

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM**

**ZENTRUM FÜR CHIRURGIE**

KLINIK FÜR UNFALL-, HAND- UND WIEDERHERSTELLUNGSCHIRURGIE

ÄRZTLICHER DIREKTOR: UNIV.-PROF. DR. MED. F. GEBHARD

**PROTEKTIVE WIRKUNG EINER C5A-BLOCKADE NACH  
EXPERIMENTELLEM STUMPFEN THORAXTRAUMA**

Dissertation

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

**MICHAEL ANDREAS FLIERL**

GEBOREN IN NÜRNBERG

2008

AMTIERENDER DEKAN: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. BERICHTERSTATTER: PD Dr. Markus S. Huber-Lang

2. BERICHTERSTATTER: Prof. Dr. Uwe B. Brückner

TAG DER PROMOTION: 18. Dezember 2009

*Meinen wunderbaren Eltern  
und  
meinem Bruder*

“The brightest flashes in the world of thought are incomplete until they have been proved to have their counterparts in the world of fact.”

JOHN TYNDALL (1820 - 1893) – *Fragments of Science*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	III
------------------------------------	-----

## 1. EINLEITUNG

1.1	DAS STUMPFE THORAXTRAUMA .....	1
1.2	DAS AKUTE LUNGENVERSAGEN (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) ..	4
1.3	DAS COMPLEMENTSYSTEM .....	5
1.4	DER NEUTROPHILE GRANULOZYT .....	7
1.5	ZIELSETZUNG .....	8

## 2. METHODIK

2.1	REAGENZIEN .....	9
2.2	VERSUCHSTIERE UND ANÄSTHESIE .....	9
2.3	DRUCKWELLEN-INDUZIERTES THORAXTRAUMA MODELL .....	9
2.4	INTRAVENÖSE BLOCKADE VON C5A .....	11
2.5	MESSUNG DER COMPLEMENT-INDUZIERTEN HÄMOLYTISCHEN SERUM-AKTIVITÄT (CH-50) .....	11
2.6	ISOLATION VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN .....	12
2.7	GEWINNUNG VON PLASMA .....	12
2.8	BRONCHOALVEOLÄRE LAVAGE .....	13
2.9	CHEMOTAXIS ASSAY .....	13
2.10	BESTIMMUNG DER PHAGOZYTOTISCHEN AKTIVITÄT .....	14
2.11	MESSUNG VON HYDROGENPEROXID (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	15

2.12	MESSUNG DES FAKTOR H .....	15
2.13	ELISA .....	16
2.14	STATISTISCHE ANALYSE .....	17
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	
3.1	POSTTRAUMATISCHE AKTIVIERUNG DES COMPLEMENTSYSTEMS .....	18
3.2	DIE ZELLULÄRE ANTWORT NACH THORAXTRAUMA IST C5A ABHÄNGIG .....	21
3.3	NORMALISIERUNG DER POSTTRAUMATISCHEN NEUTROPHILENDYSFUNKTION DURCH ANTI-C5A .....	22
3.4	WIRKUNG EINER C5A-BLOCKADE AUF DIE TRAUMA-INDUZIERT VERÄNDERUNGEN DER ZYTOKIN-/CHEMOKIN-PRODUKTION .....	25
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	27
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	33
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	34
<b>ANHANG</b>		
<b>DANKSAGUNG</b> .....		42
<b>LEBENS LAUF</b> .....		43

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABTS	2,2-azino-di-[ethyl-benzthiazolin sulfonat]
ACD	Antikoagulanz („anticoagulant citrate dextrose“)
ALI	Schocklunge („acute lung injury“)
AMØ	Alveolarmakrophagen
anti-C5a	Hasen Anti-Ratten-C5a Immunglobulin G
ARDS	Akutes Lungenversagen („acute respiratory distress syndrome“)
ATP	Adenosin-tri-phosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCECF	(2',7'-bis[2-carboxyethyl]-5-[and6]-carboxy-fluorescein acetoxymethyl ester)
BSA	Bovines Serum Albumin
C5aR	C5a-Rezeptor
C5L2	C5a-like Rezeptor 2
CARS	Syndrom der kompensatorischen antiinflammatorischen Entzündungsantwort („compensatory antiinflammatory response syndrome“)
CH-50	Complement-abhängige hämolytische Aktivität. Diejenige Serumverdünnung, welche genau 50% opsonisierte Fremd-Erythrozyten durch die im Serum vorhandenen Complementfaktoren lysiert
CVF	Cobra-Venom-Faktor
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DPBS	Phosphatpufferlösung („Dulbecco's phosphate buffered saline“)
ELISA	Enzymimmunoassay („enzyme-linked immunosorbent assay“)
FCS	Fetales Kälberserum
F <sub>102</sub>	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
fMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
HBSS	Physiologische glucosehaltige Elektrolytlösung („Hank's balanced salt solution“)
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül

IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
LYM	Lymphozyten
MAC	Membranattakierender Komplex („membrane attack complex“)
MAPK	Mitogen-Aktivierte Protein Kinase
MASP	MBL-assoziierte Serinprotease
MBL	Mannose bindendes Lectin („mannose-binding lectin“)
MOF	Multiorganversagen („multi-organ failure“)
MPO	Myeloperoxidase
PaO <sub>2</sub>	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAOP	Pulmonalarterienverschlußdruck („pulmonal artery occlusion pressure“)
PBS	Phosphatpufferlösung („phosphate buffered saline“)
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PMN	Neutrophile Granulozyten („polymorphonuclear neutrophil granulocytes“)
P-Selectin	Adhäsionsmolekül
prä-IgG	prä-immunes (unspezifisches) Hasen Immunglobulin G (IgG)
SIRS	Ganzkörperentzündungsantwort („systemic inflammatory response syndrome“)
TBS	Tris-gepufferted Natriumchlorid
TWEEN	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
TCA	Trichloressigsäure
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
VCAM	Vaskuläres Adhäsionsmolekül



