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

AUSWIRKUNGEN VON ÖSTROGEN AUF INFLAMMATORISCHE PROZESSE BEIM STUMPFEN THORAXTRAUMA AM MÄUSEMODELL

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

Vorgelegt von
VERA HEIDEMANN
Ulm
2012

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Markus Knöferl
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Enrico Calzia
Tag der Promotion:	12.07.2013

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG - 1 -

1.1 Bedeutung des Thoraxtraumas - 1 -

1.1.1 Epidemiologie - 1 -

1.1.2 Prognose - 2 -

1.2 Pathologische Grundlagen des Thoraxtraumas - 2 -

1.2.1 Pathophysiologie der Lungenkontusion - 2 -

1.2.2 Histologische Veränderungen - 3 -

1.2.3 Inflammatorische Auswirkungen - 3 -

1.3 Geschlechtsunterschiede in der Immunantwort nach stumpfem Thoraxtrauma - 5 -

1.3.1 Immunmodulatorische Effekte von Hormonen bei hämorrhagischem Schock- 5 -

1.3.2 Wirkungsweise des Östrogens - 6 -

1.4 Zielsetzung der Studie - 6 -

2 MATERIAL UND METHODEN - 7 -

2.1 Versuchstiere - 7 -

2.2 Versuchsgruppen - 7 -

2.3 Thoraxtrauma - 8 -

2.4 Probengewinnung - 10 -

2.4.1 Herstellung des Proteaseinhibitorcocktails - 11 -

2.4.2 Herstellung von Zytospinpräparaten aus der bronchoalveolären Lavage - 11 -

2.4.3 Isolation und Kultur von Splenozyten - 12 -

2.4.4 Isolation und Kultur von Milzmakrophagen - 12 -

2.4.5 Isolation und Kultur von Kupfferzellen - 13 -

2.4.6 Messung der Zytokinkonzentration - 14 -
2.4.7 Myeloperoxidase (MPO) - 15 -
2.4.8 Statistik - 15 -

3 ERGEBNISSE - 16 -

3.1 17β-Östradiolplasmakonzentration nach 17β-Östradiolgabe - 16 -

3.2 IL-6-Konzentrationen - 17 -

3.3 Myeloperoxidaseaktivität in der Lunge - 18 -

3.4 Mediatorfreisetzung aus Kupfferzellen - 19 -

3.5 Mediatorfreisetzung aus Milzmakrophagen - 21 -

4 DISKUSSION - 25 -

4.1 Zielsetzung - 25 -

4.2 Inflammatorische Parameter - 26 -

4.3 Schlussfolgerungen - 30 -

5 ZUSAMMENFASSUNG - 31 -

6 LITERATURVERZEICHNIS - 33 -

7 DANKSAGUNG - 46 -

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
BAL	bronchoalveoläre Lavage
CO_2	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme- linked Immunosorbant Serologic Assay
FBS	Fetal Bovine Serum
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen stimulierender Faktor
HE	Hämalaun Eosin
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ISS	Injury severity score
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	Monozytenchemotaktisches Peptid
MOD	Multiorgandysfunktion
MPO	Myeloperoxidase
MIP	Macrophage-Inflammatory-Protein
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Potentia Hydrogenii
pO_2	Sauerstoffpartialdruck

pCO_2	Kohlendioxidpartialdruck
rpm	Umdrehungen pro Minute
TNF	Tumornekrosefaktor

1 Einleitung

1.1 Bedeutung des Thoraxtraumas

1.1.1 Epidemiologie

Jährlich versterben in Deutschland etwa 20 000 Menschen an den Folgen eines Unfalls [90], wobei der Verkehrsunfall mit die häufigste Unfallursache darstellt [14]. Traumatisch-hämorrhagischer Schock und Schädel-Hirn-Trauma beeinflussen hierbei vor allem die Frühletalität [11,54]. Das Thoraxtrauma stellt eine der häufigsten Verletzungen dar. Oft ist es Ursache der Spätletalität [57,97]. Verursacht wird diese Spätletalität meist durch Komplikationen wie Sepsis und Multiorganversagen [61]. Das stumpfe Thoraxtrauma, welches in der Bundesrepublik wesentlich häufiger beobachtet wird als penetrierende Verletzungen [98] ist somit sowohl isoliert, als auch im Rahmen eines Polytraumas eine hochrelevante Schlüsselverletzung. Klinischen Studien zufolge findet sich bei etwa 50 - 60% der polytraumatisierten Patienten ein begleitendes Thoraxtrauma [24,33,98]. Die Bedeutung des stumpfen Thoraxtraumas steigt insofern, da es für etwa 20% der posttraumatischen Todesfälle verantwortlich ist, wobei zwei Drittel dieser Patienten ihre Verletzungen bei Verkehrsunfällen erleiden [33]. Zweithäufigste Ursache für ein stumpfes Thoraxtrauma sind Stürze aus großer Höhe. Anhand diesem Unfallmechanismus [98] ergibt sich, dass das Thoraxtrauma in etwa 80% der Fälle in Kombination mit thorakalen und extrathorakalen Begleitverletzungen auftritt [75,87]. Obwohl das Thoraxtrauma meist mit vielen Begleitverletzungen einhergeht, wird das Kontusionstrauma an sich als häufiger Wegbereiter für das Multiorganversagen gesehen. So wurde beispielsweise in einer Studie von Perl et al. in Mäusen ein Thoraxtrauma induziert [72]. Anschließend wurde eine Zökumligatur mit Punktion durchgeführt, um eine Sepsis zu auszulösen. Die Ergebnisse der Überlebensstudie zeigen, dass Mäuse mit vorangegangenem Thoraxtrauma eine signifikant höhere Letalität hatten als solche mit isolierter Sepsis.

1.1.2 Prognose

Die relativ geringe Letalität von 0-5% bei Patienten mit isoliertem Thoraxtrauma steht im Gegensatz zur Sterblichkeitsrate von Patienten mit zusätzlichen Verletzungen [32]. Hier steigt die Letalität auf 15-20% bei unter Sechzigjährigen, bei älteren Menschen (über 60 Jahre) sogar auf bis zu 40% [91]. Bei polytraumatisierten Unfallverletzten steigt die Sterblichkeit von 27% auf 56%, wenn eine zusätzliche Lungenkontusion diagnostiziert wurde [24].

Warum das Thoraxtrauma die Letalität derart erhöht, ist bisher weitgehend ungeklärt. Jedoch wird es als wesentlicher Faktor für später auftretende Komplikationen gesehen, wie beispielsweise Pneumonie, posttraumatische respiratorische Insuffizienz und akutes Atemnotsyndrom (ARDS) [97]. Die durch die Lungenkontusion induzierten entzündlichen Veränderungen dürften daran maßgeblich beteiligt sein und auch zur Entstehung der posttraumatischen Multiorgandysfunktion (MOD) beitragen [70,87,97] . Zusammenfassend nimmt das Thoraxtrauma sowohl isoliert, aber vor allem im Rahmen eines Polytraumas eine herausragende Rolle hinsichtlich Morbidität und Mortalität ein.

1.2 Pathologische Grundlagen des Thoraxtraumas

1.2.1 Pathophysiologie der Lungenkontusion

Die Verschlechterung der respiratorischen Funktion nach Lungenkontusion ist unmittelbare Folge der Traumatisierung des Thorax, die zu Blutungen und Ödembildung führt [67,82,97]. Durch den damit einhergehenden Verschluss der terminalen Luftwege kollabieren die peripheren Alveolen [67,82,97] . Da diese nun nicht mehr für den Gasaustausch zur Verfügung stehen, kommt es zur Abnahme der funktionellen Residualkapazität [67,81,82]. Es kommt zu einer Verminderung der Compliance, zu einem Anstieg der Shuntperfusion und somit zu einer konsekutiven Hypoxämie. Hieraus ergibt sich der Rückgang der respiratorischen und metabolischen Funktion der Lunge nach der Kontusion [67,81,82].

1.2.2 Histologische Veränderungen

Als Folge der Lungenschädigung als nicht-penetrierende Kompressions-Dekompressionsverletzung des Thorax kommt es zu histologisch fassbaren Schädigungen des Lungenparenchyms [34,103]. Nach Thoraxtrauma finden sich dys- bis atelektatische Lungenbereiche mit Verbreiterung der Alveolarsepten oder einer Destruktion der Alveolararchitektur [20,31] sowie der vaskulären Strukturen, was sehr rasch zu interstitiellen und intraalveolären Blutungen führt. Es kommt zu Permeabilitätsstörungen der Lungenstrombahn, was zu einem interstitiellen Ödem führt [67,82]. Als Ursache dieses Ödems werden durch Endothelzellschädigung hervorgerufene kapilläre Lecks vermutet [31,81]. Darüber hinaus werden Endothelschwellung, perivaskuläre Ödeme und Fettembolien, sowie eine Sequestration von neutrophilen Granulozyten beobachtet. [72,96]

1.2.3 Inflammatorische Auswirkungen

Durch die oben beschriebene Permeabilitätsstörung der Lungenstrombahn und hohe Konzentrationen von Chemokinen im bronchoalveolären Kompartiment kommt es zur Einwanderung aktiver neutrophiler Granulozyten [31,67,72,84,96]. Dies führt durch zunehmende Degranulation und Freisetzung gewebstoxischer Mediatoren zu einer lokalen entzündlichen Reaktion [31,67,72,84,96] . Es kommt zu einer lokalen Aktivierung des humoralen Gerinnungssystems, sowie einer Inaktivierung des Surfactants [66]. Diese Veränderungen beschränken sich jedoch nicht nur auf traumatisierte Lungenareale, sondern lassen sich im gesamten Lungenparenchym, also auch in nicht kontusionierten Bereichen nachweisen [20,84]. In der Lunge selbst kommt es zur Aktivierung von Abwehrzellen, neben den neutrophilen Granulozyten [66] insbesondere von Makrophagen, welche Ihrerseits pro- und antiinflammatorische Mediatoren freisetzen [55,56]. Diese lokale Entzündungsreaktion konnte in der bronchoalveolären Lavage durch den signifikanten Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen und chemotaktischen Mediatoren nachgewiesen werden [72]. Neben dieser lokalen Entzündungsreaktion scheinen die durch die zirkulierenden Entzündungsmediatoren vermittelten systemischen Einflüsse des

Traumas für die Entwicklung einer generalisierten inflammatorischen Reaktion eine wichtige Rolle zu spielen. So kommt es beispielsweise zu einer Funktionsänderung verschiedener nicht-ortsständiger Zellpopulationen, wie Kupffer-Zellen, Milz- und Peritonealmakrophagen sowie Splenozyten [41,48,49,72]. Das stumpfe Thoraxtrauma ist vergesellschaftet mit einem frühen Anstieg der Plasmakonzentrationen einiger Zytokine [26,63,71,93]. So kommt es schon zwei Stunden nach dem Trauma zu einem signifikanten Anstieg von Plasmainterleukin-6. Gleichzeitig findet eine Akkumulation von Interleukin-6 (IL-6), Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-α), Macrophage-Inflammatory-Protein-2 (MIP-2), Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) und Neutrophilen im bronchoalveolären Raum statt. Zusätzlich ist IL-6, MCP-1 sowie die Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität im Lungengewebe selbst stark erhöht und es wurde weiterhin nachgewiesen, dass die Produktion von IL-6, TNF-α und Interleukin-10 (IL-10) in Kupffer-Zellen schon 30 Minuten nach Induktion des Thoraxtraumas deutlich vermehrt ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass früh ansteigende Zytokinkonzentrationen in der Lunge, vor allem IL-6, eine wichtige Vermittlerfunktion spielen, da ihre lokale Spitzenkonzentration mit der systemischen Entzündungsreaktion übereinstimmt und gleichzeitig die Funktion des pulmonalen Endothels beeinträchtigt ist. Auch die Zytokinausschüttung von Lymphozyten und Milzmakrophagen unterliegt Veränderungen nach stumpfem Thoraxtrauma. Bei vorangegangenen Studien mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass zwei Stunden nach Thoraxtrauma die IL-12-Freisetzung durch Milzmakrophagen deutlich zunahm [26,71,93]. 24 Stunden nach dem Trauma zeigte sich bei den Versuchstieren hingegen eine deutlich verminderte Zytokinfreisetzung. Sowohl im Plasma als auch bei den Milzmakrophagensekretion kann ein signifikanter Abfall der Konzentration von TNF-α, Il-10 und Il-12 nachgewiesen werden [26,71,93]. Daher lässt sich ableiten, dass die Lungenkontusion schwere immunologische Dysfunktionen der Lymphozyten und Milzmakrophagen hervorruft [26,71,93].

1.3 Geschlechtsunterschiede in der Immunantwort nach stumpfem Thoraxtrauma

Aus der Literatur ergeben sich zahlreiche Hinweise, dass das Geschlecht eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Reaktionen spielt [21,42,43,47]. So war in experimentellen Untersuchungen zum traumatisch-hämorrhagischen Schock die Immunantwort in männlichen Mäusen im Vergleich zu weiblichen Tieren deutlich vermindert [21,46,65]. Hierbei zeigten sich vor allem Auswirkungen auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Kupfferzellen [46] sowie Milzzellen [44]. Auch konnte in Studien von Knöferl et al. gezeigt werden, dass weibliche Geschlechtshormone die Immunantwort nach hämorrhagischem Schock normalisieren konnten [6,47].

