lokale und systemische Inflammation. Das Ausmaß des Lungenschadens wird vor allem zu einem späteren Zeitpunkt nach Thoraxtrauma durch die präexpositionelle PMN-Depletion abgemildert.

Die Behandlung der PMN-Transmigration in die Lunge könnte somit einen therapeutischen Angriffspunkt bieten in der durch Thoraxtrauma ausgelösten Lungenkontusion mit nachfolgender akuter Lungenschädigung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Etwa 20.000 Menschen versterben jährlich in Deutschland an den Folgen eines Unfalls. Die Verletzungen des Thoraxes und der Lunge sind dabei häufig Ausschlag gebend für das Auftreten von Pneumonien, Lungenversagen (ALI) und systemisch entzündlichen Veränderungen bis hin zum Multiorganversagen (MOF). Polymorphkernigen Granulozyten (PMN) kommt hierbei eine Schlüsselrolle zu. Wird ihnen primär eine gewebeschädigende Rolle in der Pathogenese der ALI zugeschrieben, gibt es jedoch auch Hinweise darauf, dass PMN unter bestimmten Bedingungen zu einer Abmilderung der ALI führen. In dieser Hinsicht wurde das Aktivierungsverhalten der PMN nach einem stumpfen Thoraxtrauma mit isolierter Lungenkontusion an männlichen C3H/HeN Mäusen untersucht. Durch PMN-Depletion nach intravenöser Gabe des Antikörpers Gr-1 (25µg/ g Körpergewicht) 48 Stunden (h) vor Thoraxtrauma wurden die Auswirkungen auf die lokale und systemische Inflamationsreaktion und den entstehenden Lungenschaden analysiert.

Eine vermehrte Sequestration der PMN in die Lunge war anhand der höheren Myeloperoxidase-Aktivität (MPO) früh nach Thoraxtrauma sowie der erhöhten PMN-Anzahl in der bronchoalveolären Lavage (BAL) nachweisbar. Nach Thoraxtrauma mit pulmonaler Kontusion kam es zudem zu einer Aktivierung der PMN mit zeitabhängiger Expression der Oberflächenrezeptoren CD62L, CD11b und CD31. Die reduzierte Apoptoserate der PMN mit vermehrter Phosphatidylserin- und aktiver Caspase-3-Expression wies auf eine anhaltende Aktivierung der PMN im Rahmen der posttraumatischen Inflamationsreaktion mit verlängerter Überlebenszeit hin.

Die lokale Inflamationsreaktion nach Thoraxtrauma wurde begleitet von einem frühzeitigen Konzentrationsanstieg der proinflammatorischen Zyto- und Chemokine Interleukin (IL)-6, macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2), cytokine-induced neutrophil chemoattractant (KC) und monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in der Lunge. Ebenso wurde dieser Anstieg in der BAL beobachtet, wobei hier auch nach 30 h bei MIP-2, KC und MCP-1 erhöhte Konzentrationen persistierten. Als Zeichen einer systemischen Mitbeteiligung fanden sich im Plasma frühzeitig Konzentrationserhöhungen von IL-6 und KC.

Die gewonnenen Daten aus der PMN-Depletion demonstrieren, dass in Abwesenheit der PMN teilweise höhere lokale Chemokin-Konzentrationen in der Lunge und BAL zu verschiedenen Zeitpunkten vorlagen. IL-6 blieb davon unbeeinflusst. Auch im Plasma wurden diese Auswirkungen bei IL-6 und KC beobachtet.

Durch die PMN-Depletion resultierte nach Thoraxtrauma eine niedrigere PMN-Anzahl im Blut, der BAL und im Lungengewebe sowie eine erniedrigte MPO-Aktivität in der Lunge früh nach Thoraxtrauma. Somit führte eine präexpositionelle PMN-Antikörper-Behandlung auch zu einer posttraumatisch reduzierten Rekrutierung von PMN in das Lungengewebe. Die daraus sich ergebende Abmilderung des Lungenschadens spiegelte sich im erniedrigten Proteingehalt in der BAL nach Thoraxtrauma wider.

Diese Ergebnisse untermauern, dass PMN auch antiinflammatorische Eigenschaften nach Thoraxtrauma zugeschrieben werden müssen. PMN stehen in hochkomplexen Interaktionen mit anderen Zellen und regulieren so entscheidend die Entzündungsantwort nach Thoraxtrauma. Eine Modulation der PMN-Aktivierung und Emigration in die Lunge könnte möglicherweise einen therapeutischen Ansatz in der Behandlung der akuten Lungenschädigung nach Thoraxtrauma bieten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ajuebor MN, Das AM, Virag L, Flower RJ, Szabo C, Perretti M: Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *J Immunol* 162: 1685-1691 (1999)
2. Akgul C, Edwards SW: Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. *Cell Mol Life Sci* 60: 2402-2408 (2003)
3. Amano H, Yamamoto H, Senba M, Oishi K, Suzuki S, Fukushima K, Mukaida N, Matsushima K, Eguchi K, Nagatake T: Impairment of endotoxin-induced macrophage inflammatory protein 2 gene expression in alveolar macrophages in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Infect Immun* 68: 2925-2929 (2000)
4. Arias E, Anderson RN, Kung HC, Murphy SL, Kochanek KD: Deaths: final data for 2001. *Natl Vital Stat Rep* 52: 1-115 (2003)
5. Ayala A, Chung CS, Lomas JL, Song GY, Doughty LA, Gregory SH, Cioffi WG, LeBlanc BW, Reichner J, Simms HH, Grutkoski PS: Shock-induced neutrophil mediated priming for acute lung injury in mice: divergent effects of TLR-4 and TLR-4/FasL deficiency. *Am J Pathol* 161: 2283-2294 (2002)
6. Ayala A, Ertel W, Chaudry IH: Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. *Shock* 5: 79-90 (1996)
7. Bacon KB, Oppenheim JJ: Chemokines in disease models and pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 9: 167-173 (1998)
8. Bankey PE, Williams JG, Guice KS, Taylor SN: Interleukin-6 production after thermal injury: evidence for nonmacrophage sources in the lung and liver. *Surgery* 118: 431-438 (1995)
9. Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D: Epidemiologie des Schwerverletzten. Eine prospektive Erfassung der präklinischen und klinischen Versorgung. *Unfallchirurg* 103: 355-363 (2000)
10. Barlow Y: T lymphocytes and immunosuppression in the burned patient: a review. *Burns* 20: 487-490 (1994)
11. Boughman RP, Gunther KL, Rashkin MC, Keeton DA, Pattishall EN: Changes in the inflammatory response of the lung during acute respiratory distress syndrome: prognostic indicators. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 76-81 (1996)