# 1. EINLEITUNG

## 1.1 DAS STUMPFE THORAXTRAUMA

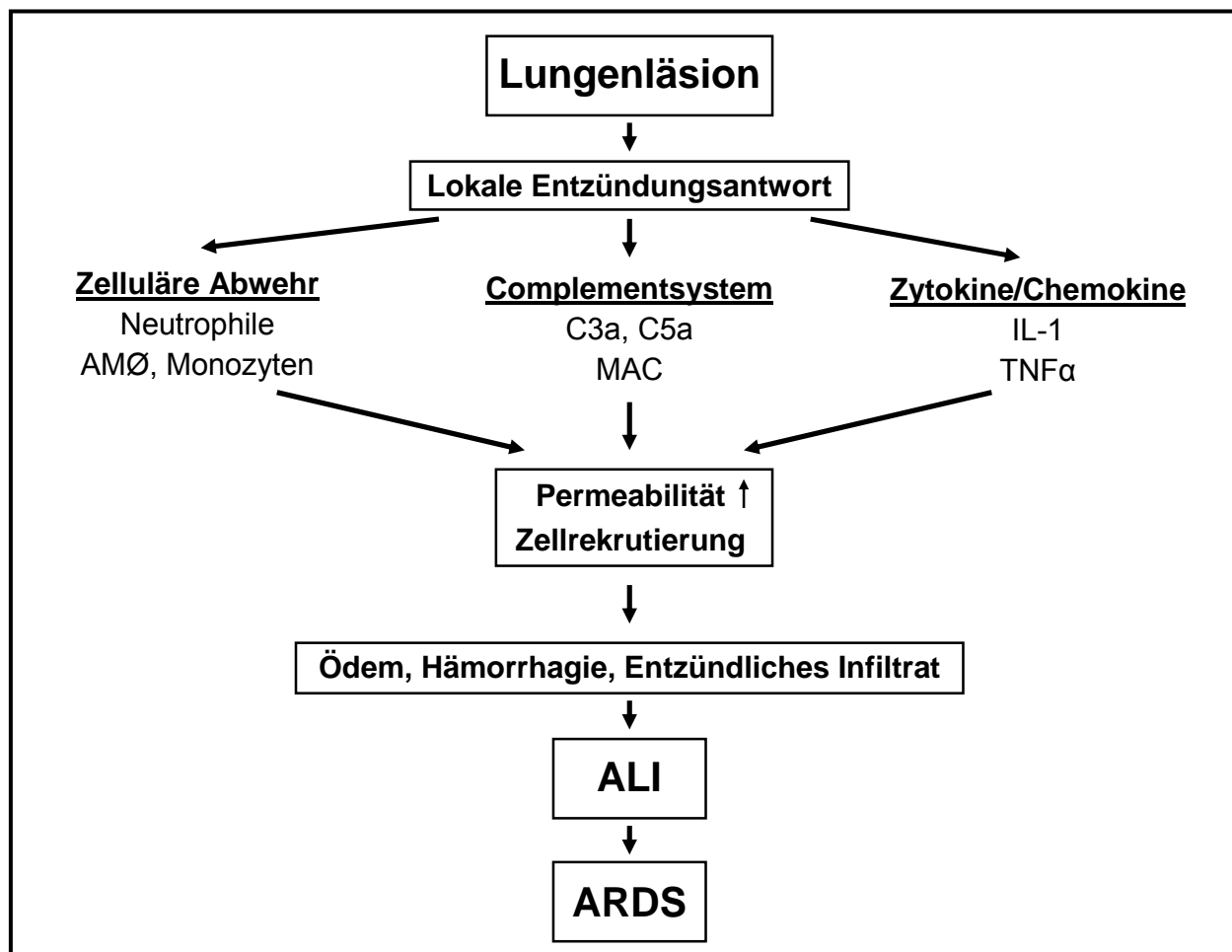
Das stumpfe Thoraxtrauma wurde zu Beginn des 19. Jahrhunderts erstbeschrieben und ist aus medizinischer Sicht ein relativ junges Krankheitsbild. So beobachtete der Schweizer Rusca während der Balkankriege (1912/1913) erstmals die Auswirkungen eines Thoraxtraumas und veranlasste daraufhin im Jahre 1915 systematische Untersuchungen über den traumatisierenden Effekt von Detonationsdruckwellen [66]. Ende des 1. Weltkrieges wurde Hooker als einer der ersten auf die massive Lungeneinblutung nach stumpfem Thoraxtrauma aufmerksam [34]. Er setzte verschiedene Tierarten durch Artilleriegeschosse und Sprengstoff Druckwellen aus und beschrieb eine massive pulmonale Hämorrhagie als stets anzutreffendes Merkmal. Zwei Dekaden später, im Spanischen Bürgerkrieg (1936-39), wurde den Kriegsoffizieren ohne jegliche äußere Verletzung jedoch keinerlei Interesse entgegengebracht [17]. Nach dem Bombardement von London und zahlreicher deutscher Städte während des 2. Weltkrieges intensivierten die Briten wie Deutschen ihre Untersuchungen, um die Pathogenese des stumpfen Thoraxtraumas genauer zu ergründen [15, 20, 87]. Physikalisch besteht eine Explosion aus zwei unterschiedlichen Komponenten: einer kurzzeitigen Druckwelle im Millisekundenbereich und einer etwas längeren, vakuumähnlichen Phase des Unterdrucks. So war anfänglich unklar, welche Komponente der Detonation zur Verletzung der Lungenalveolen führt. Während zunächst der vakuumähnliche Unterdruck für das Zerreißen der alveolären Kapillaren angeschuldigt wurde, stellte Zuckerman 1940 fest, dass die kurzzeitige Druckwelle mehrerer Atmosphären zu den beobachteten pulmonalen Läsionen führt. Die Lungenhämorrhagie konnte folglich durch schaumstoffähnliche Schutzkleidung in verschiedenen Tiergattungen weitgehend reduziert werden [92].

Heute verursacht das stumpfe Thoraxtrauma noch immer etwa ein Viertel aller Trauma-induzierten Todesfälle [70, 74]. Häufigste Begleitverletzung des stumpfen Thoraxtraumas ist die Lungenkontusion mit Einblutungen in das Lungenparenchym [70]. Dabei wird die einfache Lungenkontusion ohne respiratorische Insuffizienz von der schweren Lungenkontusion mit respiratorischer Insuffizienz (durch interstitielles und gegebenenfalls auch alveoläres Ödem)

unterschieden. Insbesondere polytraumatisierte Patienten weisen eine hohe Inzidenz eines Thoraxtraumas (45-65%) auf [2, 32]. Das Thoraxtrauma präsentiert sich dabei oft mit Verletzungen des knöchernen Thorax und des Tracheobronchialsystems, sowie Pneumo- bzw. Hämatothoraces, Lungen- und Herzkontusionen [2, 21, 32, 70]. Während der letzten Jahrzehnte wurden bei diesen Verletzungen durch ein deutlich aggressiveres Management beachtliche Fortschritte erzielt. Dennoch ist die pulmonale Kontusion beim polytraumatisierten Patienten noch immer mit einer hohen, altersabhängigen Letalität von bis zu 42% vergesellschaftet [74] und wird besonders lebensgefährdend, wenn sie in der frühen posttraumatischen Phase unerkant bleibt.

In mehreren experimentellen und klinischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die frühe, angeborene Entzündungsantwort nach Lungenverletzung durch Aktivierung sowohl der Complementkaskade als auch der zellulären Abwehr (Neutrophilen-, Makrophagen-, Monozyten-System) eingeleitet wird. Dabei setzen die sessilen Alveolarmakrophagen in hohem Maße die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) frei und haben durch zelleigene Proteasen sogar die Fähigkeit, lokal produziertes C5 zu C5a zu spalten [36]. Das freigesetzte Anaphylatoxin C5a stellt einen ausgeprägten chemotaktischen Reiz dar, der mit maximaler Rekrutierung Neutrophiler sowie weiterer Phagozyten beantwortet wird [23, 24, 79] und bewirkt eine Hochregulation endothelialer Zelladhäsionsmoleküle (z.B. P-Selectin, VCAM) [57], die als „Anker“ zu einer Adhäsion von zirkulierenden Neutrophilen, Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten führen und die gerichtete Chemotaxis einleiten. Zusätzlich führt C5a zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und erleichtert somit die Einwanderung von Neutrophilen und Monozyten in den Alveolarraum. Dort setzen die migrierten Entzündungszellen ihrerseits zahlreiche Enzyme, Oxidantien, Wachstumsfaktoren, Proteasen, Zyto-/Chemokine und bioaktive Lipide frei, die zu einer weiteren Gewebeerstörung mit nachfolgender Rekrutierung weiterer Phagozyten führen und letztendlich in einem „Teufelskreis“ enden können [30, 35, 80, 82]. Die Lungen zeigen als morphologisches Korrelat eine erhöhte vaskulo-alveoläre Permeabilität mit interstitiellem Ödem und schwerer Hämorrhagie. Besonders bei schweren Verletzungen richten sich die ursprünglichen Schutzeffekte des angeborenen Immunsystems schließlich gegen den eigenen Organismus und können in einer chaotischen, überschießenden generalisierten (SIRS) oder unterdrückten Immunantwort (CARS) resultieren [29, 35]. Funktionell führt das gestörte Zusammenspiel der humoral-zellulären Faktoren mit seinen strukturellen Veränderungen nicht selten zu einer schweren respiratorischen Dysfunktion. Diese

kann in das Krankheitsbild der Schocklunge (ALI) bzw. des akuten Lungenversagens (ARDS) und letztlich in ein Multiorganversagen (MOF) münden [83].