1.3.1 Immunmodulatorische Effekte von Hormonen bei hämorrhagischem Schock

Häufig kommt es durch ein Trauma zu starken Blutungen mit hämorrhagischen Schock. Dieser führt zu einer beträchtlichen Dysregulation der systemischen Immunantwort, Endorganschädigung und Tod [30,50,77,79,83,86,92,105,107] . Verschiedene klinische Studien haben gezeigt, dass es schon in der ersten Stunde nach einem schweren Trauma oder einem chirurgischen Eingriff zu einer deutlichen Verschlechterung der Immunabwehr kommt, die sich im Weiteren durch eine anhaltende Immunsuppression auszeichnet [6,12,40,69,79,102]. Im Einzelnen kommt es zu einem Rückgang der T- und B-Zellfunktion. Auch dendritische Milzzellen und antigenpräsentierende Makrophagen sind in ihrer Funktion eingeschränkt und es kommt zu einer veränderten Zytokinausschüttung [6,16,39,79] . Hierbei wurde festgestellt, dass männliche und weibliche Individuen unterschiedlich auf Verletzungen mit hämorrhagischem Schock reagieren [21,42,43,79,88,89]. Weibliche Ratten und Mäuse bewiesen eine stärkere Widerstandsfähigkeit in Bezug auf septische Komplikationen durch Zökumligatur mit Punktion nach Trauma im Vergleich zu den männlichen [13,16,21,65,76]. Dieser weibliche “Schutz” gegen Komplikationen und Mortalität in Verbindung mit Verletzungen, Traumen und Sepsis wird hauptsächlich dem weiblichen Geschlechtshormon Östrogen zugeschrieben [51,79]. Es wurde nachgewiesen, dass die kardiovaskulären, hepatischen und immunologischen Funktionen bei männlichen

Versuchstieren, sowie bei ovarektomierten und älteren Tieren nach hämorrhagischen Schock im Vergleich zu weiblichen Tieren in der Proestrus-Phase deutlich vermindert sind und dieses auch im weiteren Verlauf bleiben [1,6,8,15,79,100,101]. In männlichen Versuchstieren lassen sich diese verminderten Funktionen durch Östrogengabe jedoch wiederherstellen [60,79,104]. Auch wurde festgestellt, dass die Immunprotektion nur bei denjenigen weiblichen Versuchstieren nach hämorrhagischem Schock erhalten bleibt, die sich in der Proestrus-Phase des weiblichen Zyklus befinden, das heißt, bei denen am meisten Östrogen vorhanden ist [2,52,53,79,104].

1.3.2 Wirkungsweise des Östrogens

Östrogen, das weibliche Geschlechtshormon wird hauptsächlich in den Ovarien und der Plazenta produziert [22,36,80,95,99]. Die drei Hauptöstrogene sind Östradiol, Östriol und Östron. Die Hauptform des Östrogens bei Frauen vor der Menopause ist Östradiol [22,36,80,95,99]. Die Wirkung des Östrogens wird vor allem durch intrazelluläre Rezeptoren vermittelt, die in fast allen Zellen vorkommen. Die Bindung des Östrogens führt zu Aktivierung und Dimerisierung der Rezeptoren, gefolgt von der Translokation in den Zellkern, wo sie an spezifische DNA-Segmente der auf Östrogen ansprechenden Gene binden. Außer der genomischen Bindung wurde ein Oberflächenrezeptor, ein sogenannter G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPR) 30 gefunden, der Affinität zum Östrogen haben soll [22,36,80,95,99]. Daher ist der Wirkeffekt des Östrogens nicht unbedingt nur durch Mechanismen vermittelt, die Gentranskription benötigen, sondern auch durch die unmittelbare extranukleare Wirkung von zytosolischen Enzymen [6,29,99].

1.4 Zielsetzung der Studie

Die vorangegangenen Überlegungen führten zu der Hypothese, dass die in der Literatur beschriebene geschlechtsspezifische Immunmodulation auch in der Pathogenese von respiratorischen Komplikationen nach einem stumpfen Thoraxtrauma eine Rolle spielt. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollten in einem Mäusemodell des stumpfen Thoraxtraumas verschiedene Parameter der Inflammation in männlichen Tieren mit oder

ohne Östrogenapplikation gemessen werden. Es wurden insbesondere solche Parameter ausgewählt, die in vorangegangenen Studien zum hämorrhagischen Schock und Sepsis eine Veränderung durch Östrogengabe aufwiesen. Dazu zählen Splenozyten, Kupfferzellen, Makrophagen und Veränderungen in der BAL. Die Fragestellung lautete demnach, ob das weibliche Geschlechtshormon Östrogen Einfluss auf die inflammatorische Reaktion nach stumpfem Kontusionstrauma hat.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere werden männliche C3H/HeN Mäuse (Charles River, D-97633 Sulzfeld) mit einem Alter von 8-9 Wochen und einem Gewicht von 22-28 g verwendet. Die Tiere wurden in den Ställen der Bereichstierhaltung des Tierforschungszentrum der Universität Ulm, Haus IV, Untergeschoss Universitätsklinikum Safranberg Ulm gehalten. Die Unterbringung der Tiere erfolgt zu maximal 10 Tieren pro Käfig bei einer Raumtemperatur von 21°C. Um einen gleichmäßigen Tag-/Nachtrhythmus zu erzeugen, wurde der Raum 12 Stunden belichtet und anschließend 12 Stunden verdunkelt. Der freie Zugang zu Futter und Wasser war gewährleistet. Das Futter bestand aus einer standardisierten Versuchstiernahrung (Altromin 1314 Forti, Altromin GmbH, Lage-Lippe). Die Tierversuche wurden ausschließlich in den Räumen der Bereichstierhaltung Safranberg durchgeführt.
Die tierexperimentellen Eingriffe wurden von der zuständigen Behörde des Regierungspräsidiums Tübingen genehmigt (Registrierungsnummer 697).

2.2 Versuchsgruppen

Die Bestimmung der Zielparameter, die unten ausführlich genannt werden, erfolgte aus dem Gewebe männlicher Mäuse, die 4 Stunden nach Induktion des Thoraxtrauma getötet wurden. Neben den Versuchstieren mit Thoraxtrauma gab es eine

Kontrollgruppe, die kein Trauma erhielt. Bei dieser wurden ebenfalls unter Narkose sämtliche zur Vorbereitung des Thoraxtraumas notwendige Manipulationen, wie z.B. Befestigung auf einer Glasplatte, Rasur, Markierung und Messung der Atemfrequenz durchgeführt, sie erhielten jedoch keine Druckschädigung. Beide Versuchsgruppen wurden zusätzlich in 2 Untergruppen unterteilt, in denen jeweils eine Gruppe ein Plazebo subkutan, bestehend aus 200 µl Maiskeimöl erhält und die andere 200 µl 17β-Östradiol (10 µl/25 g Mausgewicht). Die Gabe erfolgt direkt nach dem Thoraxtrauma zusammen mit 0,01 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin subkutan (Temgesic). Somit erfolgen die Untersuchungen an jeweils 4 Gruppen (n=10) zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Thoraxtrauma:

1. Kontrollgruppe, Plazebo
2. Thoraxtrauma, Plazebo
3. Kontrollgruppe, 17β-Östradiol
4. Thoraxtrauma, 17β-Östradiol

2.3 Thoraxtrauma

Für die Versuche wurde ein Thoraxtraumamodell der Maus verwendet, welches durch eine Druckwelle eines Druckwellengenerators ausgelöst wurde und ein stumpfes, isoliertes, bilaterales Verletzungsmuster hervorrief [50]. Mit diesem Modell lässt sich reproduzierbar ein Thoraxtrauma induzieren, welches zu einer schweren Lungenkontusion ohne extrathorakale Begleitverletzungen führt [18,19,50].

Die Tiere wurden unmittelbar vor Auslösen des Thoraxtraumas durch eine volatile Spülmaskennarkose narkotisiert. Hierbei wurde die Narkose in Sevofluran-Atmosphäre (Sevorane, Abbott GmbH, Wiesbaden) eingeleitet. Zur Aufrechterhaltung der Narkose lag der Kopf des Tieres in einer Spülmaske, die von einem Gemisch aus medizinischem Sauerstoff (Westfalen AG, Münster) und Sevofluran durchströmt wurde. Zur exakten Einstellung des Frischgaszuflusses in das System diente ein Rotameter (Drägerwerk AG, Lübeck), über welches der Sauerstoff mit einem Fluss von 0,8 l pro Minute zugeführt

wurde. Die Sevofluranbeimischung erfolgte über einen Vapor (Drägerwerk AG, Lübeck). Die alveoläre Konzentration des Narkosegases lag bei 2 bis 2,5 Vol.% und wurde zur Anpassung der Narkosetiefe des Tieres über das Verdampfersystem in diesem Bereich variiert. Die narkotisierten Tiere wurden in Rückenlage mit abgespreizten Extremitäten mittels Klebeband auf einer Plexiglasplatte fixiert, ihr Thorax wurde geschoren sowie Sternum und Brustkorbmitte mit wasserfestem Stift markiert. Zur Induktion des Thoraxtraumas wurden die Tiere unter dem Druckwellengenerator zentriert, so dass die knöcherne Unterkante des Sternums mit der Unterkante des Druckwellengenerators abschloss und sich so der Mittelpunkt der Austrittsöffnung des Generators zentral über der Sternummitte befand. Anschließend wurden die Versuchstiere in Inspirationsstellung einer Druckwelle ausgesetzt. Diese entstand in einem Zylinder, in dem bei definiertem Druck eine Polyestermembran von 50 µm Stärke (Mylar, DuPont Deutschland, Bad Homburg) zum Zerreißen gebracht wurde. Dabei entstand eine rasch ansteigende und etwas langsamer abnehmende Druckwelle mit einer Dauer von 3 ms und einem Spitzendruck von 0,76 ± 0,06 bar [50]. Der Zylinder-Sternum-Abstand betrug 1,5 cm. Auf diese Weise wurde bei minimaler Letalität und fehlenden Begleitverletzungen am knöchernen Thorax und an den abdominellen Organen eine ausreichende pulmonale Kontusion erreicht. Bei den Kontrolltieren wurden ebenfalls unter Narkose sämtliche zur Vorbereitung des Thoraxtraumas notwendige Manipulationen durchgeführt, sie erhielten jedoch keine Druckschädigung.

Nach Applikation des Thoraxtraumas respektive Kontrolleingriffs wurde die Apnoezeit und/oder Atemfrequenz (Ausgangswert, Wert nach einer bzw. fünf Minuten) der Tiere ermittelt und 0,01 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin s.c. verabreicht. Vor Gabe von Plazebo oder Östradiol wurde die Gebrauchslösung hergestellt. Dazu wurde zunächst eine Grundlösung des 17β-Östradiols (17β-Estradiol 3-Benzoate) hergestellt, bestehend aus 10 mg Östradiol gelöst in 20 ml Maiskeimöl. Die Gebrauchslösung bestand aus 2 ml dieser Grundlösung mit 18 ml Maiskeimöl. Die jeweiligen Gruppen erhielten entweder 200 µl Maiskeimöl oder 200 µl der 17β-Östradiol-Gebrauchslösung, was einer Dosierung von 10 µg/25 g Körpergewicht entspricht. Dieses wurde subkutan in den Nacken gespritzt. Anschließend wurde die volatile Narkose beendet. Nach vierstündiger Beobachtungszeit wurden bei den Versuchstieren die folgenden Eingriffe zur Tötung und Probengewinnung durchgeführt.

2.4 Probengewinnung

Unmittelbar nach Ablauf der Beobachtungszeit wurden alle Tiere mit einer Überdosis Sevofluran getötet, der Thorax eröffnet und das Herz freipräpariert. Danach wurden die Tiere durch Punktion des rechten Ventrikels über eine 1 ml-Spritze mit Heparinkonus entblutet. Das so gewonnene Blut wurde in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) umgefüllt, bei 400 g, 4°C 10 Minuten zentrifugiert (Biofuge Fresco Fa. Heraeus), das Plasma wurde abpipettiert und in 120 µl Portionen bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Nun wurde der Thoraxschnitt nach kranial bis knapp unter die Schnauze der Maus verlängert, und die Trachea freipräpariert. Nach Vorlegen eines einfachen Knotens wurde die Trachea eröffnet und das distale Ende eines 10 cm langen Plastikschlauches (Merck) (befestigt an einer 1 ml-Spritze mit 22 G Kanüle) zur Durchführung einer bronchoalveolären Lavage (BAL) in die Trachea eingebracht und mit dem vorgelegten Knoten fixiert. Es wurden 0,7 ml PBS-Dulbecco (Gibco Life Technologies, Karlsruhe) langsam eingespritzt, wieder abgezogen und in ein beschriftetes 1,5 ml Eppendorfgefäß (mit 1 µl Proteaseinhibitorcocktail (Herstellung wird in 2.4.1 näher ausgeführt)) gefüllt (BAL 1), durchmischt und auf Eis gelagert. Danach wurden mit einer anderen Spritze über den in die Trachea eingelegten Katheter nochmals 0,7 ml PBS langsam eingespritzt, abgezogen und erneut eingespritzt. Dieser Spülvorgang wurde zweimal wiederholt, das Aspirat wurde in ein zweites Eppendorf gegeben und auf Eis zwischengelagert (BAL 2).

Nach Eröffnung des Abdomens und Inspektion der Abdominalorgane wurde das Zwerchfell von der Thoraxinnenseite gelöst. Die Lunge wurde nun entnommen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte nach Seiten getrennt in Eppendorfgefäßen bei -80°C. Es folgte die Entnahme der Milz in 9 ml PBS-Lösung. Die großen Gefäße im Thorax wurden abgeklemmt und die Vena cava inferior unterhalb der Nieren durchtrennt. Nun wurde die Leber durch die Pfortader zunächst mit 20 ml Hanks-Lösung (Gibco Life Technologies) perfundiert, anschließend mit 10 ml 0,075% Kollagenase (in Hanks-Puffer, Type IV, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim). Anschließend folgt die Entnahme der kompletten Leber in 5 ml 0,075% Kollagenase und Zwischenlagerung auf Eis.

2.4.1 Herstellung des Proteaseinhibitorcocktails

Zunächst wurden die Stocklösungen hergestellt. Dazu wurde Aprotinin (Sigma) in Aqua dest im Verhältnis 1:1 gelöst (1mg Aprotinin/ml Aqua dest) (Sigma). Das gleiche Vorgehen erfolgte mit Leupeptin (Sigma) (1mg/ml Aqua dest). 5 mg Pepstatin (Sigma) wurden in 1 ml DMSO (Sigma) vollständig gelöst und anschließend 4 ml Aqua dest zugefügt. Vom Trypsininhibitor (Sigma) wurden 10 mg in 1 ml Aqua dest gelöst.
Nun erfolgte die Herstellung des Cocktails. Hierzu wurden 5 µl Aprotinin Stocklösung mit 12 µl Leupeptin Stocklösung gemischt. Des weiteren wurden 2 µl Pepstatinlösung, sowie 10 µl Trypsininhibitor Stocklösung hinzugefügt.