12. Beeton CA, Chatfield D, Brooks RA, Rushton N: Circulating levels of interleukin-6 and its soluble receptor in patients with head injury and fracture. *J Bone Joint Surg Br* 86: 912-917 (2004)
13. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R: The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 818-824 (1994)
14. Bersten AD, Edibam C, Hunt T, Moran J: Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 443-448 (2002)
15. Bhatia RK, Pallister I, Dent C, Jones SA, Topley N: Enhanced neutrophil migratory activity following major blunt trauma. *Injury* 36: 956-962 (2005)
16. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CC, Jr., Carl VS, Peterson VN: Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis. *Arch Surg* 131: 24-29 (1996)
17. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM: Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg* 224: 647-664 (1996)
18. Bless NM, Huber-Lang M, Guo RF, Warner RL, Schmal H, Czermak BJ, Shanley TP, Crouch LD, Lentsch AB, Sarma V, Mulligan MS, Friedl HP, Ward PA: Role of CC chemokines (macrophage inflammatory protein-1 beta, monocyte chemoattractant protein-1, RANTES) in acute lung injury in rats. *J Immunol* 164: 2650-2659 (2000)
19. Borregaard N, Cowland JB: Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89: 3503-3521 (1997)
20. Brieland JK, Jones ML, Clarke SJ, Baker JB, Warren JS, Fantone JC: Effect of acute inflammatory lung injury on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in rat pulmonary alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7: 134-139 (1992)
21. Bruehl RE, Springer TA, Bainton DF: Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 44: 835-844 (1996)
22. Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, Bion J, Romand JA, Villar J, Thorsteinsson A, Damas P, Armaganidis A, Lemaire F: Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med* 30: 51-61 (2004)
23. Burns AR, Smith CW, Walker DC: Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol Rev* 83: 309-336 (2003)

24. Butcher EC: Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67: 1033-1036 (1991)
25. Carlos TM, Harlan JM: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101 (1994)
26. Chello M, Mastroberto P, Quirino A, Cuda G, Perticone F, Cirillo F, Covino E: Inhibition of neutrophil apoptosis after coronary bypass operation with cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 73: 123-129 (2002)
27. Christofidou-Solomidou M, Nakada MT, Williams J, Muller WA, DeLisser HM: Neutrophil platelet endothelial cell adhesion molecule-1 participates in neutrophil recruitment at inflammatory sites and is down-regulated after leukocyte extravasation. *J Immunol* 158: 4872-4878 (1997)
28. Cocks RA, Chan TY: Alteration in leukocyte adhesion molecule expression following minor, moderate and major trauma. *Eur J Emerg Med* 4: 193-195 (1997)
29. Cohen JW, Krauss NA: Spending and service use among people with the fifteen most costly medical conditions, 1997. *Health Aff (Millwood)* 22: 129-138 (2003)
30. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A: Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80: 2012-2020 (1992)
31. Conlan JW, North RJ: Neutrophils are essential for early anti-Listeria defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J Exp Med* 179: 259-268 (1994)
32. Cox G, Crossley J, Xing Z: Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 232-237 (1995)
33. Crestani B, Cornillet P, Dehoux M, Rolland C, Guenounou M, Aubier M: Alveolar type II epithelial cells produce interleukin-6 in vitro and in vivo. Regulation by alveolar macrophage secretory products. *J Clin Invest* 94: 731-740 (1994)
34. Crockett-Torabi E: Selectins and mechanisms of signal transduction. *J Leukoc Biol* 63: 1-14 (1998)
35. Crockett-Torabi E, Fantone JC: The selectins: insights into selectin-induced intracellular signaling in leukocytes. *Immunol Res* 14: 237-251 (1995)
36. Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, Van Damme J, Shenkin A: Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin Sci (Lond)* 79: 161-165 (1990)