**Abb. 1:** PATHOMECHANISMUS DER ENTZÜNDUNGSANTWORT NACH STUPPFEM THORAXTRAUMA.

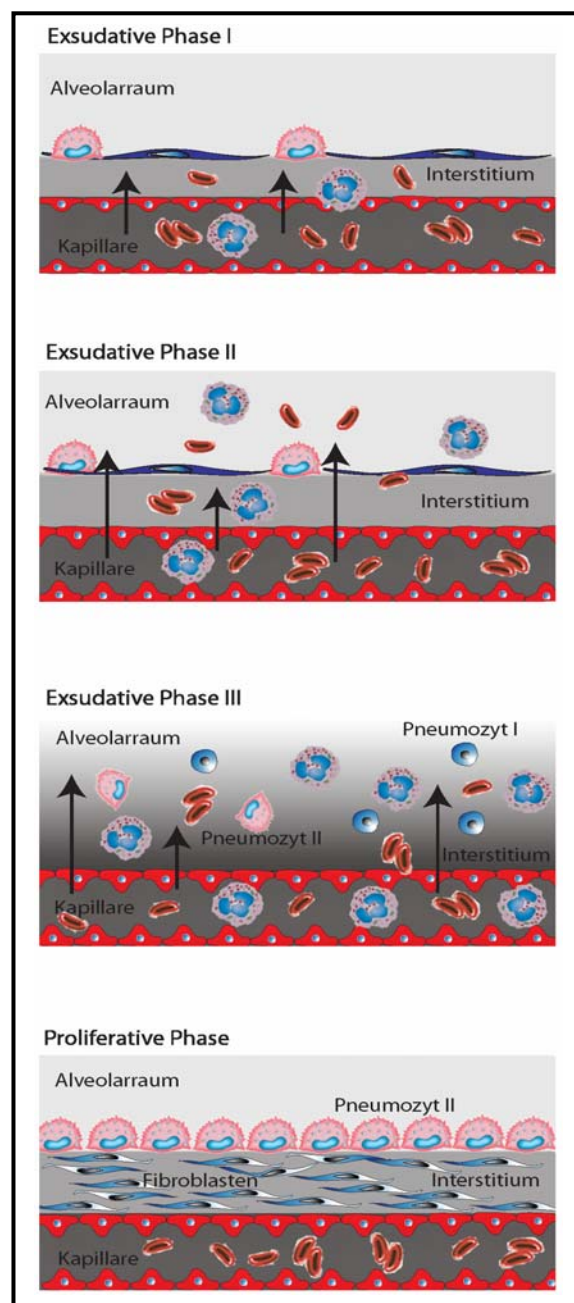
ALI = „Acute Lung Injury“, AMØ = Alveolarmakrophagen, ARDS = Akutes Lungenversagen („Acute Respiratory Distress Syndrom“), C3a und C5a = Complement-Aktivierungsprodukte (Anaphylatoxine), IL-1 = Interleukin-1, MAC = Membranattakierender Komplex („Membrane Attack Complex“), TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .

## 1.2 DAS AKUTE LUNGENVERSAGEN („Acute Respiratory Distress Syndrome“, ARDS)

Beim akuten Lungenversagen handelt es sich um einen polyätiologischen Symptomenkomplex, der mit einer hohen Letalität vergesellschaftet ist [83]. Auf der Suche nach einer treffenden Namensgebung sind über 50 Synonyme (wie z.B. Schocklunge, akutes Atemnotsyndrom, Beatmungslunge, „oxygen pneumonitis“, „fat embolism“ etc.) geprägt worden, die oft nur eine Beschreibung des jeweiligen Auslösers beinhalteten. Aufgrund der verwirrenden Terminologie wurde schließlich von der „American-European Consensus Conference“ die ALI und das ARDS definiert. Dabei wird das ARDS als fulminante Variante der ALI angesehen [26].

Die jährliche *Inzidenz* des ARDS beläuft sich auf etwa 10-14 / 100.000 [64], während die ALI mit jährlich ca. 64/100.000 deutlich häufiger auftritt [25]. Die Letalität des ARDS wird meist mit mehr als 50% angegeben und erreicht – je nach Ätiologie, Schweregrad und Prämorbiditätsfaktoren – Werte von bis zu 90% [16, 45, 47].

Es werden verschiedene *Auslöser* des ARDS unterschieden: pulmonale Auslöser sind Thoraxtrauma und Lungenkontusion [4, 49, 51], Pneumonie [7, 40, 52], Lungenembolie [78], Beatmung und Hyperoxie [18], „Beinaheertrinken“ [89], arterielle Hypoxie und



**Abb. 2: STADIEN DES ARDS.**

- Exsudative Phase I:* Endothelzellschädigung, Permeabilitätsstörung, interstitielles Ödem
- Exsudative Phase II:* Epithelschädigung, beginnendes intraalveoläres Ödem
- Exsudative Phase III:* Ausbildung hyaliner Membranen
- Proliferative Phase:* Endothelzellregeneration, interstitielle Fibrose, Pneumozyten Typ II-Hyperplasie.

die Inhalation toxischer Gase [8]. Systemische Auslöser beinhalten Polytrauma und Schock [86], Verbrennungen [8], massive Transfusionen und Hämolyse [71, 77], kardiopulmonaler Bypass, aber auch Pankreatitis, SIRS und Sepsis [26]. Als toxische Auslöser sind Ethanol [55], Heroin [90] und Paraquat [65] bekannt.

Als *histomorphologisches Korrelat* des klinischen Verlaufes des ARDS zeigt sich eine zunehmende Endothelzellschädigung, Permeabilitätssteigerung und die Ausbildung eines interstitiellen und alveolären Ödems. Anschließend erfolgt die Ausbildung hyaliner Membranen und schließlich die Regeneration mit interstitieller Fibrose und tapetenartiger Auskleidung des Alveolarraumes mit Typ II-Pneumozyten unter Verdrängung der Typ I-Pneumozyten (Abb. 2).