2.4.2 Herstellung von Zytospinpräparaten aus der bronchoalveolären Lavage

Nach Probengewinnung wurde die BAL 1 zusammen mit dem Plasma bei 400 x g 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und zu je 120 µl in vorbereitete 0,5 ml Safe-Lock-Tubes (Eppendorf AG) aliquotiert. Das Sediment wurde in PBS vorsichtig resuspendiert (ml-PBS entspricht ml-BAL1) und mit der BAL 2 vermischt. Von den resuspendierten Zellen wurden nun 50 µl abpipettiert. Diese wurden mit 1,25 µl Kristallviolett versetzt (Klinische Chemie, Uniklinik am Safranberg). Anschließend wurden die Zellen auf eine Neubauer-Zählkammer (Merck, Darmstadt) gegeben. Die Kerne färben sich mit einer Latenz von einigen Minuten an. So ist eine Unterscheidung von kernhaltigen Zellen wie Alveolarmakrophagen und Leukozyten von Erythrozyten möglich. Nun wurden die Anzahl der Erythrozyten, sowie die Anzahl der Leukozyten und Makrophagen mittels Handstückzähler bestimmt. Danach wurden Zytozentrifugenpräparate zur Unterscheidung von Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und segmentkernigen Zellen mittels Cytospin 3 (Zentrifuge, Fa. Shandon, Pittsburgh) angefertigt. Die Präparate mussten ca. 10 Minuten trocknen und wurden anschließend im Methanolbad (Sigma) fixiert. Dann wurden sie mit modifizierter Pappenheimfärbung (Hemacolor, Merck) für Blutausstriche angefärbt und am Mikroskop ausgezählt.

2.4.3 Isolation und Kultur von Splenozyten

Nach Entnahme der Milz wurde das Organ über einer Petrischale vorsichtig zwischen den rauhen Seiten von zwei sterilen Objektträgern zerrieben. Die so entstandene Zellsuspension wurde anschließend bei 4°C und 320 x g für die Dauer von 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die im Zellsediment vorhandenen Erythrozyten hypoton lysiert. Dies geschah durch Zupipettieren von 1,8 ml Aqua dest mit anschließendem Schütteln der Suspension und sofortiger Zugabe von 200 µl zehnfach verdünntem PBS, was die Suspension wieder isotonisiert. Die Bindegewebsreste wurden nach Zugabe von 8 ml PBS durch Adhäsion an einer Pipette aus der Zellsuspension entfernt. Dies erfolgte durch Aufnahme der gesamten Suspension in eine Pipette und anschließendes langsames Zurückführen der Flüssigkeit ins Falcon. So bleiben Bindegewebsrest an der Pipette hängen. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert (15 Minuten, 4°C, 320 x g), in einem Nährmedium (10% Fetal Bovine Serum, FBS, Biochrom, S0115) resuspendiert und gezählt (20 µl Zellsuspension + 180 µl Trypanblau). Jeweils $1x10^7$ Splenozyten wurden mit und ohne Stimulation mit dem Mitogen Concanavalin A (2,5 µg/ml, Sigma) für die Dauer von 48 Stunden in 10 ml RPMI (Gibco), 10% FBS bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände mit einer Pipette abgenommen und in 15 ml Röhrchen überführt. Diese wurden dann bei 1400 rpm für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die so gewonnenen Überstände wurden gleichmäßig auf Eppendorf Röhrchen verteilt und bis zur Analyse der Zytokinkonzentration bei -80°C gelagert.

2.4.4 Isolation und Kultur von Milzmakrophagen

Aus einem Teil der oben genannten Zellsuspension der Milz wurden zusätzlich Milzmakrophagen durch ihre Fähigkeit an 24-Well-Zellkulturplatten (Falcon) anzuhaften, isoliert. Hierzu wurden $1x10^7$ Zellen pro Well für die Dauer von zwei Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Dann wurden die am Boden anhaftenden Makrophagen durch wiederholtes, vorsichtiges Auswaschen nicht-adhärenter Zellen isoliert. Der so erhaltene

Monolayer bestand aus Milzmakrophagen und wurde durch 48-stündige Inkubation in 10% FBS (Biochrom, Berlin, Germany) mit 10 µl/ml Lipopolysaccharid (LPS, Sigma L-2880) stimuliert. Anschließend wurden die Kuturüberstände gewonnen, zentrifugiert und bis zur Analyse der Zytokinkonzentration bei -80°C gelagert.

2.4.5 Isolation und Kultur von Kupfferzellen

Nach Perfusion und aseptischer Entnahme der Leber wurde diese in einer Petrischale mit oben genannter Kollagenaselösung mit einer Schere sehr fein zerkleinert und für 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Leber sofort auf Eis gestellt und durch auf- und abpipettieren mit Pipetten weiter zerkleinert. Die Zellsuspension wurde dann über ein Zellsieb (100 µm, BD Biosciences, Heidelberg) in ein 50 ml-Röhrchen (Falcon, BD Biosciences, Heidelberg) überführt und zweimal für 15 Minuten bei 1400 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde aufgeschüttelt und mit 12 ml Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco, Karlsruhe) mit 0.1% Gentamicin (Gibco), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco) und 10% fetales Kälberserum (FBS, Biochrom, Berlin) aufgefüllt. Mit einer Transferpipette wurden 6 ml der Zellsuspension über 5 ml 16% iges Metrizamide in ein 15 ml-Röhrchen überschichtet. Dieses wurde dann 45 Minuten bei 3500 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die Kupfferzellen befinden sich direkt über dem Metrizamide, in der sogenannten Interphase. Hieraus wurden die Zellen mit einer Transferpipette abgenommen und in ein Röhrchen mit 15 ml des oben genannten DMEM-Gemisches (Gibco) gegeben. Nun folgte ein zweimaliges 15 minütiges Zentrifugieren bei 1400 rpm bei 4 °C, dazwischen Abnehmen des Überstandes, Aufschütteln des Pellets und erneute Zugabe von 15 ml DMEM-Gemisches. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 0,95 ml DMEM-Medium aufgeschüttelt. Die Färbung der Zellen erfolgte mit Trypanblau (Sigma). Anschließend Zellzählung in der Neubauer Zählkammer. Die Zellzahl wurde auf 1,5 x 10^6 Zellen/ml eingestellt und die Zellsuspension auf 24er-Kulturplatten (Falcon) für 3 Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Nicht adhärente Zellen wurden durch einmaliges Waschen mit DMEM entfernt. Dann wurden die Zellen nach Zugabe von 1 ml/well DMEM mit 0.1% Gentamicin, 1% Penicillin-Streptomycin und 10% FCS und LPS (1 µg/ml) erneut für 24 Stunden, bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Die Kulturüberstände

wurden abgenommen und in 15 ml-Röhrchen überführt. Diese wurden bei 1400 rpm 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.6 Messung der Zytokinkonzentration

Die Konzentrationen von Plasmaöstradiol, IL-6 und TNF-α wurden mittels ELISA bestimmt. Für das Östradiol wurde Estradiol Elisa (Fa. Biosource, Art. Nr. KAQ 0621) verwendet. Für IL-6 und TNF-α wurden OptEIA Sets (PharMingen, Heidelberg) für die Maus mit einer Sensitivität von 15,6-1000 pg (für IL-6 und TNF-α) verwendet und die Tests nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Spezifität: Keine Kreuzreaktion mit rekombinanten Mauszytokinen vom Typ IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-15, IFN-γ, GM-CSF, MCP-1 sowie TNF-α bei IL-6 und IL-6 bei TNF-α. Zu Beginn wurden 100 µl des mitgelieferten anti-Zytokin-Antikörpers gemäß Herstellervorgaben mit Coating-Puffer (0,1 mol Natrium-Carbonat pH 9,5) verdünnt, auf eine Mikrotiterplatte (C96 Maxisorp Cert., NUNC-Immuno, Wiesbaden) aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am zweiten Versuchstag folgten zunächst mehrere Waschvorgänge mit Waschpuffer (8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,5 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O, 0,4 g KH_2PO_4, 0,5 g Tween 20, 1000 ml Aqua bidest. (Sigma, pH 7,0) Anschließend wurde zum Blockieren unspezifischer Bindungen für 1,5 Stunden mit assay diluent (Fertigprodukt PharMingen) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proben bzw. Verdünnungen der Standards (PharMingen, 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 hinzu gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am dritten Tag wurde nach erneuten Waschschritten mit Waschpuffer (nach Herstellerangaben) der entsprechende, mit Avidin-Meerrettichperoxidase gekoppelte zweite Antikörper (PharMingen, nach Herstellerangaben in assay diluent verdünnt) auf die Mikrotiterplatte gebracht. Nach wiederholtem Waschen wurde für 30 Minuten mit 100 µl Tetramethylbenzidin Substrat (PharMingen) im Dunkeln inkubiert und nach Zufügen von 50 µl Stoplösung (2N H_2SO_4) die Absorption bei 450 nm photometrisch gemessen. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der aus den Standards berechneten Eichgeraden ermittelt.

2.4.7 Myeloperoxidase (MPO)

Die Bestimmung der Lungenmyeloperoxidaseaktivität erfolgte wie schon an anderer Stelle beschrieben [94].

80 mg Lungengewebe wurde unter kontinuierlichem Durchfluss von flüssigem Stickstoff zerkleinert. Anschließend wurde das Gewebe in 1,5 ml Pufferlösung (Ultrarax T25, Jahnke und Kunkel, Staufen) homogenisiert. Der Puffer enthielt 10,35 g KH_2PO_4 (Merck) in 950 ml Aqua dest. Der pH wurde mit Hilfe von 0,91 g K_2HPO_4 (Merck) auf 50 ml Aqua dest. und 0,5% Hexadecyltriethylammoniumbromid (Sigma) auf einen Wert von 5,4 eingestellt. Die Gewebehomogenisate wurden bei 60°C für 2 Stunden inkubiert und dann bei 3950 x g bei Raumtemperatur für 15 Minuten zentrifugiert. 25 µl des Überstandes oder der Standardlösung (Novabiochem, Schwalbach, Germany) wurden mit 25 µl Tetramethylbenzidin (Sigma) und 200 µl 30% H_2O_2 (Fluka, Deisenhofen) gemischt und bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl 2M H_2SO_4 gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen und die Myeloperoxidaseaktivität in Abhängigkeit von den Standards berechnet.

2.4.8 Statistik

Die Ergebnisse aus den Messungen der Zytokinbestimmungen wurden auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht.

Nach Ermittlung der Normalverteilung der Grundgesamtheit wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) für unabhängige Stichproben durchgeführt. Dieser Varianzanalyse folgte zur Ermittlung von statistisch signifikanten Unterschieden ein post-hoc test nach Student Newman Keuls. Bei $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant erachtet. Die Ergebnisse sind in den Diagrammen sowie in den Tabellen als Mittelwerte ± Standardabweichung vom Mittelwert als Fehlerbalken angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 17β-Östradiolplasmakonzentration nach 17β-Östradiolgabe

Bei den mit Placebo behandelten Tieren der Kontrollgruppe betrug die 17β-Östradiolplasmakonzentration 33 ± 4,5 pg/ml. Bei der mit Placebo behandelten Traumagruppe betrug der Wert 42,1 ± 5,8 pg/ml. 4 Stunden nach einer einzelnen Gabe von 40 µg/kg 17β-Östradiol waren die Plasmakonzentrationen von 17β-Östradiol signifikant angestiegen im Vergleich zu den Werten der Plazebotiere. Die Werte bei den Tieren der Kontrollgruppe, die 17β-Östradiol erhalten hatten waren signifikant erhöht, ebenso bei den Tieren der Traumagruppe, die ebenfalls 17β-Östradiol erhalten hatten (*Abbildung 1*).

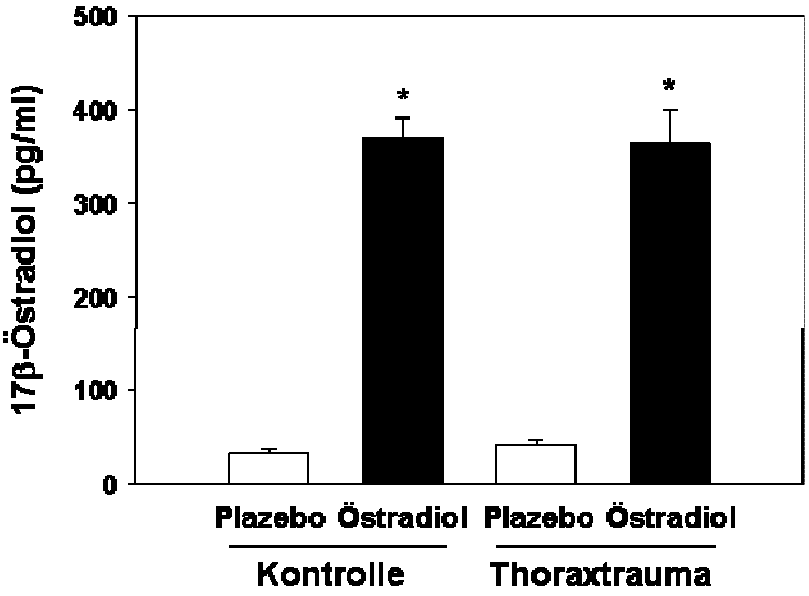


Abb. 1: Plasmakonzentration von 17β-Östradiol 4 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollprozedur. Männliche Mäuse erhielten entweder 200 µl 17β-Östradiol (10 µg/25 g) subkutan oder Maiskeimöl als Trägersubstanz direkt nach Trauma oder Kontrolleingriff. Nach 4 Stunden wurden die Tiere getötet und die 17β-Östradiolkonzentrationen im Plasma durch Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gemessen. Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardfehler. Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) gefolgt von einem post-hoc test nach Student Newman Keuls durchgeführt. *p < 0,05 vs. Kontrolle, n = 10/Gruppe

3.2 IL-6-Konzentrationen

Wie in *Abbildung 2* gezeigt, war kein signifikanter Unterschied der Il-6-Konzentration in der BAL zwischen den Tieren der Kontrollgruppe, die mit der Trägersubstanz behandelt wurden oder denen, die 17β-Östradiol erhalten hatten ersichtlich. Bei den Tieren der Traumagruppe, die Plazebo erhalten hatten, waren die Il-6-Konzentrationen in der BAL im Vergleich zu den Tieren, die kein Trauma erhalten hatten deutlich erhöht. Wurde den Tieren der Traumagruppe 17β-Östradiol verabreicht, fiel der Anstieg der Il-6-Kontentration signifikant geringer aus als bei den Plazebotieren der Traumagruppe.

Es konnte kein Unterschied in den Plasmakonzentrationen von Il-6 zwischen den mit Plazebo behandelten Tieren und den mit 17β-Östradiol behandelten Tieren der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Plasma-Il-6-Konzentrationen stiegen bei den mit Plazebo behandelten Thoraxtraumatieren signifikant an, während die Behandlung mit 17β-Östradiol nach Thoraxtrauma den Anstieg von Il-6 signifikant abschwächte (*Abbildung 3*).