37. Czermak BJ, Sarma V, Bless NM, Schmal H, Friedl HP, Ward PA: In vitro and in vivo dependency of chemokine generation on C5a and TNF-alpha. *J Immunol* 162: 2321-2325 (1999)
38. Daley JM, Reichner JS, Mahoney EJ, Manfield L, Henry WL, Jr., Mastrofrancesco B, Albina JE: Modulation of macrophage phenotype by soluble product(s) released from neutrophils. *J Immunol* 174: 2265-2272 (2005)
39. Danial NN, Korsmeyer SJ: Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205-219 (2004)
40. Davis KA, Fabian TC, Croce MA, Proctor KG: Prostanoids: early mediators in the secondary injury that develops after unilateral pulmonary contusion. *J Trauma* 46: 824-831 (1999)
41. de Vries JE, Punnonen J, Cocks BG, de Waal MR, Aversa G: Regulation of the human IgE response by IL4 and IL13. *Res Immunol* 144: 597-601 (1993)
42. DeLong WG, Jr., Born CT: Cytokines in patients with polytrauma. *Clin Orthop Relat Res*: 57-65 (2004)
43. Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie AP: Jahresbericht des Traumaregisters 2010. www.traumaregister.de/images/stories/downloads/jahresbericht_2010.pdf (2010)
44. Dinarello CA: Proinflammatory cytokines. *Chest* 118: 503-508 (2000)
45. DiPiro JT, Howdieshell TR, Goddard JK, Callaway DB, Hamilton RG, Mansberger AR, Jr.: Association of interleukin-4 plasma levels with traumatic injury and clinical course. *Arch Surg* 130: 1159-1162 (1995)
46. Doerschuk CM: The role of CD18-mediated adhesion in neutrophil sequestration induced by infusion of activated plasma in rabbits. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7: 140-148 (1992)
47. Doerschuk CM: Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. *Microcirculation* 8: 71-88 (2001)
48. Doerschuk CM, Beyers N, Coxson HO, Wiggs B, Hogg JC: Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung. *J Appl Physiol* 74: 3040-3045 (1993)
49. Doerschuk CM, Downey GP, Doherty DE, English D, Gie RP, Ohgami M, Worthen GS, Henson PM, Hogg JC: Leukocyte and platelet margination within microvasculature of rabbit lungs. *J Appl Physiol* 68: 1956-1961 (1990)

50. Doerschuk CM, Quinlan WM, Doyle NA, Bullard DC, Vestweber D, Jones ML, Takei F, Ward PA, Beaudet AL: The role of P-selectin and ICAM-1 in acute lung injury as determined using blocking antibodies and mutant mice. *J Immunol* 157: 4609-4614 (1996)
51. Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson CR, Carter DC, Grant IS, Pollok AJ, Haslett C: Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet* 341: 643-647 (1993)
52. Doyle NA, Bhagwan SD, Meek BB, Kutkoski GJ, Steeber DA, Tedder TF, Doerschuk CM: Neutrophil margination, sequestration, and emigration in the lungs of L-selectin-deficient mice. *J Clin Invest* 99: 526-533 (1997)
53. Dransfield I, Stocks SC, Haslett C: Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood* 85: 3264-3273 (1995)
54. Edward SW: Biochemistry and physiology of the neutrophil. *Cambridge University Press* 4-4 (1994)
55. Elbim C, Estaquier J: Cytokines modulate neutrophil death. *Eur Cytokine Netw* 21: 1-6 (2010)
56. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50 (1998)
57. Endo S, Inada K, Yamada Y, Takakuwa T, Kasai T, Nakae H, Yoshida M, Ceska M: Plasma endotoxin and cytokine concentrations in patients with hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 22: 949-955 (1994)
58. Fadok VA, Bratton DL, Henson PM: Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 108: 957-962 (2001)
59. Farooq U, Raza W, Zia N, Hanif M, Khan MM: Classification and management of chest trauma. *J Coll Physicians Surg Pak* 16: 101-103 (2006)
60. Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM: Ultrastructural localization of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1, CD31) in vascular endothelium. *J Histochem Cytochem* 52: 87-101 (2004)
61. Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR: Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* 151: 2399-2408 (1993)

62. Frevert CW, Farone A, Danaee H, Paulauskis JD, Kobzik L: Functional characterization of rat chemokine macrophage inflammatory protein-2. *Inflammation* 19: 133-142 (1995)
63. Frevert CW, Huang S, Danaee H, Paulauskis JD, Kobzik L: Functional characterization of the rat chemokine KC and its importance in neutrophil recruitment in a rat model of pulmonary inflammation. *J Immunol* 154: 335-344 (1995)
64. Frink M, Lu A, Thobe BM, Hsieh YC, Choudhry MA, Schwacha MG, Kunkel SL, Chaudry IH: Monocyte chemoattractant protein-1 influences trauma-hemorrhage-induced distal organ damage via regulation of keratinocyte-derived chemokine production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1110-R1116 (2007)
65. Fujiwara N, Kobayashi K: Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4: 281-286 (2005)
66. Gaillard M, Herve C, Mandin L, Raynaud P: Mortality prognostic factors in chest injury. *J Trauma* 30: 93-96 (1990)
67. Galbraith P.R., Valberg L.S., Brown M.: Patterns of granulocyte kinetics in health, infection and in carcinoma. *Blood* 25: 683-692 (1965)
68. Galinanes M, Watson C, Trivedi U, Chambers DJ, Young CP, Venn GE: Differential patterns of neutrophil adhesion molecules during cardiopulmonary bypass in humans. *Circulation* 94: II364-II369 (1996)
69. Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC: A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304: 30-34 (1983)
70. Gao X, Xu N, Sekosan M, Mehta D, Ma SY, Rahman A, Malik AB: Differential role of CD18 integrins in mediating lung neutrophil sequestration and increased microvascular permeability induced by *Escherichia coli* in mice. *J Immunol* 167: 2895-2901 (2001)
71. Garcia-Ramallo E, Marques T, Prats N, Beleta J, Kunkel SL, Godessart N: Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *J Immunol* 169: 6467-6473 (2002)
72. Gebhard F, Kelbel MW, Strecker W, Kinzl L, Brückner UB: Chest trauma and its impact on the release of vasoactive mediators. *Shock* 7: 313-317 (1997)
73. Gerritsen ME, Bloor CM: Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J* 7: 523-532 (1993)
74. Gopalan PK, Smith CW, Lu H, Berg EL, McIntire LV, Simon SI: Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. *J Immunol* 158: 367-375 (1997)