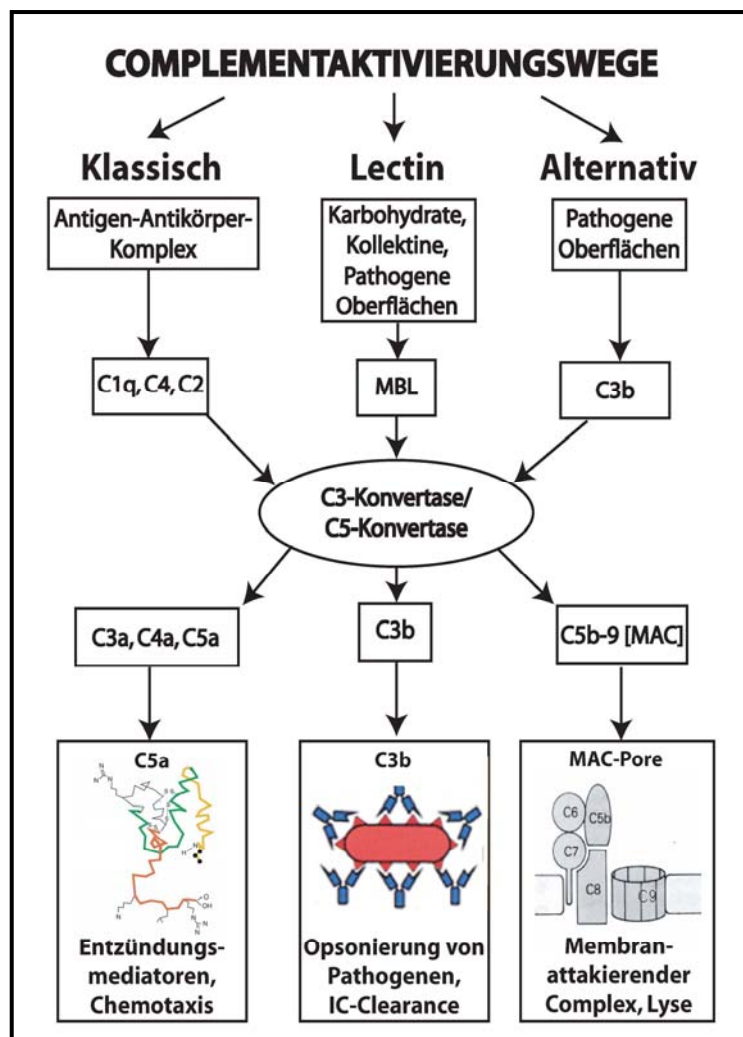
*Klinisch* ist die ALI und das ARDS durch eine akute respiratorische Insuffizienz, radiologisch nachweisbare bilaterale Thoraxinfiltrate und eine Reduktion des Pulmonalarterienverschußdrucks (PAOP <18 mmHg) definiert. Während die ALI zusätzlich mit einem Sauerstoffpartialdruck (PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub>) von weniger als 300 mmHg definiert ist, fällt dieser beim ARDS auf unter 200 mmHg ab [33]. Typischerweise verläuft das ARDS in drei Phasen. Einem ca. 24-72 h andauernden symptomarmen Intervall folgt eine ca. 7 d dauernde exsudative Phase mit alveolärer Ödembildung und nach ca. 2 Wochen die proliferative Phase mit beginnender Fibrosierung. Diese Endphase des ARDS kann bei ARDS-Überlebenden in einer langfristigen signifikanten Einschränkung der Lungenfunktion resultieren [31, 59, 60].

### **1.3 DAS COMPLEMENTSYSYSTEM**

Es gibt zunehmend Hinweise, dass das Complementsystem bei der Entstehung des ARDS eine wesentliche Rolle spielt. Das Complementsystem besteht aus einem System von mehr als 30 Serum-Proteinen und spezifischen Rezeptoren. Es bedient sich einer Kaskade von Proteasen, die letztlich aktivierte Complementfaktoren, Opsonine, Anaphylatoxine und den membranattakierenden Komplex (MAC, „membrane attack complex“) bilden [56]. Zentraler Komplex der Complement-Kaskade ist die C3-Konvertase. Diese kann nach momentanem Wissensstand über drei unterschiedliche Wege aktiviert werden. Der klassische Aktivierungsweg wird z.B. durch Antigen-Antikörper-Komplexe eingeleitet, welche schließlich über Anregung und Fixierung weiterer Komponenten (C1q, C2, C4) die C3-Konvertase bilden [56, 63]. Im Gegensatz dazu wird der alternative Aktivierungsweg des Complementsystems direkt durch in

den Organismus eingedrungene, pathogene Oberflächen initiiert [56, 63]. Darüber hinaus verstärkt eine ständig stattfindende spontane Hydrolyse von C3 zu C3b die Aktivierung dieses Weges [48, 85]. Als dritte Möglichkeit der Aktivierung wurde der „Mannose-binding lectin“ (MBL)-Weg beschrieben [19]. Dabei erkennt das Lectin als Mitglied der Kollektin Familie verschiedenste pathogene Oberflächen wie gram-negative Oligosaccharide oder Lipopolysaccharide [14] und aktiviert über Mannose-assoziierte Serin-Proteasen (MASP 1, MASP 2) die Complementkaskade. Die durch alle 3 Wege gebildete C3-Konvertase spaltet nach ihrer Aktivierung C3 in C3a und C3b. C3a wirkt als Anaphylatoxin und führt u.a. zur Kontraktion der glatten Muskulatur, Vasodilatation und Erhöhung der vaskulären Permeabilität [56, 63, 79]. C3b hingegen ist ein wichtiger Faktor für

die Opsonisierung von Pathogenen. Er kann aber auch in die C3a-Konvertase miteingebunden und somit Bestandteil der C5-Konvertase werden, welche C5 in C5a und C5b spaltet [63]. Das Anaphylatoxin C5a (~14kDa) ist ein hochpotentes Chemotaxin für verschiedene Entzündungszellen und spielt eine bedeutende Rolle im akuten Entzündungsgeschehen: es führt zu einer Vasodilatation mit lokal erhöhtem Blutfluß (Überwärmung), Kontraktion der glatten



**Abb. 3: AKTIVIERUNGSWEGE DES COMPLEMENTSYSTEMS.**

C1q, C4, C2 = Complement Proteine; C3a, C3b, C4a, C5a = Complement-Aktivierungsprodukte, IC-Clearance = Beseitigung von Immunkomplexen, C5b-9 [MAC] = aus den Complement Proteinen C5b, C6, C7, C8 und C9 zusammengesetzter membranattakierender Komplex, MBL = Mannose bindendes Lectin.

Muskulatur und Permeabilitätssteigerung (Ödembildung). Ferner vermittelt C5a die Aktivierung von Phagozyten und Thrombozyten und insbesondere die Hochregulierung vaskulärer Adhäsionsmoleküle und führt dadurch zur Rekrutierung von Entzündungszellen [24]. C5b dagegen interagiert mit C6, C7, C8 und C9, die allesamt schließlich C5b-C9, den membranattakierenden Komplex (MAC) formen. Wird der MAC auf pathogenen Oberflächen formiert, so bildet er Poren in körperfremden Membranen wie beispielsweise Bakterien und verursacht damit einen unkontrollierbaren Ausstrom von Elektrolyten (insbesondere  $K^+$ ) [56, 79]. Dies führt zum Zusammenbruch des osmotischen Gleichgewichts der Zelle und durch den nachfolgenden massiven Einstrom von Wasser zur rapiden Zelllyse.

Die zentrale Funktion von Complement-Spaltprodukten in der Pathophysiologie des ARDS wird durch frühere klinische Studien unterstrichen, die erhöhte Serum Konzentrationen von C3a und C5a in Patienten fanden, die ein ARDS zu entwickelten [27, 73, 84]. In tierexperimentellen Studien fand sich kürzlich, dass übermäßig produziertes C5a viele der zur Bakterienvernichtung unverzichtbaren Neutrophilenfunktionen (z.B. Chemotaxis, Freisetzung granulärer Enzyme, Generierung reaktiver Sauerstoffradikale und Phagozytose) beinahe völlig zum Erliegen bringt [35, 39].

#### **1.4 DER NEUTROPHILE GRANULOZYT**

Gerät das hochkomplexe, fein orchestrierte Zusammenspiel zwischen dem Complementsystem und zellulärem Abwehrsystem aus dem Gleichgewicht, kann der Neutrophile zu bedeutenden wirtseigenen Schäden beitragen. Am Ort des Entzündungsgeschehens produziert er ausgiebig Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) [1, 6, 88], welche mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrit, einem stark mikrobiziden und zytotoxischen Agens, reagieren [58, 68]. Des Weiteren verwandeln sich Superoxidanionen rapide zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Aufgrund fehlender Ladung diffundiert  $H_2O_2$  in entzündetes Gewebe und kann dort akkumulieren. Der Neutrophile wandelt dann das relativ schwache Oxidanz  $H_2O_2$  durch die Myeloperoxidase (MPO) in die weitaus potentere Hypochlorsäure (HOCl) um. HOCl reagiert mit Gewebszellen und entzieht diesen jegliches ATP das schließlich zu einer zellulären Dysfunktion und Zellnekrose führt [3, 9, 12].