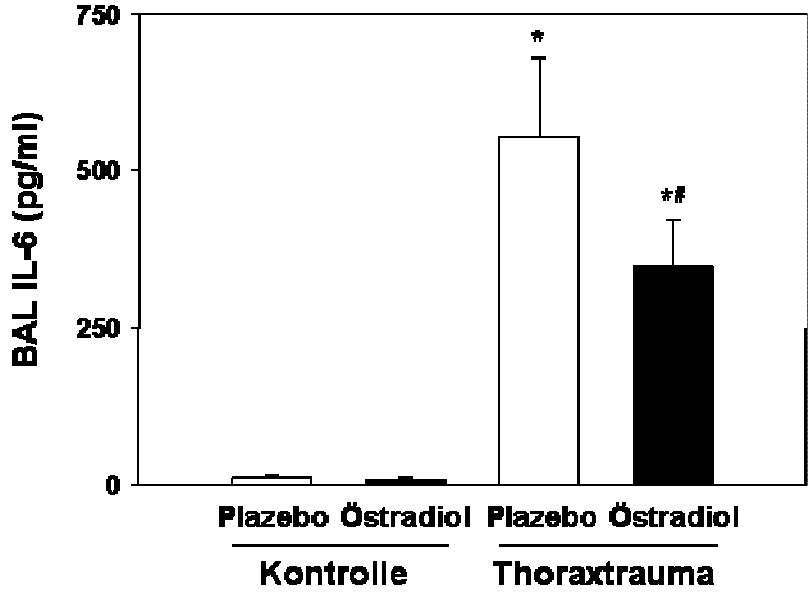


Abb. 2: IL-6-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) 4 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollprozedur. Männliche Mäuse erhielten entweder 200 µl 17β-Östradiol (10 µg/25 g) oder Maiskeimöl als Trägersubstanz direkt nach Trauma oder Kontrolleingriff. Nach 4 Stunden wurden die Tiere getötet und die IL-6-Konzentrationen ich der bronchoalveolären Lavage (BAL) durch Enzyme-linked immunosorbent assay gemessen. Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardfehler. Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) gefolgt von einem post-hoc test nach Student Newman Keuls durchgeführt. *p < 0,05 vs.Kontrolle, #p < 0,05 vs. Thoraxtrauma + Plazebo, n = 10/Gruppe

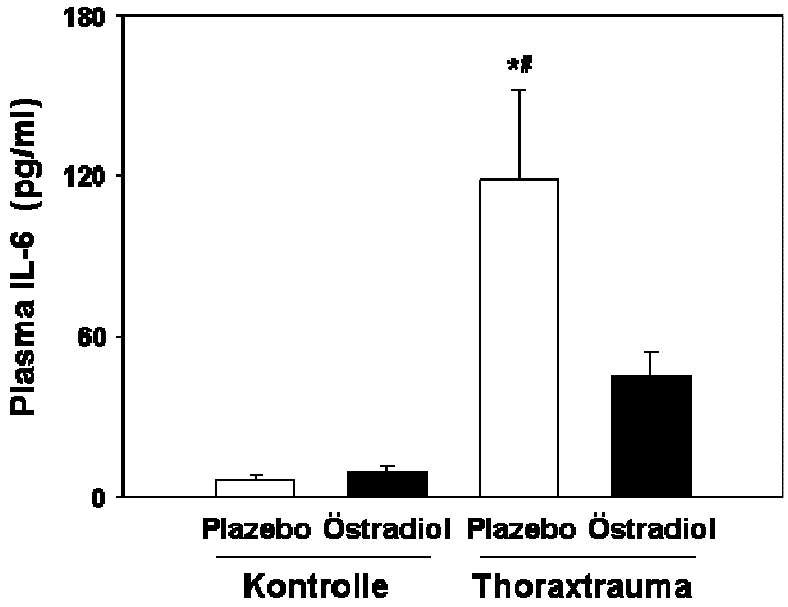


Abb. 3: Plasmazytokinkonzentration von IL-6, 4 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollprozedur. Männliche Mäuse erhielten entweder 200 µl 17β-Östradiol (10 µg/25 g) oder Maiskeimöl als Trägersubstanz direkt nach Trauma oder Kontrolleingriff. Nach 4 Stunden wurden die Tiere getötet und die IL-6-Konzentrationen im Plasma durch Enzyme-linked immunosorbent assay gemessen. Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardfehler. Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) gefolgt von einem post-hoc test nach Student Newman Keuls durchgeführt. *$p < 0,05$ vs. Kontrolle, $^{\#}p < 0,05$ vs. Thoraxtrauma + Östradiol, n = 10/Gruppe

3.3 Myeloperoxidaseaktivität in der Lunge

Die Aktivität der Lungenmyeloperoxidase war 4 Stunden nach Thoraxtrauma gefolgt von Plazebogabe im Vergleich zur Traumagruppe deutlich erhöht. In der Kontrollgruppe konnte zwischen den Östradioltieren und Plazebotieren kein Unterschied nachgewiesen werden. Die Behandlung mit 17β-Östradiol nach Thoraxtrauma hatte einen deutlich geringeren Anstieg der Myeloperoxidaseaktivität gegenüber der Kontrollgruppe zur Folge (*Abbildung 4*).

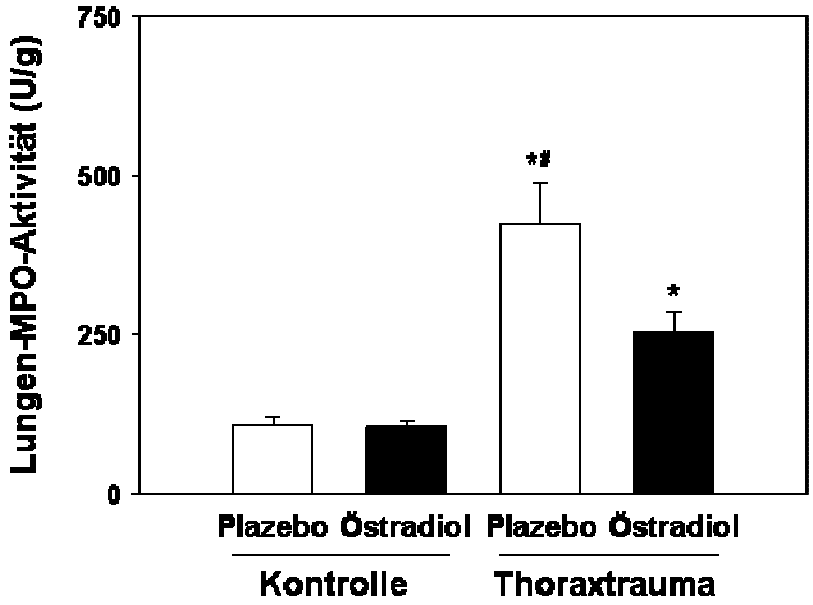


Abb. 4: Myeloloperoxidaseaktivität in der Lunge (Lung MPO Activity, U/g) 4 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollprozedur nach 17β-Östradiolgabe (10 µg/25 g) oder Gabe von Trägersubstanz (200 µl Maiskeimöl). Die Myeloperoxidaseaktivität wurde als Index für den Grad der Neutrophilenakkumulation gemessen. Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardfehler. Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) gefolgt von einem post-hoc test nach Student Newman Keuls durchgeführt. *$p < 0,05$ vs. Kontrolle, $^{\#}p < 0,05$ vs. Thoraxtrauma + Östradiol, n = 10/Gruppe

3.4 Mediatorfreisetzung aus Kupfferzellen

Die Il-10-Freisetzung aus Kupfferzellen war in der Kontrollgruppe 4 Stunden nach 17β-Östradiolgabe tendentiell aber nicht signifikant erhöht im Vergleich zu den Tieren, die Plazebo erhalten hatte. Die Il-10-Freisetzung bei den Tieren der Traumagruppe, die kein Östradiol erhalten hatten war signifikant zu allen anderen Tiergruppen erhöht. In der Traumagruppe war bei den mit 17b-Östradiol behandelten Tieren die Il-10-Freisetzung nicht signifikant erhöht im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. (*Abbildung 5*).

Die Gabe von Östradiol erhöhte die Il-6-Freisetzung der Kupfferzellen in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den mit Plazebo behandelten Mäusen, jedoch nicht signifikant. Nach Thoraxtrauma nahm die Freisetzung von Il-6 bei den mit Plazebo behandelten Mäusen signifikant zu, während es keinen signifikanten Unterschied bei den Gruppen der mit 17β-Östradiol behandelten Tiere gab (*Abbildung 6*).

17β-Östradiolgabe erhöhte die TNF-α-Freisetzung der Kupfferzellen in der Kontrollgruppe. Nach Thoraxtrauma nahm die Freisetzung von TNF-α bei den mit Plazebo

behandelten Mäusen signifikant zu, während es keinen signifikanten Unterschied bei den beiden Gruppen der mit 17β-Östradiol behandelten Tiere gab (*Abbildung 7*).

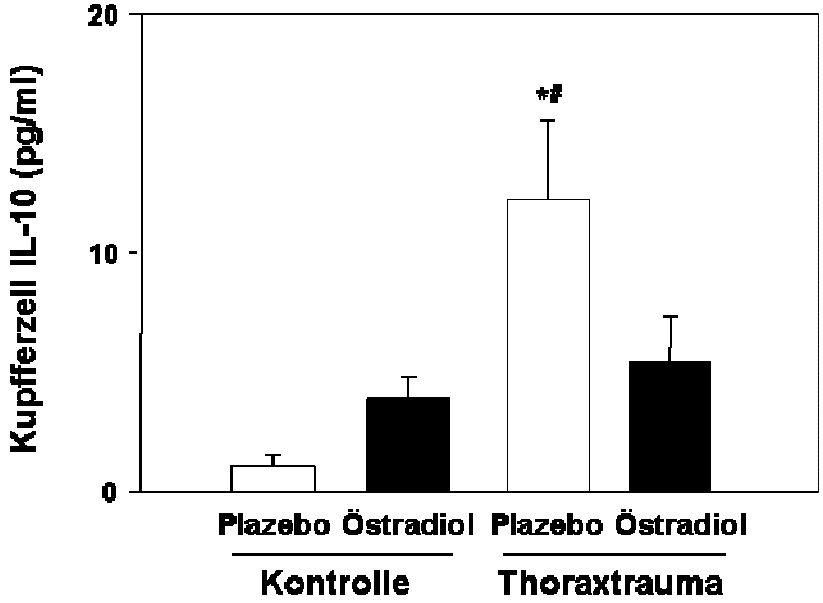


Abb. 5: IL-10-Freisetzung von Kupfferzellen 4 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollprozedur. Männliche Mäuse erhielten entweder 200 µl 17β-Östradiol (10 µg/25 g) oder Maiskeimöl als Trägersubstanz direkt nach Trauma oder Kontrolleingriff. Nach 4 Stunden wurden die Tiere getötet und die IL-10- Konzentrationen in den Kulturüberständen durch Enzyme-linked immunosorbent assay gemessen. Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardfehler. Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) gefolgt von einem post-hoc test nach Student Newman Keuls durchgeführt. *p < 0,05 vs. Kontrolle, #p < 0,05 vs. Thoraxtrauma + Östradiol, n = 9-10/Gruppe

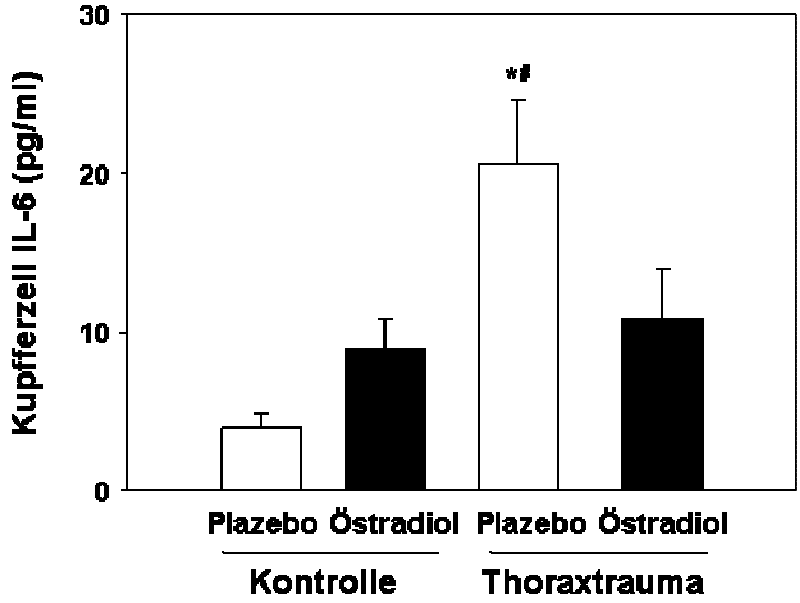


Abb. 6: IL-6-Freisetzung von Kupfferzellen 4 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollprozedur. Männliche Mäuse erhielten entweder 200 µl 17β-Östradiol (10 µg/25 g) oder Maiskeimöl als Trägersubstanz direkt nach Trauma oder Kontrolleingriff. Nach 4 Stunden wurden die Tiere getötet und die IL-6- Konzentrationen in den Kulturüberständen durch Enzyme-linked immunosorbent assay gemessen. Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardabweichung vom Mittelwert. Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) gefolgt von einem post-hoc test nach Student Newman Keuls durchgeführt. *p < 0,05 vs. Kontrolle, #p < 0,05 vs. Thoraxtrauma + Östradiol, n = 9-10/Gruppe

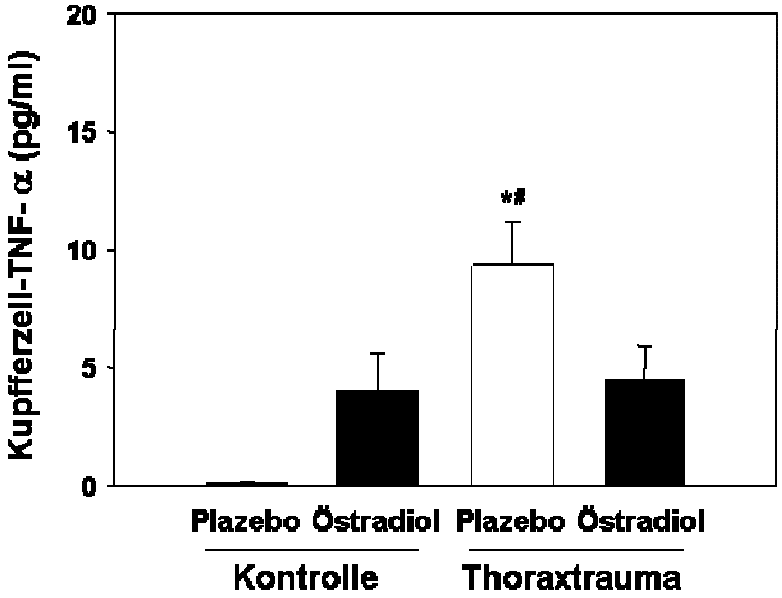


Abb. 7: Tumornekrosefaktor (TNF)-α-Freisetzung von Kupfferzellen 4 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollprozedur. Männliche Mäuse erhielten entweder 200 µl 17β-Östradiol (10 µg/25 g) oder Maiskeimöl als Trägersubstanz direkt nach Trauma oder Kontrolleingriff. Nach 4 Stunden wurden die Tiere getötet und die TNFα-Konzentrationen in den Kulturüberständen durch Enzyme-linked immunosorbent assay gemessen. Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardfehler. Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) gefolgt von einem post-hoc test nach Student Newman Keuls durchgeführt. *p < 0,05 vs. Kontrolle, #p < 0,05 vs. Thoraxtrauma + Östradiol, n = 9-10/Gruppe

3.5 Mediatorfreisetzung aus Milzmakrophagen

Die Il-10-Freisetzung aus Milzmakrophagen war signifikant erhöht bei den Tieren der Thoraxtraumagruppe, die Plazebo erhalten hatten. Nach Gabe von 17β-Östradiol konnte kein signifikanter Anstieg der Il-10-Freisetzung bei Traumatieren ermittelt werden, es zeigte sich vielmehr ein signifikant niedrigerer Anstieg als bei den Plazebotieren nach Thoraxtrauma (*Abbildung 8*).