75. Granger DN, Kubes P: The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 55: 662-675 (1994)
76. Griffin JD, Spertini O, Ernst TJ, Belvin MP, Levine HB, Kanakura Y, Tedder TF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J Immunol* 145: 576-584 (1990)
77. Grommes J, Soehnlein O: Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med* 17: 293-307 (2011)
78. Gumina RJ, el Schultz J, Yao Z, Kenny D, Warltier DC, Newman PJ, Gross GJ: Antibody to platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 reduces myocardial infarct size in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 94: 3327-3333 (1996)
79. Haelens A, Wuyts A, Proost P, Struyf S, Opdenakker G, van Damme J: Leukocyte migration and activation by murine chemokines. *Immunobiology* 195: 499-521 (1996)
80. Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Prorock AJ, Huo Y, Ley K: L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J Exp Med* 193: 863-872 (2001)
81. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC: Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92: 3007-3017 (1998)
82. Hashimoto M, Shingu M, Ezaki I, Nobunaga M, Minamihara M, Kato K, Sumioki H: Production of soluble ICAM-1 from human endothelial cells induced by IL-1 beta and TNF-alpha. *Inflammation* 18: 163-173 (1994)
83. Haslett C: Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 160: S5-11 (1999)
84. Haslett C, Lee A, Savill JS, Meagher L, Whyte MK: Apoptosis (programmed cell death) and functional changes in aging neutrophils. Modulation by inflammatory mediators. *Chest* 99: 6S-6S (1991)
85. Heinrich PC, Castell JV, Andus T: Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265: 621-636 (1990)
86. Hellinger A, Konerding MA, Malkusch W, Obertacke U, Redl H, Bruch J, Schlag G: Does lung contusion affect both the traumatized and the noninjured lung parenchyma? A morphological and morphometric study in the pig. *J Trauma* 39: 712-719 (1995)
87. Hoff SJ, Shotts SD, Eddy VA, Morris JA, Jr.: Outcome of isolated pulmonary contusion in blunt trauma patients. *Am Surg* 60: 138-142 (1994)

88. Holzheimer RG, Gross J, Schein M: Pro- and anti-inflammatory cytokine-response in abdominal aortic aneurysm repair: a clinical model of ischemia-reperfusion. *Shock* 11: 305-310 (1999)
89. Hoth JJ, Stitzel JD, Gayzik FS, Brownlee NA, Miller PR, Yoza BK, McCall CE, Meredith JW, Payne RM: The pathogenesis of pulmonary contusion: an open chest model in the rat. *J Trauma* 61: 32-44 (2006)
90. Hu Z, Sayeed MM: Suppression of mitochondria-dependent neutrophil apoptosis with thermal injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C170-C178 (2004)
91. Huang S, Paulauskis JD, Godleski JJ, Kobzik L: Expression of macrophage inflammatory protein-2 and KC mRNA in pulmonary inflammation. *Am J Pathol* 141: 981-988 (1992)
92. Inthorn D, Huf R: Thoracic trauma in multiple trauma. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 27: 498-501 (1992)
93. Jimenez MF, Watson RW, Parodo J, Evans D, Foster D, Steinberg M, Rotstein OD, Marshall JC: Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. *Arch Surg* 132: 1263-1269 (1997)
94. Johansson J, Sjogren F, Bodelsson M, Sjoberg F: Dynamics of leukocyte receptors after severe burns: an exploratory study. *Burns* 37: 227-233 (2011)
95. Jutila MA: Leukocyte traffic to sites of inflammation. *APMIS* 100: 191-201 (1992)
96. Katahira J, Murakami K, Schmalstieg FC, Cox R, Hawkins H, Traber LD, Traber DL: Role of anti-L-selectin antibody in burn and smoke inhalation injury in sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L1043-L1050 (2002)
97. Knöferl MW, Liener UC, Perl M, Brückner UB, Kinzl L, Gebhard F: Blunt chest trauma induces delayed splenic immunosuppression. *Shock* 22: 51-56 (2004)
98. Knöferl MW, Liener UC, Seitz DH, Perl M, Brückner UB, 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)
99. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420 (1994)
100. Kubo H, Doyle NA, Graham L, Bhagwan SD, Quinlan WM, Doerschuk CM: L- and P-selectin and CD11/CD18 in intracapillary neutrophil sequestration in rabbit lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 267-274 (1999)