Wird nun der Neutrophile längerfristig erhöhten Konzentrationen von C5a ausgesetzt, kommt es zur deutlichen Funktionsstörung mit reduzierter chemotaktischer und phagozytotischer Aktivität, Erlöschen der „oxidative burst“ Antwort [39] und Verlust der Rezeptoren für C5a (C5aR und C5L2) [37, 38]. Auf molekularer Ebene wird beispielsweise durch exzessives C5a die Mitogen-Aktivierte Protein Kinase- (MAPK-) Signalkaskade gehemmt [79]. Ferner wird die Translokation von p47<sup>phox</sup> (ein zytosolischer Schlüsselfaktor, der für die Zusammensetzung der NADPH-Oxidase essentiell ist) vom Zytosol zur Membran durch C5a blockiert [35, 39]. All diese Veränderungen können zum Verlust der Bakterizidie des Neutrophilen führen. In klinischen Studien fand sich neben erhöhten Plasma Spiegeln von Complementaktivierungsprodukten [22, 27] in bronchoalveolären Flüssigkeiten von ARDS-Patienten eine stark erhöhte Neutrophilenzahl als Zeichen einer floriden Entzündung.

Die systemischen Auswirkungen des Trauma-induzierten ARDS auf die systemischen Neutrophilen und insbesondere eine wirksame therapeutische Intervention sind jedoch derzeit noch weitgehend unbekannt.

## **1.5 ZIELSETZUNG**

In vorliegender Arbeit wurde hypothetisiert, dass durch Trauma-induzierte Lungenkontusion systemische Complementfaktoren aktiviert werden, welche systemische Neutrophile in ihrer bakteriziden Funktionalität signifikant beeinträchtigen.

Ziel der Arbeit war es daher, durch gezielte posttraumatische Funktionsanalyse der Neutrophilen und des Complementsystems den Einfluß von C5a auf die pathophysiologischen Folgen des stumpfen Thoraxtraumas zu untersuchen und dabei den Effekt einer immunomodulatorischen C5a-Blockade (als Therapieansatz) auf die systemische Antwort des angeborenen Immunsystems nach Trauma zu bestimmen.



## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 REAGENZIEN

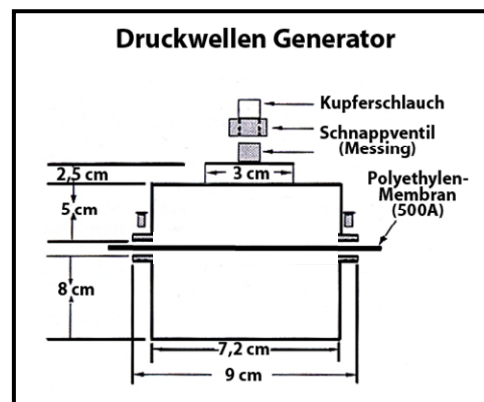
Sämtliche Reagenzien wurden, sofern nicht anderweitig beschrieben, von Sigma-Aldrich Co. (München, Deutschland) bezogen und waren von höchstem Reinheitsgrad (>99%).

### 2.2 VERSUCHSTIERE UND ANÄSTHESIE

Pathogenfreie Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 250-275 g (Charles River, Wilmington, MA, USA) wurden mittels eines 2,5% Sevoflurane (Sevorane™, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) – 97,5% Gas-Sauerstoffgemisches (Gasfluß von 2 l/min) über eine Spülmaske anästhesiert. Um eine adäquate Analgesie zu gewährleisten, wurde unmittelbar posttraumatisch Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma, München, Deutschland 0,03 mg/kg Körpergewicht) subkutan injiziert und alle 12 h wiederholt.

### 2.3 DRUCKWELLEN-INDUZIERTES THORAXTRAUMA MODELL

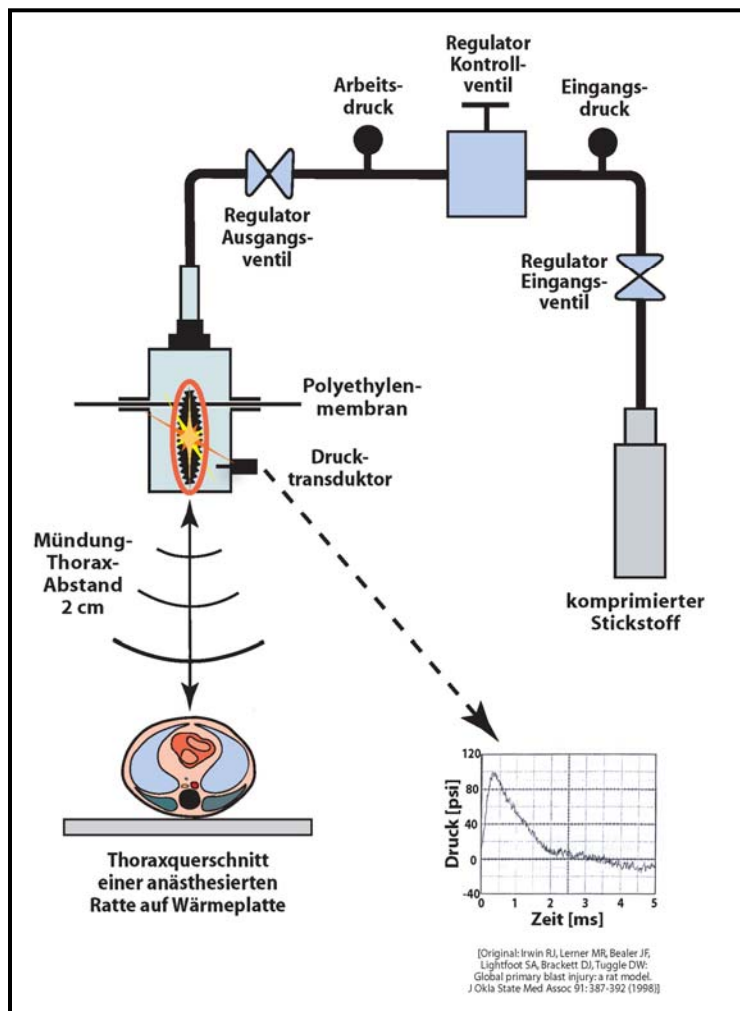
Das stumpfe Thoraxtrauma wurde durch eine einzelne, auf den Thorax zentrierte Druckwelle induziert. Das von Irwin et al. und Jaffin et al. [42, 43] beschriebene Modell wurde dazu geringgradig modifiziert [46]. Die Vorrichtung besteht aus zwei Teilen: ein oberer Zylinder dient als Druckreservoir und wird von einem unteren, dem Mündungsteil, durch eine 50 µm dicke Polyestermembran (DuPont, Bad Homburg, Deutschland) getrennt.