Nach Hormongabe war die Il-6-Freisetzung aus Milzmakrophagen in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Mäusen, die weder Trauma noch Hormon erhalten hatten, erhöht. Mäuse, bei denen eine Lungenkontusion induziert wurde, zeigten einen signifikanten Unterschied der Interleukinfreisetzung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Trauma, jedoch konnte in der Traumagruppe nach Östrogengabe kein signifikanter Unterschied zur Plazebogruppe nachgewiesen werden (*Abbildung 9*).

Nach Thoraxtrauma und Verabreichung von Plazebo war die MCP-1-Konzentration im Kulturüberstand von Milzmakrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant angestiegen. Dagegen stieg die MCP-1-Konzentration nach 17β-Östradiolgabe nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (mit 17β-Östradiol) an (*Abbildung 10*).

Die Konzentration von MIP-2 aus Milzmakrophagen war bei den Thoraxtraumatieren nach Östrogengabe im Vergleich zu den Kontrolltieren, die Plazebo erhalten hatten signifikant angestiegen (*Abbildung 11*).

Auch bei Messung der TNF-α-Freisetzung aus Milzmakrophagen zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Zytokins bei den Thoraxtraumatieren nach Östrogengabe im Vergleich zu den zwei Gruppen der Kontrolltiere. Der Unterschied zwischen den mit Plazebo behandelten und den mit 17β-Östradiol behandelten Tieren erreichte in beiden Gruppen keine statistische Signifikanz (*Abbildung 12*).

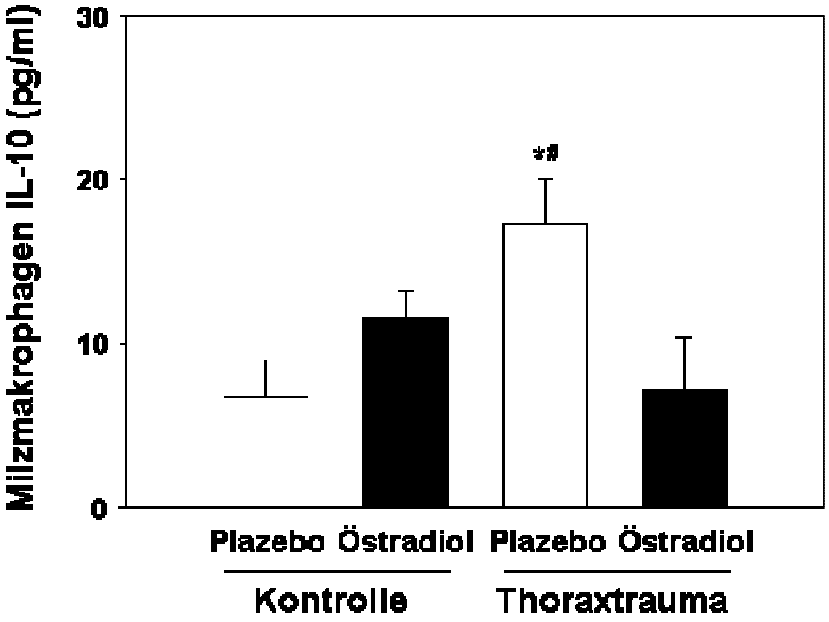


Abb. 8: IL-10-Freisetzung von Milzmakrophagen 4 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollprozedur. Männliche Mäuse erhielten entweder 200 µl 17β-Östradiol (10 µg/25 g) oder Maiskeimöl als Trägersubstanz direkt nach Trauma oder Kontrolleingriff. Nach 4 Stunden wurden die Tiere getötet und die IL-10- Konzentrationen in den Kulturüberständen durch Enzyme-linked immunosorbent assay gemessen. Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardfehler. Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) gefolgt von einem post-hoc test nach Student Newman Keuls durchgeführt. *p < 0,05 vs. Kontrolle + Plazebo, #p < 0,05 vs. Thoraxtrauma + Östradiol, n = 7-8/Gruppe

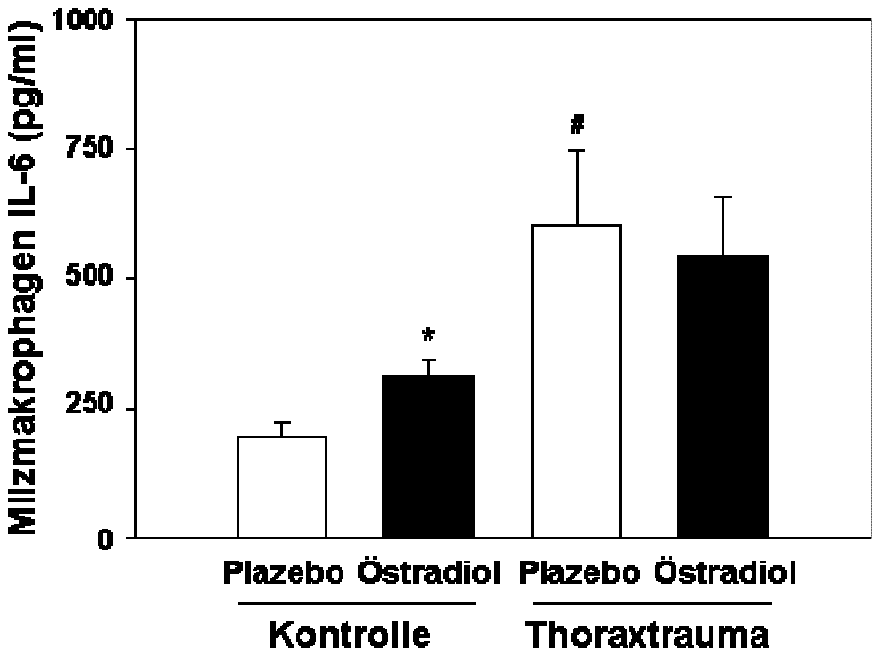


Abb. 9: IL-6-Freisetzung von Milzmakrophagen 4 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollprozedur. Männliche Mäuse erhielten entweder 200 µl 17β-Östradiol (10 µg/25 g) oder Maiskeimöl als Trägersubstanz direkt nach Trauma oder Kontrolleingriff. Nach 4 Stunden wurden die Tiere getötet und die IL-6- Konzentrationen in den Kulturüberständen durch Enzyme-linked immunosorbent assay gemessen. Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardfehler. Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) gefolgt von einem post-hoc test nach Student Newman Keuls durchgeführt. *p < 0,05 vs. Kontrolle + Östradiol, #p < 0,05 vs. Thoraxtrauma + Plazebo, n = 8/Gruppe

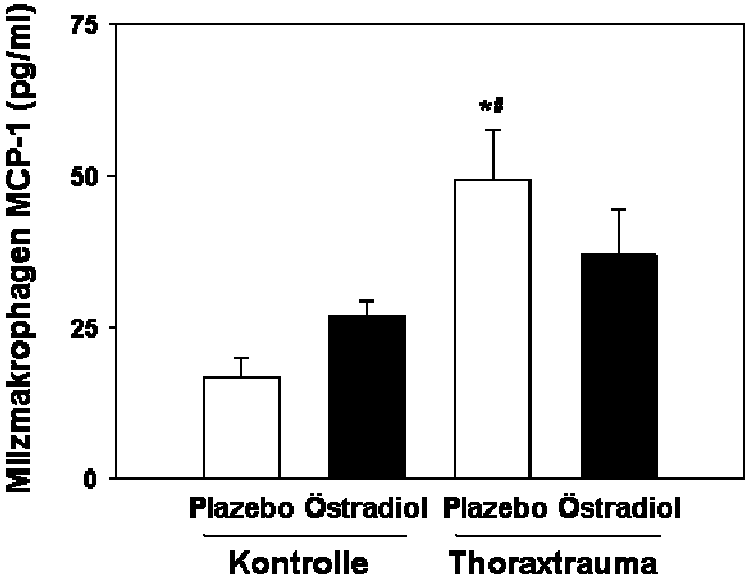


Abb. 10: Freisetzung von monocyte-chemoattractant-protein-1 (MCP-1) von Milzmakrophagen 4 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollprozedur. Männliche Mäuse erhielten entweder 200 µl 17β-Östradiol (10 µg/25 g) oder Maiskeimöl als Trägersubstanz direkt nach Trauma oder Kontrolleingriff. Nach 4 Stunden wurden die Tiere getötet und die MCP-1-Konzentrationen in den Kulturüberständen durch Enzyme-linked immunosorbent assay gemessen. Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardfehler. Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) gefolgt von einem post-hoc test nach Student Newman Keuls durchgeführt. *p < 0,05 vs. Kontrolle + Plazebo, #p < 0,05 vs. Kontrolle + Östradiol, n = 8/Gruppe

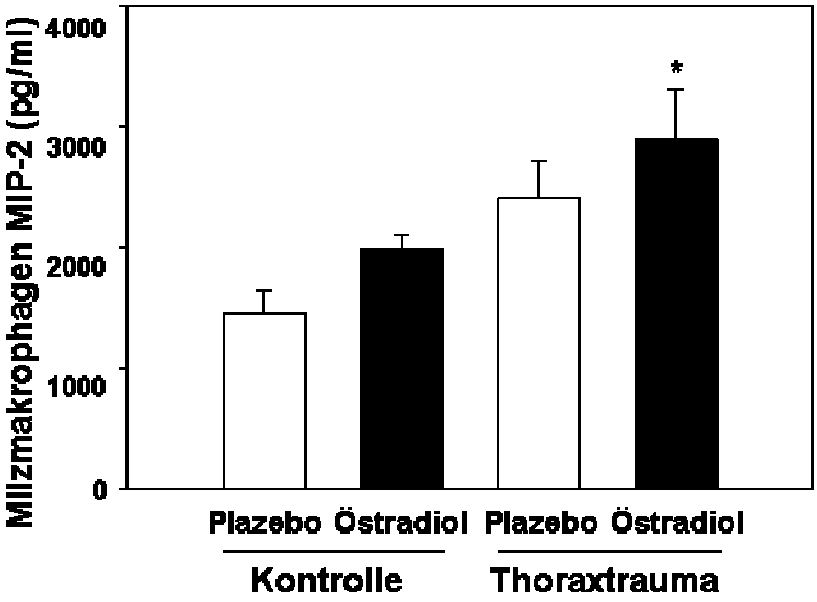


Abb. 11: Freisetzung von macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) von Milzmakrophagen 4 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollprozedur. Männliche Mäuse erhielten entweder 200 µl 17β-Östradiol (10 µg/25 g) oder Maiskeimöl als Trägersubstanz direkt nach Trauma oder Kontrolleingriff. Nach 4 Stunden wurden die Tiere getötet und die MIP-2-Konzentrationen in den Kulturüberständen durch Enzyme-linked immunosorbent assay gemessen. Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardfehler. Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) gefolgt von einem post-hoc test nach Student Newman Keuls durchgeführt. *p < 0,05 vs. Kontrolle + Plazebo, n = 7-8/Gruppe

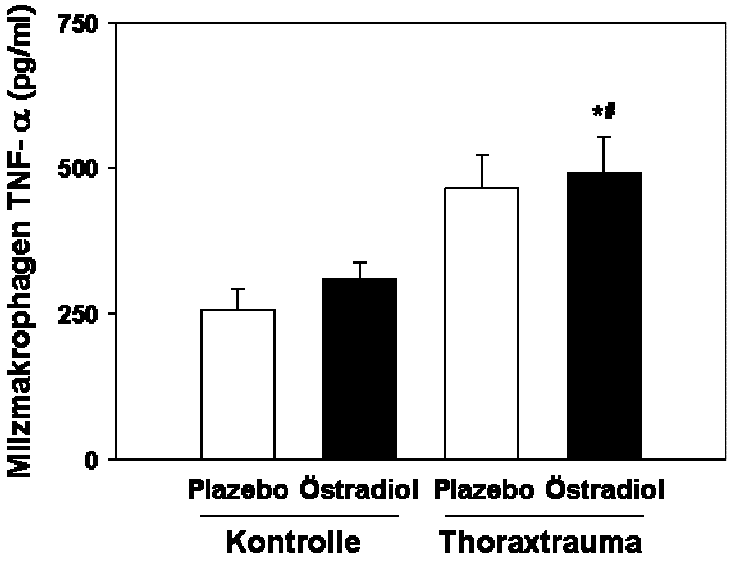


Abb. 12: Tumornekrosefaktor-(TNF)-α-Freisetzung von Milzmakrophagen 4 Stunden nach Thoraxtrauma oder Kontrollprozedur. Männliche Mäuse erhielten entweder 200 µl 17β-Östradiol (10 µg/25 g) oder Maiskeimöl als Trägersubstanz direkt nach Trauma oder Kontrolleingriff. Nach 4 Stunden wurden die Tiere getötet und die TNF–α-Konzentrationen in den Kulturüberständen durch Enzyme-linked immunosorbent assay gemessen. Ergebnisse sind Mittelwerte ± Standardfehler. Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) gefolgt von einem post-hoc test nach Student Newman Keuls durchgeführt. *p < 0,05 vs. Kontrolle + Plazebo, #p < 0,05 vs. Kontrolle + Östradiol, n = 8/Gruppe

4 Diskussion

4.1 Zielsetzung

Die Fragestellung dieser Studie war, ob das weibliche Geschlechtshormon Östrogen Einfluss auf die Entzündungsreaktion nach stumpfem Thoraxtrauma hat. Die Hypothese, dass Östrogene eine protektive Wirkung haben, wurde durch vorangegangene Studien, die sich mit der Wirkung von Östrogenen auf den traumatisch-hämorrhagischen Schock im Tiermodell befasst haben, unterstützt [5,41,43,44,51]. Die höhere Lebenserwartung von Frauen und ihre verminderte Anfälligkeit gegenüber septische Komplikationen nach Verletzungen sind in der Literatur häufig beschrieben. Für den Schutz vor Komplikationen und Mortalität in Zusammenhang mit Verletzung, Trauma und Sepsis bei Frauen wird meist das weibliche Geschlechtshormon Östrogen verantwortlich gemacht [65]. Viele Studien zeigen einen natürlichen Geschlechtsunterschied bei der Immunantwort, der auch nach traumatischen Verletzungen persistiert [27,59]. Auch werden Alter und männliches Geschlecht als Risikofaktoren für Sepsisentwicklung und multiples Organversagen nach Trauma angesehen [6,40].