101. Lamkhioued B, Gounni AS, Aldebert D, Delaporte E, Prin L, Capron A, Capron M: Synthesis of type 1 (IFN gamma) and type 2 (IL-4, IL-5, and IL-10) cytokines by human eosinophils. *Ann N Y Acad Sci* 796: 203-208 (1996)
102. Leonard EJ, Yoshimura T: Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* 11: 97-101 (1990)
103. Liao F, Ali J, Greene T, Muller WA: Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Exp Med* 185: 1349-1357 (1997)
104. Liener UC, Huber-Lang M, Knöferl MW, Kurz M, Brückner UB, Kinzl L, Gebhard F: Does blunt chest trauma alter the function of alveolar macrophages? *Supplement to Shock* 18: 16 (2002)
105. Liener UC, Perl M, Huber-Lang MS, Seitz DH, Brückner UB, Gebhard F, Knöferl MW: Is the function of alveolar macrophages altered following blunt chest trauma? *Langenbecks Arch Surg* 396: 251-259 (2011)
106. Liu Y, Quinn MR: Chemokine production by rat alveolar macrophages is inhibited by taurine chloramine. *Immunol Lett* 80: 27-32 (2002)
107. LoCicero J, III, Mattox KL: Epidemiology of chest trauma. *Surg Clin North Am* 69: 15-19 (1989)
108. Lomas JL, Chung CS, Grutkoski PS, LeBlanc BW, Lavigne L, Reichner J, Gregory SH, Doughty LA, Cioffi WG, Ayala A: Differential effects of macrophage inflammatory chemokine-2 and keratinocyte-derived chemokine on hemorrhage-induced neutrophil priming for lung inflammation: assessment by adoptive cells transfer in mice. *Shock* 19: 358-365 (2003)
109. Lomas-Neira J, Chung CS, Perl M, Gregory S, Biffl W, Ayala A: Role of Alveolar Macrophage & Migrating Neutrophils in Hemorrhage Induced Priming for ALI Subsequent to Septic Challenge. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L51-L58 (2006)
110. Lomas-Neira JL, Chung CS, Grutkoski PS, Miller EJ, Ayala A: CXCR2 inhibition suppresses hemorrhage-induced priming for acute lung injury in mice. *J Leukoc Biol* 76: 58-64 (2004)
111. Lusinskas FW, Lawler J: Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J* 8: 929-938 (1994)
112. Maekawa K, Futami S, Nishida M, Terada T, Inagawa H, Suzuki S, Ono K: Effects of trauma and sepsis on soluble L-selectin and cell surface expression of L-selectin and CD11b. *J Trauma* 44: 460-468 (1998)

113. Marcinkiewicz J: Prostanoids and MPO-halide system products as a link between innate and adaptive immunity. *Immunol Lett* 89: 187-191 (2003)
114. Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Stelmaszynska T: Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 58: 667-674 (1995)
115. Marcinkiewicz J, Mak M, Bobek M, Biedron R, Bialecka A, Koprowski M, Kontny E, Maslinski W: Is there a role of taurine bromamine in inflammation? Interactive effects with nitrite and hydrogen peroxide. *Inflamm Res* 54: 42-49 (2005)
116. Marshall JC: Neutrophils in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care Med* 33: S502-S505 (2005)
117. Martin BA, Wright JL, Thommasen H, Hogg JC: Effect of pulmonary blood flow on the exchange between the circulating and marginating pool of polymorphonuclear leukocytes in dog lungs. *J Clin Invest* 69: 1277-1285 (1982)
118. Martin SJ, Green DR: Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82: 349-352 (1995)
119. Matuschak GM, Lechner AJ: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: pathophysiology and treatment. *Mo Med* 107: 252-258 (2010)
120. Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, Chi EY, Hudson LD, Martin TR: Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 1969-1977 (1997)
121. Mecklenburgh K, Murray J, Brazil T, Ward C, Rossi AG, Chilvers ER: Role of neutrophil apoptosis in the resolution of pulmonary inflammation. *Monaldi Arch Chest Dis* 54: 345-349 (1999)
122. Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R, Leeper K: Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest* 107: 1062-1073 (1995)
123. Meert KL, Ofenstein JP, Sarnaik AP: Altered T cell cytokine production following mechanical trauma. *Ann Clin Lab Sci* 28: 283-288 (1998)
124. Melton SM, Davis KA, Moomey CB, Jr., Fabian TC, Proctor KG: Mediator-dependent secondary injury after unilateral blunt thoracic trauma. *Shock* 11: 396-402 (1999)
125. Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Auer M, Hub E, Rot A: Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 91: 385-395 (1997)

126. Miller PR, Croce MA, Bee TK, Qaisi WG, Smith CP, Collins GL, Fabian TC: ARDS after pulmonary contusion: accurate measurement of contusion volume identifies high-risk patients. *J Trauma* 51: 223-228 (2001)
127. Mommsen P, Barkhausen T, Hildebrand F, Zeckey C, Krettek C, van GM: Regulation of L-selectin expression by trauma-relevant cytokines. *Pathol Res Pract* 207: 142-147 (2011)
128. Moore FA, Sauaia A, Moore EE, Haenel JB, Burch JM, Lezotte DC: Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J Trauma* 40: 501-510 (1996)
129. Moreland JG, Fuhrman RM, Pruessner JA, Schwartz DA: CD11b and intercellular adhesion molecule-1 are involved in pulmonary neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 474-480 (2002)
130. Mosmann TR, Moore KW: The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today* 12: A49-A53 (1991)
131. Muller WA: The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 57: 523-528 (1995)
132. Muller WA, Ratti CM, McDonnell SL, Cohn ZA: A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J Exp Med* 170: 399-414 (1989)
133. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM: PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 178: 449-460 (1993)
134. Nagata S: Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365 (1997)
135. Newman PJ: The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 100: S25-S29 (1997)
136. Nichols RT, Pearce HJ, Greenfield LJ: Effects of experimental pulmonary contusion on respiratory exchange and lung mechanics. *Arch Surg* 96: 723-730 (1968)
137. O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DH, Mannick JA, Rodrick ML: Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg* 222: 482-490 (1995)
138. Obertacke U., Redl H., Schlag G., Schmit-Neuerburg K.P.: Lokale und systemische Reaktionen nach Lungenkontusion, eine experimentelle und klinische Studie. *Hefte zu der Unfallchirurg* 240: 1-91 (1994)