**Abb. 4: DRUCKWELLENGENERATOR IM DETAIL.**  
A = Ångström =  $1.0 \times 10^{-10}$  Meter, cm = Zentimeter

Das obere Druckreservoir ist mit einer mit komprimierten Luft gefüllten Stahlflasche verbunden. Dazwischen befindet sich ein elektronisch auslösbares Hochgeschwindigkeitsventil (Hee-D-24, FESTO, Esslingen, Deutschland), sowie ein Ventil zur Druckreduktion (Zinser, Ebersbach, Deutschland), welches auf 13 bar eingestellt wurde. Durch Öffnung des Hochgeschwindigkeitsventils dringt Druckluft in das obere Druckreservoir. Sobald der Druck den Widerstand des Polyesterfilmes übersteigt, reißt dieser in Mündungsrichtung und setzt dadurch eine einzelne Druckwelle von ca. 1 bar frei. Bei den Experimenten wurde der Druckwellengenerator mit einer Entfernung von 2,0 cm von Mündung auf den Thorax Ratte zentriert. Dieser Abstand wurde aufgrund von vorhergegangenen Experimenten zur Bestimmung der

Entfernungs-Wirkungs-Beziehung gewählt und führt zu einer Akut-Letalität von ca. 10% (Riß der großen Gefäße, A. pulmonalis, Aorta). Die Reproduzierbarkeit jeder Druckwelle wurde durch einen Drucktransduktor (Omega 100psi, New Port Omega, Deckenpfronn, Deutschland) dokumentiert, der horizontal an der Mündungsöffnung angebracht



**Abb. 5: VERSUCHSAUFBAU.**

Komprimierter Stickstoff wird nach Durchfluss durch mehrere Kontrollventile in standardisiertem Druck die obere Kammer des Druckwellengenerators geleitet, welcher von der unteren Kammer durch eine Polyethylenmembran getrennt wird. Übersteigt der Druck in der oberen Kammer die Elastizität der Membran, reißt diese und die entstehende Druckwelle wird durch die untere Kammer auf den Thorax der Versuchstiere geleitet. Unten rechts ist eine typische von dem in der unteren Kammer des Druckwellengenerators befindlichen Drucktransduktors aufgezeichnete Druckwelle abgebildet.

wurde. Sowohl der Maximaldruck, als auch die Dauer der Druckwelle wurden parallel aufgezeichnet (Abb. 5).

## **2.4 INTRAVENÖSE BLOCKADE VON C5A**

Unmittelbar posttraumatisch wurde einigen Ratten 400 µg prä-immunes Hasen Immunglobulin G (IgG) oder 400 µg Hasen Anti-Ratten-C5a C-Peptid IgG (jeweils in 500 µl PBS; Gibco invitrogen, Karlsruhe) intravenös injiziert. Der anti-C5a Antikörper (freundliche Gabe von Prof. Dr. Ward, Department of Pathology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA) war gegen die carboxy-terminale Peptidregion des C5a-Moleküls der Ratte (C-Peptid, Aminosäuren 55-77) gerichtet [11]. Kontrolltiere wurden gleichermaßen narkotisiert und erhielten intravenös 500 µl reines PBS (Gibco invitrogen, Karlsruhe). Vor und nach der beschriebenen Intervention hatten die Ratten unbeschränkten Zugang zu Nahrung und Wasser.

## **2.5 MESSUNG DER COMPLEMENT-INDUZIERTEN HÄMOLYTISCHEN SERUM-AKTIVITÄT (CH-50)**

Diejenige Serumverdünnung, welche 50% opsonisierte Fremd-Erythrozyten durch die im Plasma vorhandenen Complementkomponenten lysiert, wird als CH-50 bezeichnet. Um die hämolytische Aktivität der gewonnenen Ratten Seren zu evaluieren, wurden durch Fremdserum opsonisierte Schafserythrozyten (Colorado Serum Company, Denver, CO, USA) bei 37°C für 60 min mit Serienverdünnungen von Rattenserum und Tris-gepuffertem Natriumchlorid (TBS), pH 7,35 gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eisgekühltem TBS (mit 0,05% Gelatine) gestoppt und einer Zentrifugation (2.500 x g, 5 min) unterzogen. Die Absorption des Überstandes wurden photometrisch bei 541 nm ermittelt und jeweils diejenige Serumkonzentration ermittelt, die genau 50% der Schafserythrozyten lysiert (CH-50).

## 2.6 ISOLATION VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN

Vollblut von Ratten wurde mit 10% „anticoagulant citrate dextrose“ („ACD“ – Baxter, Deerfield, IL, USA) in 20 ml Spritzen abgenommen. Anschließend wurde das Blut mit 0,9% NaCl auf 1:3 verdünnt. In konischen 50 ml Reagenzgefäßen (Falcon, Becton Dickson, NJ, USA) wurden jeweils 15 ml Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) vorgelegt und mit 25 ml verdünntem Blut überschichtet. Nach 30 min Zentrifugation (500 x g, Raumtemperatur, Varifuge 3.0 RS, Heraeus, Hanau) wurden die Interphase, bestehend aus Monozyten und Lymphozyten, sowie der Serum- und Ficoll-Überstand abgesaugt und verworfen. Die übrigen Blutbestandteile (Neutrophile und Erythrozyten) wurden erneut mit 0,9% NaCl auf 30 ml verdünnt. Es erfolgte die Zugabe von 7,5 ml 5% Dextran (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden), bei definitiver Dextrankonzentration von 1%. Anschließend konnten die Zellen bei Raumtemperatur für 45 min im Reagenzgefäß sedimentieren. Der Überstand wurde erneut für 5 min bei Raumtemperatur und 500 x g zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurden die restlichen Erythrozyten durch eine hypotone Lösung lysiert. Dazu wurden für genau 30 s 10 ml steriles H<sub>2</sub>O (Aqua Spüllösung, Delta Pharma, Pfullingen) dem Zellpellet zugegeben. Unmittelbar danach erfolgte durch Zugabe von 5 ml 2,7% NaCl (Fresenius Kabi, Bad Homburg) die Wiederherstellung der Isotonie. Wiederum mit 0,9% NaCl auf ein Volumen von 40 ml gebracht, wurden die Reagenzröhrchen abermals für 5 min zentrifugiert (500 x g, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und die isolierten Neutrophilen in HBSS (Gibco invitrogen, Karlsruhe) resuspendiert, ein Aliquot von 10 µl in einer Neubauer Zählkammer (0,025 mm<sup>2</sup>, 0,1 mm Tiefe, Brand, Wertheim) ausgezählt und durch weitere Verdünnungsreihen mikroskopisch („Axioskop“, Zeiss, Oberkochen) auf die erwünschte Zellzahl adjustiert. Die Vitalität der Neutrophilen wurde mittels Methylenblaufärbung-Ausschlußtest geprüft und betrug stets  $\geq 98\%$ .

## 2.7 GEWINNUNG VON PLASMA

Antikuaguliertes (10% ACD, Baxter, Deerfield, IL, USA) Vollblut von Ratten wurde in 20 ml Spritzen abgenommen und durch eine 5 min Zentrifugation bei 500 x g wurde das Plasma von den zellulären Bestandteilen getrennt und in neue Gefäße überführt. Diese wurden bei 2.000

x g zentrifugiert (10 min), um den restlichen zellulären Debris zu entfernen und bei -80°C für die weitere Analysen eingefroren.

## **2.8 BRONCHOALVEOLÄRE LAVAGEN**

Zu den gegebenen Zeitpunkten nach Trauma wurden bronchoalveoläre Lavageflüssigkeiten (BAL) durch einen 3-fachen intratrachealen Injektions-Aspirationszyklus mit 5 ml eisgekühltem PBS (Gibco invitrogen, Karlsruhe) gewonnen. Den erhaltenen Proben wurde ein Breitspektrum-Proteasen-Gemisch (Roche Diagnostic Corporation, Basel, Schweiz) zugegeben (2 µl/ml) und die Proben bei 500 x g für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden bei -80°C für nachfolgende Experimente verwahrt. Die Zellsedimente wurden nach hyotoner Lysis restlicher Erythrozyten mit destilliertem H<sub>2</sub>O und anschließender Re-Isotonierung wieder in ihrem jeweiligen BAL-Ausgangsvolumen mit PBS resuspendiert. Danach erfolgte die Auszählung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer. Zur weiteren Differenzierung der so gewonnenen Zellen wurden diese nach einer Zytospinn Zentrifugation auf Glasträger (500 x g, 3 min) für 10 min in 100%igem Methanol fixiert und nach Pappenheim gefärbt (Hemacolor®, Merck, Darmstadt). Pro experimenteller Gruppe wurden jeweils 300 Zellen durch drei verschiedene, geblindete Personen evaluiert und die erhaltenen Werte gemittelt.