Wie in der Einleitung bereits erwähnt stellt das Thoraxtrauma sowohl als Einzelverletzung als auch im Rahmen des Polytraumas eine bedeutende Verletzung dar. Allerdings sind die lokalen und systemischen inflammatorischen Auswirkungen der Lungenkontusion noch nicht hinreichend erforscht. Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit diesem Thema, vor allem in Hinblick auf Pathogenese und Therapieoptionen [24,32,49,56,71,74,74,78,87,97]. Da es sich meist um Mehrfachverletzte handelt, sind die Daten der verschiedenen Studien schwer standardisierbar und nur bedingt vergleichbar. Bei diesen Patienten wirken multiple Einflussgrößen als Störfaktoren, deshalb wurden verschiedene Tiermodelle zum stumpfen Thoraxtrauma entwickelt [7,17,18,23,28,35,37,62,66,68]. Für die hier durchgeführte Studie wurde das Thoraxtraumamodell der Maus gewählt, da für diese Spezies vielfältige immunologische Tests zur Verfügung stehen und die Daten entsprechender Untersuchungen im Modell des traumatisch-hämorrhagischen Schocks vorliegen [50]. Mit diesem Modell kann eine isolierte und bilaterale Lungenkontusion induziert werden,

wobei insbesondere extrathorakale Begleitverletzungen vermieden werden [50]. Dies wird durch die berührungsfreie Traumaeinleitung mittels Druckwelle erreicht [50,107].

4.2 Inflammatorische Parameter

Wie in der Literatur schon häufig beschrieben, spielen Zytokine eine wichtige Rolle bei systemischen Entzündungsreaktionen [26,73]. Auch beim stumpfen Thoraxtrauma nehmen sie eine entscheidende Rolle in der Immunantwort ein [48-50], da es hierbei häufig zu einer systemischen Entzündungsreaktion kommt, die sich auf die Langzeitergebnisse der Traumapatienten auswirken kann. Zum Beispiel wird TNF-α als proinflammatorisches Zytokin vor allem durch aktivierte Makrophagen ausgeschüttet [10]. In klinischen Studien zeigt sich nach schweren Verletzungen nur ein geringfügiger Anstieg, der zudem recht schnell wieder abklingt [25]. IL-6 wird unter anderem aus T-Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten, zum Teil vermittelt durch TNF-α, freigesetzt. Messungen der IL-6 Plasmakonzentrationen bei Traumapatienten ergaben schon unmittelbar nach dem Ereignis deutlich erhöhte Werte [26,93]. Darüber hinaus waren bei polytraumatisierten Patienten mit schwereren Verletzungen (ISS über 18) bereits in den ersten Messungen nach dem Unfall höhere IL-6 Plasmakonzentrationen zu beobachten als bei Patienten mit niedrigerem ISS. Die Konzentrationen stiegen bei schwerer Verletzten (ISS über 18) innerhalb der ersten 6 Stunden nach dem Trauma noch weiter an [26]. Insgesamt ließ sich somit bezüglich der IL-6 Konzentrationen nach Polytrauma eine signifikante Korrelation mit der Verletzungsschwere feststellen [26,93]. Im Hinblick auf das Thoraxtrauma wird als eine mögliche Ursache für diesen Zusammenhang das Vorliegen von präformiertem IL-6 im Lungengewebe angenommen, welches je nach Ausmaß der Gewebeschädigung freigesetzt wird [73]. Bei der Differenzierung zwischen Gruppen mit verschiedenen Verläufen wurden in diesen Studien signifikante IL-6 Konzentrationsunterschiede zwischen Patienten mit späterer Entwicklung eines posttraumatischen Multiorganversagens mit oder ohne letalem Ausgang und Patienten mit komplikationslosen Verläufen festgestellt. Die höchste Aussagekraft hatten die IL-6 Plasmakonzentrationen bei Patienten mit führendem Thoraxtrauma, gefolgt von Beckenfrakturen und Schädeltraumata [93]. Dies kann als Ausdruck der höheren IL-6

Konzentration des Lungengewebes gewertet werden [73] und unterstreicht die Rolle des Thoraxtraumas hinsichtlich systemischer entzündlicher Reaktionen.

Die Wirkung von Östrogenen auf das Immunsystem nach hämorrhagischem Schock wurde in der Literatur bereits ausführlich beschrieben. Es wurde anhand von Tiermodellen nachgewiesen, dass es kurz nach traumatisch-hämorrhagischem Schock zu einer deutlichen Immunsuppression kommt und diese die Sterblichkeit an einer nachfolgenden Sepsis erhöht [5,41,43,44,51]. Studien von Knöferl und Mitarbeitern zeigten, dass eine einzige Gabe von 17β-Östradiol nach traumatisch-hämorrhagischem Schock bei männlichen Mäusen verschiedene Immunparamter verbessern konnte und zirkulierende IL-6-Konzentrationen abfallen ließ [45]. Die Wirkung von Östrogenen wurde von Knöferl et al. auch auf die durch Hypoxie induzierte Immundysfunktion bei Mäusen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Östradiolgabe vor Hypoxämie der Depression von zellvermittelten Immunfunktionen vorbeugen kann [51]. Das stumpfe isolierte Lungentrauma wurde bisher noch nicht auf protektive Effekte von Östrogen untersucht. Um der Fragestellung nach der Rolle des Östrogens bei der Lungenkontusion nachzugehen, wurden daher in der vorliegenden Arbeit folgende Parameter gemessen und ausgewertet:

4 Stunden nach Gabe von 17β-Östradiol wurden vergleichend die 17β-Östrogenkonzentrationen der Traumatiere und der Kontrolltiere gemessen. Die hier verwendete Dosierung von 17β-Östradiol wurde unter Berücksichtigung vorhergegangener Studie von Knöferl et al. gewählt [51]. Hierbei zeigte sich, dass die Östrogenplasmakonzentrationen der mit Östrogen behandelten Tiere signifikant erhöht waren im Vergleich zu den Plazebo behandelten Tieren. Dies spricht für die Effektivität der Verabreichung. Die Östrogenplasmaspiegel waren außerdem deutlich höher als die Hormonspiegel, die normalerweise in weiblichen Tieren zu finden sind, es handelt sich somit um therapeutische Konzentrationen [51].

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die IL-6 Konzentrationen in der BAL nach Trauma beziehungsweise hämorrhagischen Schock bei Versuchstieren zunehmen [58]. In der vorliegenden Studie fand sich ebenfalls, dass die IL-6 Konzentration in der BAL nach Thoraxtrauma deutlich anstieg, wohingegen bei Tieren nach Östrogengabe dieser Anstieg nicht festgestellt werden konnte.

Bei der Messung der IL-6 Konzentrationen im Plasma konnte gezeigt werden, dass diese nach stumpfem Thoraxtrauma stark anstiegen. Auch hier wurde der Anstieg durch Östrogengabe signifikant vermindert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den bisherigen Studien, in denen gezeigt wurde, dass IL-6 nach Trauma als Zeichen der systemischen Entzündungsreaktion deutlich ansteigt [4,64,93]. Auch hier scheint also die Gabe von Östrogen einen positiven Einfluss auf die inflammatorische Reaktion zu haben. Beim Vergleich der oben genannten Ergebnisse für die IL-6 Konzentrationen im Plasma und in der bronchoalveolären Lavage kann auch die These der Studie von Perl et al. [73] erhärtet werden. Dieser Autor stellte fest, dass es im Rahmen eines Thoraxtraumas zu einer Schrankenstörung der Lunge kommt, wodurch Mediatoren in die Lunge übertreten und umgekehrt.

Des Weiteren wurde die Myeloperoxidaseaktivität in der Lunge gemessen. Diese steht als Maß für die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, da diese das Enzym bei Phagozytoseaktivität sezernieren [85]. Nach Thoraxtrauma kommt es zu einem Anstieg der MPO in der Lunge. Nach Östrogengabe fällt der Anstieg der MPO bei Traumatieren signifikant geringer aus, was verdeutlicht, dass Östradiol auch hier Einfluss auf die inflammatorische Aktivität hat. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, das Östrogen auch auf das bronchoalveoläre chemotaktische Milieu positive Effekte hat.

Auch auf die Kupfferzellen hat Östrogen immunmodulatorische Eigenschaften [41,43]. Aus Studien zum hämorrhagischen Schock ist bekannt, dass Kupfferzellen an der systemischen Inflammation beteiligt sind [3,9,49,71]. Die Messergebnisse der Freisetzung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 aus Kupfferzellen zeigen, dass die Konzentrationen nach Thoraxtrauma deutlich erhöht waren im Vergleich zu den Tieren nach Östrogengabe. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit vorangegangenen Studien [10,79].

Ein fast identisches Ergebnis zu den vorangegangenen Messungen ergab sich bei den IL-6 Konzentrationen aus Kupfferzellen. Auch hier waren die Konzentrationen nach Thoraxtrauma signifikant erhöht. Nach Gabe von Östrogen war der Anstieg im Vergleich deutlich abgeschwächt. Interessanterweise stieg die IL-6 Konzentration auch bei den Kontrolltieren nach Östrogengabe. Dieser unterschiedliche Verlauf der Zytokinkonzentrationen im Vergleich zum oben genannten Plasma ließe sich eventuell mit dem Zeitpunkt der Messungen erklären. So wurde beispielsweise in der Studie von

Ayala nachgewiesen, dass Mediatoren aus Kupfferzellen nach Trauma sehr schnell ins Plasma abgegeben werden und daher sehr schnell nachgewiesen werden können [9,10].

Auch die TNFα-Konzentrationen von Kupfferzellen zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die Il-6-Konzentration, nur fiel der Anstieg insgesamt etwas geringer aus. Die Tiere, die Östrogen erhalten hatten zeigten nach 4 Stunden sehr ähnliche TNFα-Konzentrationen, diese stiegen also nach Thoraxtrauma kaum an. Dagegen stiegen die TNFα–Konzentrationen der Tiere ohne Östrogengabe nach Thoraxtrauma signifikant an im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dadurch lässt sich auch in diesem Fall zeigen, dass Östrogen einen antiinflammatorischen Effekt auf die immunmodulatorische Zytokinausschüttung im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion hat. Wie oben bereits erwähnt, entspricht dies auch vorangegangenen Studien in der Literatur [38,43,88].

Des Weiteren wurde die Zytokinfreisetzung von Milzmakrophagen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Effekte der Lungenkontusion auf die Zytokinfreisetzung nicht eindeutig erkennbar waren. Das ließe sich mit dem frühen Zeitpunkt der Zytokinmessung von 4 Stunden nach Trauma erklären, da nachgewiesen wurde, dass die Reaktion von Milzzellen auf ein Trauma erst später einsetzt [48,106]. Es zeigte sich bei den IL-10 Konzentrationen aus Milzmakrophagen ein signifikanter Anstieg nach Thoraxtrauma, bei östrogenbehandelten Tieren wird dies nicht beobachtet. Diese Ergebnis deckt sich mit den Erkenntnissen, die in Bezug auf die Kupfferzell-Sekretion gemacht wurden. Auch hier wurde eine verminderte IL-10-Freisetzung nach Östrogengabe bei Traumatieren beobachtet. Da IL-10 ein antiinflammatorisches Zytokin ist, kann es sein, dass die hohe Freisetzung an einer Immunsuppression beteiligt ist, die schädigend auf Folgen des Thoraxtraumas wirkt. In diesem Fall würde Östrogen wieder modulierend wirken, das heißt den Zytokinanstieg abschwächen und somit einen positiven Effekt auf die Immunreaktion haben. Bei der IL-6 Freisetzung aus Milzmakrophagen sowie bei der MCP-1 Freisetzung zeigten sich ähnliche Effekte wie bei der IL-10 Freisetzung. Nach Trauma stiegen die Zytokinkonzentrationen deutlich an. Die Östrogengabe verminderte den Anstieg zwar, allerdings nicht in signifikantem Maß. Das lässt darauf schließen, dass es hier zwar auch eine Wirkung von Östrogen gab, aber der frühe Zeitpunkt der Messung weitergehende Effekte möglicherweise nicht erkennen lässt. Dies lässt sich aus vorangegangenen Studien ableiten, in denen gezeigt wurde, dass sich der Einfluss einer Lungenkontusion auf Zytokinkonzentrationen der Milzmakrophagen erst zwischen zwei

und 24 Stunden zeigt [72]. Diese Aussage entspricht der Studie von Knöferl et al., der zufolge ein Thoraxtrauma zwar eine deutliche Immundysfunktion von Milzlymphozyten und –makrophagen nach sich zieht, diese anhand von Zytokinausschüttung jedoch erst deutlich später nachweisbar wird [48]. Bei der Ermittlung der MIP-2 Konzentrationen und der TNF-α-Freisetzung aus Milzmakrophagen zeigte sich zum Zeitpunkt der Messung kein signifikanter Unterschied zwischen Tieren, die Plazebo erhalten hatten und solchen, denen Östrogen verabreicht wurde. Bei beiden stiegen die Konzentrationen nach Thoraxtrauma im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht an, aber nicht in signifikantem Ausmaß.