139. Ogura H, Tanaka H, Koh T, Hashiguchi N, Kuwagata Y, Hosotsubo H, Shimazu T, Sugimoto H: Priming, second-hit priming, and apoptosis in leukocytes from trauma patients. *J Trauma* 46: 774-781 (1999)
140. Ohto H, Maeda H, Shibata Y, Chen RF, Ozaki Y, Higashihara M, Takeuchi A, Tohyama H: A novel leukocyte differentiation antigen: two monoclonal antibodies TM2 and TM3 define a 120-kd molecule present on neutrophils, monocytes, platelets, and activated lymphoblasts. *Blood* 66: 873-881 (1985)
141. Oltmanns U, Schmidt B, Hoernig S, Witt C, John M: Increased spontaneous interleukin-10 release from alveolar macrophages in active pulmonary sarcoidosis. *Exp Lung Res* 29: 315-328 (2003)
142. Pape HC, Auf'm Kolk M, Paffrath T, Regel G, Sturm JA, Tscherne H: Primary intramedullary femur fixation in multiple trauma patients with associated lung contusion--a cause of posttraumatic ARDS? *J Trauma* 34: 540-547 (1993)
143. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F, Park DR, Pugin J, Skerrett SJ, Hudson LD, Martin TR: Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1896-1903 (2001)
144. Parsey MV, Kaneko D, Shenkar R, Abraham E: Neutrophil apoptosis in the lung after hemorrhage or endotoxemia: apoptosis and migration are independent of IL-1beta. *Clin Immunol* 91: 219-225 (1999)
145. Parsey MV, Tuder RM, Abraham E: Neutrophils are major contributors to intraparenchymal lung IL-1 beta expression after hemorrhage and endotoxemia. *J Immunol* 160: 1007-1013 (1998)
146. Perl M, Chung CS, Ayala A: Apoptosis. *Crit Care Med* 33: S526-S529 (2005)
147. Perl M, Chung CS, Garber M, Huang X, Ayala A: Contribution of anti-inflammatory/immune suppressive processes to the pathology of sepsis. *Front Biosci* 11: 272-299 (2006)
148. Perl M, Chung CS, Lomas-Neira J, Rachel TM, Biffl WL, Cioffi WG, Ayala A: Silencing of Fas, but not caspase-8, in lung epithelial cells ameliorates pulmonary apoptosis, inflammation, and neutrophil influx after hemorrhagic shock and sepsis. *Am J Pathol* 167: 1545-1559 (2005)
149. Perl M, Chung CS, Perl U, Biffl WL, Cioffi WG, Ayala A: Beneficial versus detrimental effects of neutrophils are determined by the nature of the insult. *J Am Coll Surg* 204: 840-852 (2007)

150. Perl M, Gebhard F, Braumüller S, Tauchmann B, Brückner UB, Kinzl L, Knöferl MW: The pulmonary and hepatic immune microenvironment and its contribution to the early systemic inflammation following blunt chest trauma. *Crit Care Med* 34: 1152-1159 (2006)
151. Perl M, Gebhard F, Brückner UB, Ayala A, Braumüller S, Büttner C, Kinzl L, Knöferl MW: Pulmonary contusion causes impairment of macrophage and lymphocyte immune functions and increases mortality associated with a subsequent septic challenge. *Crit Care Med* 33: 1351-1358 (2005)
152. Perl M, Gebhard F, Knöferl MW, Bachem M, Gross HJ, Kinzl L, Strecker W: The pattern of preformed cytokines in tissues frequently affected by blunt trauma. *Shock* 19: 299-304 (2003)
153. Pittet JF, Mackersie RC, Martin TR, Matthay MA: Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 1187-1205 (1997)
154. Privratsky JR, Newman DK, Newman PJ: PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life Sci* 87: 69-82 (2010)
155. Pugin J, Ricou B, Steinberg KP, Suter PM, Martin TR: Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1850-1856 (1996)
156. 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)
157. Rau B, Baumgart K, Kruger CM, Schilling M, Beger HG: CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications. *Intensive Care Med* 29: 622-629 (2003)
158. Reddy RC, Chen GH, Newstead MW, Moore T, Zeng X, Tateda K, Standiford TJ: Alveolar macrophage deactivation in murine septic peritonitis: role of interleukin 10. *Infect Immun* 69: 1394-1401 (2001)
159. Roumen RM, Hendriks T, van d, V, Nieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW, van der Meer JW, Goris RJ: Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann Surg* 218: 769-776 (1993)
160. Roumen RM, Redl H, Schlag G, Zilow G, Sandtner W, Koller W, Hendriks T, Goris RJ: Inflammatory mediators in relation to the development of multiple organ failure in patients after severe blunt trauma. *Crit Care Med* 23: 474-480 (1995)