## **2.9 CHEMOTAXIS ASSAY**

Nach der oben beschriebenen Neutrophilen-Isolation wurden die Zellen auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und mit 0,8 µl/ml in DMSO gelöstem BCECF (2', 7'-bis [2-carboxyethyl]-5-[and 6]-carboxy-fluorescein acetoxymethyl ester; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) versetzt und für exakt 30 min bei 37°C im Wasserbad (SW 23, Julabo, Seebach) inkubiert. Dem anschließenden Zentrifugationsschritt (600 x g bei Raumtemperatur für 5 min) folgte ein Waschschritt und schließlich die Resuspension in HBSS („hank's balanced salt solution“, Gibco, Eggenstein, Deutschland) mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> sowie 0,1% BSA. Der Boden einer Chemotaxiskammer mit 96 Vertiefungen (NeuroProbe, Cabin John, MD, USA) wurde mit

jeweils 33  $\mu\text{l}$  HBBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (Negativ Kontrolle), fMLP ( $10^{-6}\text{M}$ ) und unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinantem Ratten C5a (1-100 ng/ml) in Triplets geladen. Die beiden Kammern wurden durch eine mit 3  $\mu\text{m}$  durchmessende Poren versehene Polycarbonat-Membran (NeuroProbe, Cabin John, MD, USA) getrennt. Die obere Kammer wurde mit exakt 44  $\mu\text{l}$  BCECF-beladener Neutrophilensuspension ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) versehen und für 45 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Inkubation wurden die auf der Membranoberseite verbliebenen Zellen mit DPBS (Gibco, Langley, OK, USA)/0,1%BSA abgewaschen. Nach Trocknung wurde die durch die Membran gewanderten Neutrophilen per Cytofluorometrie (Cytofluor II; PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) bei 450 nm bestimmt. Die chemotaktische Aktivität von Neutrophilen wurde entsprechend dem oben aufgeführten Protokoll ermittelt. Die Plasmen und BAL-Flüssigkeiten wurden jeweils mit HBSS auf 1:5 verdünnt und in die untere Chemotaxis-Kammer geladen. Da bei Durchführung der Arbeit kein verlässlicher Ratten-C5a-ELISA existierte, wurden Ratten Plasmen bzw. BAL mit anti-C5a-Antikörpern (bzw. prä-immunen IgG-Antikörpern als Negativkontrolle) für 120 min bei Raumtemperatur vorinkubiert, um ewatiges Ratten C5a in den Proben zu neutralisieren. Parallel wurden Ratten-Neutrophile von gesunden Ratten isoliert ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml), in die obere Kammer geladen und einer Chemotaxis-Analyse zugeführt, wobei die mit präimmunem IgG bzw. anti-C5a präparierten Plasmen/BAL in die Bodenkammer geladen wurden. Dadurch wurde die C5a-Abhängigkeit der chemotaktischen Aktivität der Plasmen mittels anti-C5a vorklokierten Plasmen evaluiert.

## **2.10 BESTIMMUNG DER PHAGOZYTOTISCHEN AKTIVITÄT**

Nach der oben beschriebenen Zellisolation wurden Ratten-Neutrophile ( $10^7$  Zellen/ml in HBSS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  mit oder ohne fMLP ( $10^{-5}\text{M}$ ) für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Zur Opsonierung der Mikropartikel (Durchmesser 0,75 $\mu\text{m}$ ; Flouresbrite Carboxylate, 2,64% Solids-Latex, Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) wurden die Partikel in  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem HBSS mit hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) bei  $37^\circ\text{C}$  für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  der präparierten Mikropartikeln zu je 100  $\mu\text{l}$  Neutrophilensuspension und die erneute Inkubation (30 min bei  $37^\circ\text{C}$ ) bei einer Endkonzentration von  $10^8$  Mikropartikel/ml Zellsuspension. Die Phagozytose wurde durch Zugabe von 2 ml eiskaltem  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem DPBS (Gibco, Langley, OK, USA) beendet. Nach

sofortiger Zentrifugation (900 x g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen erneut in 100 µl eiskaltem DPBS resuspendiert. Nach diesen zwei Waschschrritten wurde ein Aliquot der Zellen anschließend auf ihre Vitalität mittels Methylenblau Ausschlußtest untersucht. Es folgte ein Zytospin (200 x g, 3 min) auf einen Objektträger und ein Fixationsschritt mit Methanol für 10 min. Zur Evaluation der Phagozytoserate wurden die Zellen und die dazugehörige Partikelanzahl mittels Fluoreszenzmikroskopie in 4 Zähldurchgängen (à 100 Zellen) von 3 verschiedenen geblindeten Personen bestimmt und die erhaltenen Werte gemittelt.

## **2.11 MESSUNG VON HYDROGENPEROXID (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Nach Gewinnung von Ratten-Neutrophilen wurde der Zellsuspension 5 mM Natriumazid (Merck, Darmstadt) zugegeben, um endogene Katalasen an der Zerstörung des entstehenden Peroxids zu hindern. Als Stimulanz wurde PMA (100 ng/ml) für 15 min zugegeben. Die Zellstimulation wurde durch die Zugabe von 0,5 ml 10% Trichloressigsäure (TCA, 50% v/v) gestoppt und bei 800 x g (4°C) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und Eisenammoniumsulfat (Endkonzentration: 1,5 mM) sowie Kaliumthiozyanat (Endkonzentration: 0,25 mM) zugesetzt. Die Farbintensität des entstandenen Eisenthiozyanat-Komplexes wurde per Photometer („Ultraspec“, Pharmacia Biotech, Cambridge; Großbritannien) bei 480 nm Wellenlänge bestimmt und mit der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Standard-Kurve einer Verdünnungsreihe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,03-137,5 µmol/ml) verglichen.

## **2.12 MESSUNG DES FAKTOR H**

Die Konzentrationen der Ratten-Plasmen und -BAL wurden mittels eines bereits beschriebenen „Sandwich ELISAs“ ermittelt [13]. Dies beinhaltete in Kürze die Inkubation mit 10 µg/ml Mäuse-Antikörper gegen 4-7D (in 100 µl PBS (Gibco, Langley, OK, USA) pro Vertiefung, über Nacht, bei 4°C), gefolgt von einer 30 min Blockade mit 200 µl PBS/2% BSA. Die Proben und die Standards wurden jeweils in PBS (0,2% TWEEN 20 v/v) verdünnt. Hochgereinigte IgG-Antikörper von Hasen-anti-Faktor H-Seren (6,6 µg/ml) dienten als

polyklonaler Erkennungs-Antikörper. Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Hase-IgG- Antikörper (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde als zweiter Erkennungs-Antikörper verwendet und die Farbreaktion mittels 2,2-azino-di-[ethyl-benzthiazolin sulfonat] (ABTS) erwirkt. Die sich proportional zur Faktor H Konzentration verhaltende Farbtintensität wurde spektrometrisch bei 405 nm bestimmt.