4.3 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend zeigte sich, dass es signifikante Unterschiede nach Östrogengabe bei der Mediatorensezernierung der Versuchstiere aus verschiedenen Körperzellen nach stumpfem Thoraxtrauma gibt. Bei manchen Zellsystemen wie den Milzmakrophagen konnte kein deutlicher Anstieg oder Abfall der Zytokinkonzentrationen gemessen werden, was aber eventuell mit dem zu frühen Zeitpunkt der Messung in Bezug auf dieses Zellsystem zusammenhängen könnte. Durch die Östrogengabe wurde bei den Versuchstieren die Freisetzung von einigen Mediatoren jedoch deutlich herabgesetzt. Vor allem bei Interleukin-6, welches ein wissenschaftlich anerkannter Parameter zur Einschätzung entzündlicher und systemischen Infektionsreaktionen ist, konnten signifikante Veränderungen nach Östrogengabe nachgewiesen werden. Durch das Östrogen wurde der Anstieg vieler Zytokinkonzentrationen gemindert, was darauf schließen lässt, dass auch beim stumpfen isolierten Thoraxtrauma Östrogene in gewissem Ausmaß eine protektive Wirkung haben können.

5 Zusammenfassung

Das Polytrauma gehört nach wie vor zu den häufigsten Verletzungsmustern bei Verkehrsunfällen und geht häufig einher mit schweren Schädelverletzungen, sowie hämorrhagischem Schock und/oder Thoraxtrauma. Durch verschiedene Studien hat sich gezeigt, dass hämorrhagischer Schock und Thoraxtrauma zur vermehrten Freisetzung von immunmodulatorischen Mediatoren führen können. Diese können im weiteren Verlauf zu einer systemischen Entzündungsreaktion führen und schließlich Sepsis und Multiorganversagen hervorrufen. Damit hat die Art und Intensität dieser Mediatorfreisetzung einen starken Einfluss auf die Langzeitergebnisse von Verletzten. Desweiteren wurde festgestellt, dass es einen Unterschied zwischen den Langzeitergebnissen von schwer verletzten männlichen gegenüber weiblichen Patienten gibt. Studien zum hämorrhagischen Schock konnten zeigen, dass Östrogene bei der Entwicklung einer Entzündungsreaktion eine protektive Rolle spielen, indem sie die Entzündungsreaktion vermindern. Daher ergab sich die Hypothese, dass Östrogene ebenfalls auf die inflammatorische Reaktion nach stumpfen Thoraxtrauma eine protektive Wirkung haben können. Das Ziel dieser Studie war es zu ermitteln, ob Östrogene auch beim isolierten stumpfen Thoraxtrauma eine Bedeutung spielen. Dazu wurde männlichen Mäusen in Vollnarkose ein Thoraxtrauma mit Hilfe eines etablierten Druckwellengenerators zugefügt und anschließend eine einmalige Dosis 17β-Östradiol injiziert. Die Dosierung war deutlich höher als bei weiblichen Mäusen, es handelte sich also um eine therapeutische Dosierung. Nach 4 Stunden Beobachtungszeit wurden die Mäuse getötet und verschiedene Organe wie Milz, Lunge und Leber entnommen, Zellen isoliert und die Mediatorkonzentrationen gemessen. Diese Werte wurden anschließend mit denen von Mäusen verglichen, die kein Trauma erhalten hatten, beziehungsweise die kein Östrogen erhalten hatten. Dabei konnte gezeigt werden, dass die gemessenen Zytokin- und Interleukinkonzentrationen der verschiedenen Zellen nach Plazebogabe und Traumatisierung meist signifikant erhöht waren, während bei vielen Tieren, die Östrogen erhalten hatten, die Konzentrationen signifikant niedriger waren. Diese Ergebnisse entsprechen denen der Literatur beim hämorrhagischen Schock. Fast alle Mediatorfreisetzungen waren nach Östrogengabe signifikant vermindert. Allein bei

Freisetzungen aus Milzmakrophagen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, was aber auf den frühen Zeitpunkt der Messung nach Trauma zurückzuführen sein kann. Durch diese Studie konnte die These untermauert werden, dass Östrogene die Freisetzung von immunmodulatorischen Mediatoren bei systemischer Inflammation nach Traumen eindämmen und somit möglicherweise eine protektive Wirkung auch beim isolierten stumpfen Thoraxtrauma aufweisen können. Nachdem diese Einmalgabe von Östrogenen bei männlichen Mäusen einen Rückgang beziehungsweise eine Abschwächung der entzündlichen Reaktion verschiedener Zellsysteme zur Folge hatte, ergibt sich unter Berücksichtigung der entsprechenden Literatur die Schlussfolgerung, dass Hormone mit Eigenschaften von Östrogenen eventuell als neue therapeutische Mittel zur Wiederherstellung oder Unterstützung der Immunantwort bei Traumapatienten herangezogen werden können. Trotz dieser Erkenntnisse und vieler Studien zu den inflammatorischen Auswirkungen des Thoraxtraumas, sowie damit verbundenen Therapieansätzen, sind weitere Studien in dieser Richtung von Nöten.

6 Literaturverzeichnis

1. Ananthakrishnan P, Cohen DB, Xu DZ, Lu Q, Feketeova E, and Deitch EA: Sex hormones modulate distant organ injury in both a trauma/hemorrhagic shock model and a burn model. Surgery 2005, 137: 56-65

2. Angele MK, Frantz MC, and Chaudry IH: Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches. Clinics (Sao Paulo) 2006, 61: 479-488

3. Angele MK, Knöferl MW, Ayala A, Albina JE, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH: Trauma-hemorrhage delays wound healing potentially by increasing pro-inflammatory cytokines at the wound site. Surgery 1999, 126: 279-285

4. Angele MK, Knöferl MW, Schwacha MG, Ayala A, Bland KI, Cioffi WG, Josephson SL, and Chaudry IH: Hemorrhage decreases macrophage inflammatory protein 2 and interleukin-6 release: a possible mechanism for increased wound infection. Ann Surg 1999, 229: 651-660

5. Angele, M. K., Knöferl, M. W., Schwacha, M. G., Ayala, A., Cioffi, W. G., Bland, K. I., and Chaudry, I. H. Sex steroids regulate pro- and anti-inflammatory cytokine release by macrophages after trauma-hemorrhage. Am.J.Physiol 277[1 Pt 1], C35-C42. 1999.

6. Angele MK, Schwacha MG, Ayala A, and Chaudry IH: Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock. Shock 2000, 14: 81-90

7. Axelsson H, Hjelmqvist H, Medin A, Persson JK, and Suneson A: Physiological changes in pigs exposed to a blast wave from a detonating high-explosive charge. Mil Med 2000, 165: 119-126

8. Ayala A, Ertel W, and Chaudry IH: Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. Shock 1996, 5: 79-90

9. Ayala A, O'Neill PJ, Uebele SA, Herdon CD, and Chaudry IH: Mechanism of splenic immunosuppression during sepsis: key role of Kupffer cell mediators. J Trauma 1997, 42: 882-888

10. Ayala A, Perrin MM, Ertel W, and Chaudry IH: Differential effects of hemorrhage on Kupffer cells: decreased antigen presentation despite increased inflammatory cytokine (IL-1, IL-6 and TNF) release. Cytokine 1992, 4: 66-75

11. Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, and Nast-Kolb D: [Epidemiology of the severely injured patient. A prospective assessment of preclinical and clinical management. AG Polytrauma of DGU]. Unfallchirurg 2000, 103: 355-363

12. Carter JJ and Whelan RL: The immunologic consequences of laparoscopy in oncology. Surg Oncol Clin N Am 2001, 10: 655-677

13. Caruso JM, Xu DZ, Lu Q, Dayal SD, and Deitch EA: The female gender protects against pulmonary injury after trauma hemorrhagic shock. Surg Infect (Larchmt) 2001, 2: 231-240

14. Champion HR, Copes WS, Sacco WJ, Lawnick MM, Keast SL, Bain LW, Jr., Flanagan ME, and Frey CF: The Major Trauma Outcome Study: establishing national norms for trauma care. J Trauma 1990, 30: 1356-1365

15. Chaudry IH, Ayala A, Ertel W, and Stephan RN: Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects. Am J Physiol 1990, 259: R663-R678

16. Choudhry MA, Schwacha MG, Hubbard WJ, Kerby JD, Rue LW, Bland KI, and Chaudry IH: Gender differences in acute response to trauma-hemorrhage. Shock 2005, 24 Suppl 1: 101-106

17. Damon EG, Gaylord CS, Yelverton JT, Richmond DR, Bowen IG, Jones RK, and White CS: Effects of ambient pressure on tolerance of mammals to air blast. Aerosp Med 1968, 39: 1039-1047

18. Dancewicz R, Barcikowski S, Ceder A, and Nowak H: [Lung injuries caused by explosion in rabbits. 1. The experimental model of the injury]. Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe 1988, 21: 85-90

19. Dancewicz R, Barcikowski S, Zielinski KW, Kulig A, and Sygut J: [Lung injuries caused by explosion in rabbits. 2. Pathogenetic mechanisms in lung injury (a hypothesis)]. Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe 1988, 21: 91-99

20. Davis KA, Fabian TC, Croce MA, and Proctor KG: Prostanoids: early mediators in the secondary injury that develops after unilateral pulmonary contusion. J Trauma 1999, 46: 824-831

21. Diodato MD, Knoferl MW, Schwacha MG, Bland KI, and Chaudry IH: Gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis. Cytokine 2001, 14: 162-169

22. Filardo EJ and Thomas P: GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. Trends Endocrinol Metab 2005, 16: 362-367

23. Fricke R and Bartel M: [Animal experimental model of lung contusion]. Z Exp Chir 1982, 15: 172-176

24. Gaillard M, Herve C, Mandin L, and Raynaud P: Mortality prognostic factors in chest injury. J Trauma 1990, 30: 93-96

25. Gebhard F, Kaffenberger W, and Hartel W: Peripheral blood immune responses to surgically induced lung tissue injury. Eur Surg Res 1994, 26: 156-162

26. Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, Strecker W, Kinzl L, and Brückner UB: Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? Arch Surg 2000, 135: 291-295

27. Gregory MS, Duffner LA, Faunce DE, and Kovacs EJ: Estrogen mediates the sex difference in post-burn immunosuppression. J Endocrinol 2000, 164: 129-138

28. Guy RJ, Kirkman E, Watkins PE, and Cooper GJ: Physiologic responses to primary blast. J Trauma 1998, 45: 983-987

29. Hammes SR and Levin ER: Extranuclear steroid receptors: nature and actions. Endocr Rev 2007, 28: 726-741

30. Harbrecht BG, Doyle HR, Clancy KD, Townsend RN, Billiar TR, and Peitzman AB: The impact of liver dysfunction on outcome in patients with multiple injuries. Am Surg 2001, 67: 122-126

31. Hellinger A, Konerding MA, Malkusch W, Obertacke U, Redl H, Bruch J, and Schlag G: Does lung contusion affect both the traumatized and the noninjured lung parenchyma? A morphological and morphometric study in the pig. J Trauma 1995, 39: 712-719

32. Hoff SJ, Shotts SD, Eddy VA, and Morris JA, Jr.: Outcome of isolated pulmonary contusion in blunt trauma patients. Am Surg 1994, 60: 138-142

33. Inthorn D and Huf R: [Thoracic trauma in multiple trauma]. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 1992, 27: 498-501

34. Irwin RJ, Lerner MR, Bealer JF, Brackett DJ, and Tuggle DW: Cardiopulmonary physiology of primary blast injury. J Trauma 1997, 43: 650-655

35. Irwin RJ, Lerner MR, Bealer JF, Lightfoot SA, Brackett DJ, and Tuggle DW: Global primary blast injury: a rat model. J Okla State Med Assoc 1998, 91: 387-392

36. Jacob J, Sebastian KS, Devassy S, Priyadarsini L, Farook MF, Shameem A, Mathew D, Sreeja S, and Thampan RV: Membrane estrogen receptors: genomic actions and post transcriptional regulation. Mol Cell Endocrinol 2006, 246: 34-41

37. Jaffin JH, McKinney L, Kinney RC, Cunningham JA, Moritz DM, Kraimer JM, Graeber GM, Moe JB, Salander JM, and Harmon JW: A laboratory model for studying blast overpressure injury. J Trauma 1987, 27: 349-356

38. Jarrar D, Wang P, Knoferl MW, Kuebler JF, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH: Insight into the mechanism by which estradiol improves organ functions after trauma-hemorrhage. Surgery 2000, 128: 246-252

39. Kawasaki T, Fujimi S, Lederer JA, Hubbard WJ, Choudhry MA, Schwacha MG, Bland KI, and Chaudry IH: Trauma-hemorrhage induces depressed splenic dendritic cell functions in mice. J Immunol 2006, 177: 4514-4520

40. Kher A, Wang M, Tsai BM, Pitcher JM, Greenbaum ES, Nagy RD, Patel KM, Wairiuko GM, Markel TA, and Meldrum DR: Sex differences in the myocardial inflammatory response to acute injury. Shock 2005, 23: 1-10

41. Knöferl MW, Angele MK, Catania RA, Diodato MD, Bland KI, and Chaudry IH: Immunomodulatory effects of dehydroepiandrosterone in proestrus female mice after trauma-hemorrhage. J Appl Physiol 2003, 95: 529-535

42. Knöferl MW, Angele MK, Diodato MD, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH: Female sex hormones regulate macrophage function after trauma-hemorrhage and prevent increased death rate from subsequent sepsis. Ann Surg 2002, 235: 105-112

43. Knöferl MW, Angele MK, Schwacha MG, Anantha Samy TS, Bland KI, and Chaudry IH: Immunoprotection in proestrus females following trauma-hemorrhage: the pivotal role of estrogen receptors. Cell Immunol 2003, 222: 27-34

44. Knöferl MW, Angele MK, Schwacha MG, Bland KI, and Chaudry IH: Preservation of splenic immune functions by female sex hormones after trauma-hemorrhage. Crit Care Med 2002, 30: 888-893

45. Knöferl MW, Diodato MD, Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH: Do female sex steroids adversely or beneficially affect the depressed immune responses in males after trauma-hemorrhage? Arch Surg 2000, 135: 425-433

46. Knöferl MW, Diodato MD, Schwacha MG, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH: Cyclooxygenase-2-mediated regulation of Kupffer cell interleukin-6 production following trauma-hemorrhage and subsequent sepsis. Shock 2001, 16: 479-483