161. Sakahira H, Enari M, Nagata S: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99 (1998)
162. Savill JS, Henson PM, Haslett C: Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. *J Clin Invest* 84: 1518-1527 (1989)
163. Schlag G., Redl H., pretorius J.: Morphology of the lung as a consequence of direct and indirect trauma. *Pathophysiology of shock, sepsis, and organ failure, Springer, Berlin, Heidelberg*: 161-175 (1993)
164. Schlag G, Redl HR, Till GO, Davies J, Martin U, Dumont L: Anti-L-selectin antibody treatment of hemorrhagic-traumatic shock in baboons. *Crit Care Med* 27: 1900-1907 (1999)
165. Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF: Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol* 119: 229-238 (1992)
166. Schneider CP, Schwacha MG, Chaudry IH: The role of interleukin-10 in the regulation of the systemic inflammatory response following trauma-hemorrhage. *Biochim Biophys Acta* 1689: 22-32 (2004)
167. Schuller-Levis GB, Park E: Taurine and its chloramine: modulators of immunity. *Neurochem Res* 29: 117-126 (2004)
168. Schutte H, Lohmeyer J, Rosseau S, Ziegler S, Siebert C, Kielisch H, Pralle H, Grimminger F, Morr H, Seeger W: Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. *Eur Respir J* 9: 1858-1867 (1996)
169. Seekamp A, Jochum M, Ziegler M, van Griensven M, Martin M, Regel G: Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion. *J Trauma* 44: 874-882 (1998)
170. Seekamp A, Regel G, Rother K, Jutila M: The effect of anti-L-selectin (EL-246) on remote lung injury after infrarenal ischemia/reperfusion. *Shock* 7: 447-454 (1997)
171. Seekamp A, van Griensven M, Dhondt E, Diefenbeck M, Demeyer I, Vundelinckx G, Haas N, Schaechinger U, Wolowicka L, Rammelt S, Stroobants J, Marzi I, Brambrink AM, Dziurdzik P, Gasiorowski J, Redl H, Beckert M, Khan-Boluki J: The effect of anti-L-selectin (aselizumab) in multiple traumatized patients--results of a phase II clinical trial. *Crit Care Med* 32: 2021-2028 (2004)
172. Seekamp A, van Griensven M, Hildebrandt F, Brauer N, Jochum M, Martin M: The effect of trauma on neutrophil L-selectin expression and sL-selectin serum levels. *Shock* 15: 254-260 (2001)

173. Seitz DH, Niesler U, Palmer A, Sulger M, Braumüller ST, Perl M, Gebhard F, Knöferl MW: Blunt chest trauma induces mediator-dependent monocyte migration to the lung. *Crit Care Med* 38: 1852-1859 (2010)
174. Seitz DH, Palmer A, Niesler U, Froba JS, Heidemann V, Rittlinger A, Braumüller ST, Zhou S, Gebhard F, Knöferl MW: Alveolar macrophage phagocytosis is enhanced after blunt chest trauma and alters the posttraumatic mediator release. *Shock* 36: 621-627 (2011)
175. Seitz DH, Perl M, Mangold S, Neddermann A, Braumüller ST, Zhou S, Bachem MG, Huber-Lang MS, Knöferl MW: Pulmonary contusion induces alveolar type 2 epithelial cell apoptosis: role of alveolar macrophages and neutrophils. *Shock* 30: 537-544 (2008)
176. Shang D, Qi QH, Wang BZ, Chen HL, Bi W, Guan FL: Role of polymorphonuclear neutrophil apoptosis and expression of Fas and caspase-3 in the systemic inflammatory response syndrome. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 19: 11-13 (2007)
177. Sharma S, Mullins RJ, Trunkey DD: Ventilatory management of pulmonary contusion patients. *Am J Surg* 171: 529-532 (1996)
178. Shelley O, Murphy T, Paterson H, Mannick JA, Lederer JA: Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury. *Shock* 20: 123-129 (2003)
179. Shenkar R, Abraham E: Mechanisms of lung neutrophil activation after hemorrhage or endotoxemia: roles of reactive oxygen intermediates, NF-kappa B, and cyclic AMP response element binding protein. *J Immunol* 163: 954-962 (1999)
180. Shorr RM, Crittenden M, Indeck M, Hartunian SL, Rodriguez A: Blunt thoracic trauma. Analysis of 515 patients. *Ann Surg* 206: 200-205 (1987)
181. Simon HU: Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol Rev* 193: 101-110 (2003)
182. Simon SI, Burns AR, Taylor AD, Gopalan PK, Lynam EB, Sklar LA, Smith CW: L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) beta 2-integrin. *J Immunol* 155: 1502-1514 (1995)
183. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85 (1985)
184. Spertini O, Luscinskas FW, Kansas GS, Munro JM, Griffin JD, Gimbrone MA, Jr., Tedder TF: Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. *J Immunol* 147: 2565-2573 (1991)

185. Spits H, de Waal MR: Functional characterization of human IL-10. *Int Arch Allergy Immunol* 99: 8-15 (1992)
186. Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314 (1994)
187. Statistisches Bundesamt W: Sterbefälle 2009 durch Unfälle, nach Unfallkategorien, Altersgruppen und Geschlecht. *Todesursachen in Deutschland*, Fachserie 12, Reihe 4 (2010)
188. Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, Maunder RJ, Cockrill BA, Hudson LD: Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 113-122 (1994)
189. Stellin G: Survival in trauma victims with pulmonary contusion. *Am Surg* 57: 780-784 (1991)
190. Stockinger H, Gadd SJ, Eher R, Majdic O, Schreiber W, Kasinrek W, Strass B, Schnabl E, Knapp W: Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J Immunol* 145: 3889-3897 (1990)
191. Strecker W, Gebhard F, Rager J, Steinbach G, Ring C, Perl M, Kinzl L, Beck A: Interleukin-6 (IL-6) - an early marker of chest trauma. *Eur J Trauma* 28: 75-84 (2002)
192. Strohmaier W, Trupka A, Pfeiler C, Thurnher M, Khakpour Z, Gippner-Steppert C, Jochum M, Redl H: Bilateral lavage with diluted surfactant improves lung function after unilateral lung contusion in pigs. *Crit Care Med* 33: 2286-2293 (2005)
193. Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Dayer JM: High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis* 145: 1016-1022 (1992)
194. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T: Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 132: 345-352 (1983)
195. Taneja R, Parodo J, Jia SH, Kapus A, Rotstein OD, Marshall JC: Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. *Crit Care Med* 32: 1460-1469 (2004)
196. Taniguchi T, Koido Y, Aiboshi J, Yamashita T, Suzaki S, Kurokawa A: The ratio of interleukin-6 to interleukin-10 correlates with severity in patients with chest and abdominal trauma. *Am J Emerg Med* 17: 548-551 (1999)

197. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P: The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9: 866-873 (1995)
198. Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I, Gladue RP, Neote KS, McColl SR: Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *J Immunol* 159: 3595-3602 (1997)
199. Till GO, Johnson KJ, Kunkel R, Ward PA: Intravascular activation of complement and acute lung injury. Dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. *J Clin Invest* 69: 1126-1135 (1982)
200. Trupka A.: Konsequenzen der Früherkennung für die frühe Beatmungstherapie. *Nast Kolb D, Waydhas C, Schweiberer L (Hrsg), Hefte zu der Unfallchirurg, Posttraumatisches Multiorganversagen, Springer: Berlin, Heidelberg* 253: 11-16 (1996)
201. Visser T, Hietbrink F, Groeneveld KM, Koenderman L, Leenen LP: Isolated blunt chest injury leads to transient activation of circulating neutrophils. *Eur J Trauma Emerg Surg* 37: 177-184 (2011)
202. Wagner JG, Roth RA: Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev* 52: 349-374 (2000)
203. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ: Polymorphonuclear leukocyte activation. An early marker of the postsurgical sepsis response. *Arch Surg* 128: 390-395 (1993)
204. Wang J, Springer TA: Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol Rev* 163: 197-215 (1998)
205. Ware LB, Matthay MA: The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342: 1334-1349 (2000)
206. Weinacker AB, Vaszar LT: Acute respiratory distress syndrome: physiology and new management strategies. *Annu Rev Med* 52: 221-237 (2001)
207. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365-376 (1989)
208. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A: Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol* 78: 325-337 (2005)
209. Wheeler AP, Bernard GR: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet* 369: 1553-1564 (2007)
210. Whyte M, Renshaw S, Lawson R, Bingle C: Apoptosis and the regulation of neutrophil lifespan. *Biochem Soc Trans* 27: 802-807 (1999)

-
211. Xu YX, Ayala A, Chaudry IH: Prolonged immunodepression after trauma and hemorrhagic shock. *J Trauma* 44: 335-341 (1998)
 212. Yamashiro S, Kamohara H, Yoshimura T: MCP-1 is selectively expressed in the late phase by cytokine-stimulated human neutrophils: TNF-alpha plays a role in maximal MCP-1 mRNA expression. *J Leukoc Biol* 65: 671-679 (1999)
 213. Yoshie O, Imai T, Nomiyama H: Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 78: 57-110 (2001)
 214. Yoshimura T, Takahashi M: IFN- γ -Mediated Survival Enables Human Neutrophils to Produce MCP-1/CCL2 in Response to Activation by TLR Ligands. *J Immunol* 179: 1942-1949 (2007)
 215. Zellweger R, Ayala A, DeMaso CM, Chaudry IH: Trauma-hemorrhage causes prolonged depression in cellular immunity. *Shock* 4: 149-153 (1995)
 216. Zimmerman GA, Albertine KH, Carveth HJ, Gill EA, Grissom CK, Hoidal JR, Imaizumi T, Maloney CG, McIntyre TM, Michael JR, Orme JF, Prescott SM, Topham MS: Endothelial activation in ARDS. *Chest* 116: 18S-24S (1999)
 217. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM: Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions. *J Clin Invest* 98: 1699-1702 (1996)

DANKSAGUNG

mein erster Dank geht an meinen Doktorvater PD Dr. Mario Perl, der mir bei allen fachlichen Problemen zur Seite stand, Fragestellungen umgehend und ausführlich diskutierte, aber auch gleichzeitig eigene Initiativen förderte. Er vermochte es wissenschaftliches Interesse und Begeisterung in mir zu wecken. Vor allem bedanken möchte ich mich auch für den partnerschaftlichen Umgang während zahlreicher Stunden der tierexperimentellen Phasen.

Herrn Prof. Dr. F. Gebhard und Herrn Prof. Dr. L. Kinzl sei für die thematische Grundidee dieser Arbeit, Ihre stete Unterstützung und Bereitstellung von Laborräumlichkeiten und Gerätschaften gedankt.

Ich danke weiter

Herrn Prof. Dr. M. Knöferl für die stets hilfreichen Ratschläge, insbesondere bei der schriftlichen Ausarbeitung, sowie für die Durchsicht der Manuskripte,

Herrn Prof. Dr. H.-J. Groß für die theoretische und praktische Einarbeitung in die FACS-Analyse und Testung zahlreicher Proben,

Herrn Dr. D. Seitz für die technische Unterstützung bei der Ausarbeitung der Arbeit,

Frau S. Braumüller, die mit ihrer kompetenten und fachlich ausgezeichneten Arbeit sowie ihrer menschlichen und freundlichen Art dieses Projekt unterstützte und durch großartigen Einsatz maßgeblich am Gelingen der Arbeit beitrug,

meiner Mitdotorandin Hülya Begdeda für eine stets angenehm-fröhliche wie effektive Zusammenarbeit.

Zuletzt darf ich in tiefer Dankbarkeit meinen lieben Eltern meine Anerkennung für ihre Unterstützung und ihren großartigen Rückhalt aussprechen. Sie haben so vieles möglich gemacht.

LEBENS LAUF

aus Gründen des Datenschutzes entfernt