47. Knöferl MW, Jarrar D, Angele MK, Ayala A, Schwacha MG, Bland KI, and Chaudry IH: 17 beta-Estradiol normalizes immune responses in ovariectomized females after trauma-hemorrhage. Am J Physiol Cell Physiol 2001, 281: C1131-C1138

48. Knöferl MW, Liener UC, Perl M, Brückner UB, Kinzl L, and Gebhard F: Blunt chest trauma induces delayed splenic immunosuppression. Shock 2004, 22: 51-56

49. Knöferl MW, Liener UC, Seitz D, Brückner UB, Kinzl L, and Gebhard F: Cardiopulmonary and inflammatory alterations following lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. Shock 2002, 17 (suppl): 6

50. Knöferl MW, Liener UC, Seitz DH, Perl M, Brückner UB, Kinzl L, and Gebhard F: Cardiopulmonary, histological, and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. Shock 2003, 19: 519-525

51. Knöferl MW, Schwacha MG, Jarrar D, Angele MK, Fragoza K, Bland KI, and Chaudry IH: Estrogen pretreatment protects males against hypoxia-induced immune depression. Am J Physiol Cell Physiol 2002, 282: C1087-C1092

52. Krzych U, Strausser HR, Bressler JP, and Goldstein AL: Effects of sex hormones on some T and B cell functions, evidenced by differential immune expression between male and female mice and cyclic pattern of immune responsiveness during the estrous cycle in female mice. Am J Reprod Immunol 1981, 1: 73-77

53. Krzych U, Strausser HR, Bressler JP, and Goldstein AL: Quantitative differences in immune responses during the various stages of the estrous cycle in female BALB/c mice. J Immunol 1978, 121: 1603-1605

54. Kuner EH, Gabelmann M, and Schlickewei W: [Bicycle accidents--causes and sequelae. An evaluation of the 1986 calendar year]. Unfallchirurgie 1990, 16: 25-34

55. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, and Kobayashi Y: Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. J Immunol 2003, 171: 4672-4679

56. Liener UC, Huber-Lang M Knöferl MW Kurz M Brückner B Kinzl L Gebhard F. Does blunt chest trauma alter the function of alveolar macrophages? Shock 18[suppl.], 16. 2002.

57. Marina-Martinez L, Sanchez-Casado M, Hortiguela-Martin V, Taberna-Izquierdo MA, Raigal-Cano A, Pedrosa-Guerrero A, Quintana-Diaz M, and Rodriguez-Villa S: [<<RETRATO>> (trauma registery of Toledo): General view and mortality.]. Med Intensiva 2010,

58. Meng ZH, Dyer K, Billiar TR, and Tweardy DJ: Distinct effects of systemic infusion of G-CSF vs. IL-6 on lung and liver inflammation and injury in hemorrhagic shock. Shock 2000, 14: 41-48

59. Messingham KA, Heinrich SA, and Kovacs EJ: Estrogen restores cellular immunity in injured male mice via suppression of interleukin-6 production. J Leukoc Biol 2001, 70: 887-895

60. Mizushima Y, Wang P, Jarrar D, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH: Estradiol administration after trauma-hemorrhage improves cardiovascular and hepatocellular functions in male animals. Ann Surg 2000, 232: 673-679

61. Moore FA, Sauaia A, Moore EE, Haenel JB, Burch JM, and Lezotte DC: Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. J Trauma 1996, 40: 501-510

62. Moseley RV, Vernick JJ, and Doty DB: Response to blunt chest injury: a new experimental model. J Trauma 1970, 10: 673-683

63. Nast-Kolb D, Waydhas C, Gippner-Steppert C, Schneider I, Trupka A, Ruchholtz S, Zettl R, Schweiberer L, and Jochum M: Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ failure in patients with multiple injuries. J Trauma 1997, 42: 446-454

64. O'Neill PJ, Ayala A, Wang P, Ba ZF, Morrison MH, Schultze AE, Reich SS, and Chaudry IH: Role of Kupffer cells in interleukin-6 release following trauma-hemorrhage and resuscitation. Shock 1994, 1: 43-47

65. Oberholzer A, Keel M, Zellweger R, Steckholzer U, Trentz O, and Ertel W: Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. J Trauma 2000, 48: 932-937

66. Obertacke U, Neudeck F, Majetschak M, Hellinger A, Kleinschmidt C, Schade FU, Hogasen K, Jochum M, Strohmeier W, Thurnher M, Redl H, and Schlag G: Local and systemic reactions after lung contusion: an experimental study in the pig. Shock 1998, 10: 7-12

67. Obertacke U, Redl H, Schlag G, and Schmit-Neuerburg KP: Lokale und systemische Reaktionen nach Lungenkontsion. Hefte zu Der Unfallchirurg 1994, 240:

68. Oppenheimer L, Craven KD, Forkert L, and Wood LD: Pathophysiology of pulmonary contusion in dogs. J Appl Physiol 1979, 47: 718-728

69. Ordemann J, Jacobi CA, Schwenk W, Stosslein R, and Muller JM: Cellular and humoral inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections. Surg Endosc 2001, 15: 600-608

70. Pape HC, Auf'm'Kolk M, Paffrath T, Regel G, Sturm JA, and Tscherne H: Primary intramedullary femur fixation in multiple trauma patients with associated lung contusion--a cause of posttraumatic ARDS? J Trauma 1993, 34: 540-547

71. Perl M, Gebhard F, Braumüller S, Tauchmann B, Brückner UB, Kinzl L, and Knöferl MW: The pulmonary and hepatic immune microenvironment and its contribution to the early systemic inflammation following blunt chest trauma. Crit Care Med 2006, 34: 1152-1159

72. Perl M, Gebhard F, Brückner UB, Ayala A, Braumüller S, Büttner C, Kinzl L, and Knöferl MW: Pulmonary contusion causes impairment of macrophage and lymphocyte immune functions and increases mortality associated with a subsequent septic challenge. Crit Care Med 2005, 33: 1351-1358

73. Perl M, Gebhard F, Knoferl MW, Bachem M, Gross HJ, Kinzl L, and Strecker W: The pattern of preformed cytokines in tissues frequently affected by blunt trauma. Shock 2003, 19: 299-304

74. Perl M, Kieninger M, Huber-Lang MS, Gross HJ, Bachem MG, Braumuller S, Gebhard F, Ayala A, and Knoferl MW: Divergent effects of activated neutrophils on inflammation, Kupffer cell/splenocyte activation, and lung injury following blunt chest trauma. Shock 2012, 37: 210-218

75. Pinilla JC: Acute respiratory failure in severe blunt chest trauma. J Trauma 1982, 22: 221-226

76. Pitcher JM, Wang M, Tsai BM, Kher A, Turrentine MW, Brown JW, and Meldrum DR: Preconditioning: gender effects. J Surg Res 2005, 129: 202-220

77. Purcell EM, Dolan SM, Kriynovich S, Mannick JA, and Lederer JA: Burn injury induces an early activation response by lymph node CD4+ T cells. Shock 2006, 25: 135-140

78. Raghavendran K, Davidson BA, Woytash JA, Helinski JD, Marschke CJ, Manderscheid PA, Notter RH, and Knight PR: The evolution of isolated bilateral lung contusion from blunt chest trauma in rats: cellular and cytokine responses. Shock 2005, 24: 132-138

79. Raju R, Bland KI, and Chaudry IH: Estrogen: a novel therapeutic adjunct for the treatment of trauma-hemorrhage-induced immunological alterations. Mol Med 2008, 14: 213-221

80. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, and Prossnitz ER: A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. Science 2005, 307: 1625-1630

81. Schlag G and Redl H: Morphology of the microvascular system in shock: lung, liver, and skeletal muscles. Crit Care Med 1985, 13: 1045-1049

82. Schlag G, Redl H, Buchinger W, and Dinges HP: Pathophysiologie der Lungenkontusion. Hefte zur Unfallheilkunde 1992, 233: 13-17

83. Schmand JF, Ayala A, and Chaudry IH: Effects of trauma, duration of hypotension, and resuscitation regimen on cellular immunity after hemorrhagic shock. Crit Care Med 1994, 22: 1076-1083

84. Seitz, D. H., Niesler, U., Palmer, A., Sulger, M., Gebhard, F., and Knöferl, M. W. Increased monocyte chemotactic response following blunt chest trauma: Role of macrophage derived mediators. Shock 32[Suppl.1], 19. 2009.

85. Seitz, D. H., Perl, M., Bachem, M. G., Braumüller, S. T., Huber-Lang, M. S., and Knöferl, M. W. Alveolar macrophages induce apoptosis in alveolar type 2 epithelial cells after blunt chest trauma. Shock 23[Supplement 3], 33. 2005.

86. Shelley O, Murphy T, Paterson H, Mannick JA, and Lederer JA: Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury. Shock 2003, 20: 123-129

87. Shorr RM, Crittenden M, Indeck M, Hartunian SL, and Rodriguez A: Blunt thoracic trauma. Analysis of 515 patients. Ann Surg 1987, 206: 200-205

88. Sperry JL, Friese RS, Frankel HL, West MA, Cuschieri J, Moore EE, Harbrecht BG, Peitzman AB, Billiar TR, Maier RV, Remick DG, and Minei JP: Male gender is

associated with excessive IL-6 expression following severe injury. J Trauma 2008, 64: 572-578

89. Sperry JL and Minei JP: Gender dimorphism following injury: making the connection from bench to bedside. J Leukoc Biol 2008, 83: 499-506

90. Statistisches Bundesamt. Gesundheitsbericht für Deutschland. 280-285. 1998. Metzler Poeschel.

Ref Type: Generic

91. Stellin G: Survival in trauma victims with pulmonary contusion. Am Surg 1991, 57: 780-784

92. Stephan RN, Kupper TS, Geha AS, Baue AE, and Chaudry IH: Hemorrhage without tissue trauma produces immunosuppression and enhances susceptibility to sepsis. Arch Surg 1987, 122: 62-68

93. Strecker W, Gebhard F, Rager J, Steinbach G, Ring C, Perl M, Kinzl L, and Beck A: Interleukin-6 (IL-6) - an early marker of chest trauma. Eur J Trauma 2002, 28: 75-84

94. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, and Fujikura T: Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. Anal Biochem 1983, 132: 345-352

95. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, and Dong J: Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. Endocrinology 2005, 146: 624-632

96. Thorley AJ, Ford PA, Giembycz MA, Goldstraw P, Young A, and Tetley TD: Differential Regulation of Cytokine Release and Leukocyte Migration by Lipopolysaccharide-Stimulated Primary Human Lung Alveolar Type II Epithelial Cells and Macrophages. J Immunol 2007, 178: 463-473

97. Trupka A: Konsequenzen der Früherkennung für die frühe Beatmungstherapie. 1996,

98. Trupka A, Nast-Kolb D, and Schweiberer L: [Thoracic trauma]. Unfallchirurg 1998, 101: 244-258

99. Vasudevan N and Pfaff DW: Membrane-initiated actions of estrogens in neuroendocrinology: emerging principles. Endocr Rev 2007, 28: 1-19

100. Wang P, Ayala A, Dean RE, Hauptman JG, Ba ZF, DeJong GK, and Chaudry IH: Adequate crystalloid resuscitation restores but fails to maintain the active hepatocellular function following hemorrhagic shock. J Trauma 1991, 31: 601-607

101. Wang P and Chaudry IH: Crystalloid resuscitation restores but does not maintain cardiac output following severe hemorrhage. J Surg Res 1991, 50: 163-169

102. Waymack JP, Klimpel G, Haithcoat J, Rutan RL, and Herndon DN: Effect of prostaglandin E on immune function in normal healthy volunteers. Surg Gynecol Obstet 1992, 175: 329-332

103. Weckbach S, Perl M, Heiland T, Braumuller S, Stahel PF, Flierl MA, Ignatius A, Gebhard F, and Huber-Lang M: A new experimental polytrauma model in rats: molecular characterization of the early inflammatory response. Mediators Inflamm 2012, 2012: 890816

104. Yokoyama Y, Kitchens WC, Toth B, Schwacha MG, Bland KI, and Chaudry IH: Upregulation of hepatic prolactin receptor gene expression by 17beta-estradiol following trauma-hemorrhage. J Appl Physiol 2003, 95: 2530-2536

105. Zellweger R, Ayala A, DeMaso CM, and Chaudry IH: Trauma-hemorrhage causes prolonged depression in cellular immunity. Shock 1995, 4: 149-153

106. Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S, DeMaso CM, and Chaudry IH: Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. Crit Care Med 1997, 25: 106-110

107. Zuckerbraun BS, McCloskey CA, Gallo D, Liu F, Ifedigbo E, Otterbein LE, and Billiar TR: Carbon monoxide prevents multiple organ injury in a model of hemorrhagic shock and resuscitation. Shock 2005, 23: 527-532

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Mitarbeitern der Klinik für Unfallchirurgie, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie der Universität Ulm danken, die mich durch ihre Unterstützung, sowie durch kollegialen Umgang bei der Entstehung dieser Promotion begleitet haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Gebhard für die volle Unterstützung dieser Arbeit und die Möglichkeit, in seiner Abteilung meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

Bedanken möchte ich mich des Weiteren bei Herrn Dr. D. Seitz, der mir zu jederzeit sowohl bei der Durchführung der Experimente, als auch bei der schriftlichen Ausarbeitung dieser Promotion hilfreich zur Seite stand.

Frau S. Braumüller danke ich dafür, dass sie mir mit ihrer fachlichen Kompetenz, ihrer Geduld und ihrer kameradschaftlichen Art jederzeit zur Hilfe kam.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. M. Knöferl, der mir als kompetenter Ansprechpartner bei allen fachlichen Problemen stets zur Seite stand. Durch die von ihm vermittelten wissenschaftlichen Grundlagen, die ausführliche Diskussion aufkommender Fragestellungen und seine Förderung zur Eigeninitiative war es mir möglich, einen tiefen Einblick in das Tätigkeitsfeld der tierexperimentellen Forschung zu gewinnen. Seine stete Präsenz und Unterstützung hat somit er einen wesentlichen Beitrag zum raschen Gelingen dieser Promotion geleistet.

Zuletzt und ganz besonders danken möchte ich meiner Familie, für die Ermöglichung dieses Studiums und für ihre vollste Unterstützung in jeder Phase meines Lebens und meiner Ausbildung. Ihr ist diese Arbeit in größter Dankbarkeit gewidmet.

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.