## 2.13 ELISA

Die Konzentrationen von Zytokinen und Chemokinen in den posttraumatisch gewonnenen Rattenplasmen wurden mittels kommerziell erhältlichen Enzymimmunoassays bestimmt. Folgende „Enzyme-Linked Immunosorbent Assays“ (ELISAs) kamen zum Einsatz:

- Ratten Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) OptEIA™ ELISA Set (BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA, USA)
- Ratten Interleukin-10 (IL-10) OptEIA™ ELISA Set (BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA, USA)
- Ratten MCP-1 Quantikine™ Immunoassay (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt)

Dabei wurden sämtliche Schritte wie auch die Vorbereitung und Verdünnung der Proben nach den Vorgaben des Herstellerprotokolls in der klassischen „Sandwich-ELISA“-Technik ausgeführt. In Kürze beinhaltet dies die Inkubation der ELISA-Platten mit einem ersten Antikörper über Nacht bei 4°C, gefolgt von Waschschritten und Blockade mit PBS/10% FBS (Raumtemperatur). Einem erneuten Waschschrift folgte die Zugabe von Kontrollen, Standards und Proben und erneute Inkubation bei Raumtemperatur. Nach abermaligen Waschen schloß sich die Zugabe einer an den Erkennungs-Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase an, welche - nach erneuter Inkubation bei Raumtemperatur und Waschen - das zugehörige Substrat umsetzte. Direkt im Anschluß wurden die Extinktionswerte photometrisch bei 450 nm gemessen („Cytofluor Series 4000“, Perspective Biosystems, Framingham, USA). Die entsprechenden Konzentrationen wurden anhand der parallel durchgeführten Standardkurve berechnet.



## 2.14 STATISTISCHE ANALYSE

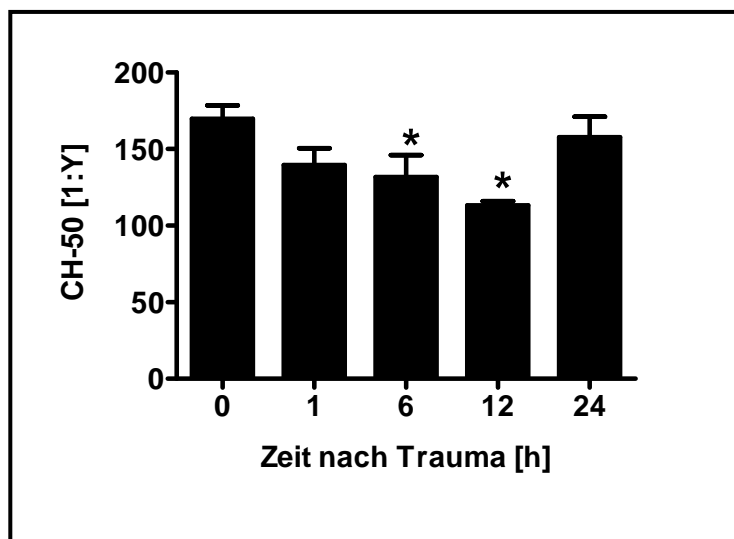
Sämtliche Werte wurden als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Die Datensätze und die Unterschiede der Mittelwerte in den Experimentalgruppen wurden durch den Student-Newman-Keuls-Test evaluiert. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant erachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% ( $p < 0,05$ ) war.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 POSTTRAUMATISCHE AKTIVIERUNG UND DYSFUNKTION DES COMPLEMENTSYSTEMS UND DEREN NORMALISIERUNG DURCH ANTI-C5A

##### SYSTEMISCHE AKTIVIERUNG DES COMPLEMENTSYSTEMS NACH STUMPFEM THORAXTRAUMA

Im vorliegenden Thoraxtraumamodell wurden diejenigen Plasmaverdünnungen bestimmt, bei denen 50% opsonisierter Schafserythrozyten durch die im Plasma vorhandenen Complementprodukte lysiert wurden (CH-50). Auffallend war eine signifikante, zeitabhängige Reduktion der hämolytischen Aktivität des Complementsystems (Abb. 6). Um eine equipotente Hämolyse der Schafserythrozyten zu erreichen, waren Verdünnungen von ca. 1:170 in unbehandelten Kontrolltieren und 1:120 in traumatisierten Ratten 12 h post Trauma notwendig.

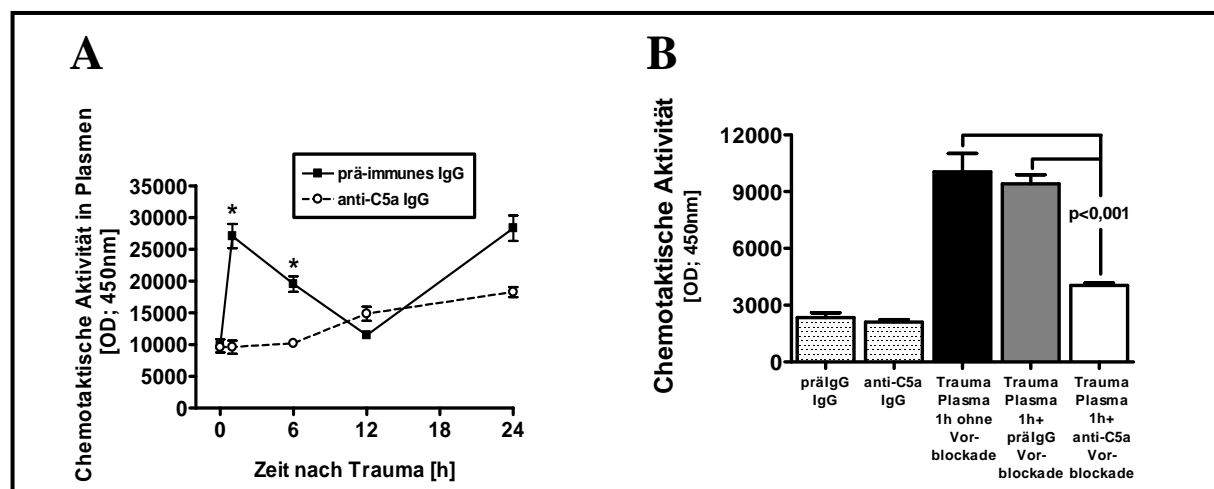


**Abb. 6 : HÄMOLYTISCHE AKTIVITÄT DES COMPLEMENTSYSTEMS IN TRAUMAPLASMEN (CH-50).**

Sensitivierte Schafserythrozyten wurden verschiedenen Verdünnungen der Traumaplasmen ausgesetzt und diejenige Verdünnung ermittelt, die 50% der opsonisierten Schafserythrozyten lysiert (siehe Material und Methoden für detailliertere Angaben). \* statistisch signifikante Reduktion im Vergleich zu Kontrolltieren. n = 4-6 pro Zeitpunkt. h = Zeit in Stunden, CH-50 = hämolytische Complementaktivität, die 50% der sensitivierten Schafserythrozyten lysiert.

DIE CHEMOTAKTISCHE POTENZ VON TRAUMAPLASMEN IST C5A-ABHÄNGIG

Die C5a-Konzentrationen in Rattenplasmen nach Thoraxtrauma wurden über die C5a-Abhängigkeit der chemotaktischen Aktivität der Plasmen eingeschätzt. Wie in Abb. 7A dargestellt, zeigten die Plasmen der mit prä-immunem IgG behandelten Tiere eine frühe, signifikante Erhöhung ihrer chemotaktischen Aktivität, welche 1 h nach Thoraxtrauma ihren Höhepunkt erreichte und im weiteren Zeitverlauf bis zu 12 h nach Trauma deutlich abfiel. Im Gegensatz dazu zeigten die Trauma-Plasmen der mit anti-C5a Antikörpern behandelten Tiere eine weitaus balanciertere, im Zeitverlauf eher ansteigende chemotaktischen Aktivität (Abb. 7A). Um zu überprüfen, ob der Anstieg der chemotaktischen Aktivität in den Plasmen 1 h nach Trauma C5a-abhängig ist, wurden die Plasmen, die 1 h nach Trauma gewonnen wurden, entweder mit prä-immunem IgG oder mit anti-C5a Antikörpern *in vitro* für 2 h vorinkubiert und erneut einem Chemotaxis-Assay unterzogen. Wie Abb. 7B verdeutlicht, führten anti-C5a-vorbehandelte 1 h-Plasmen im Gegensatz zu mit prä-immunem IgG behandelten Plasmen zu einer signifikant reduzierten chemotaktischen Antwort normaler Ratten Neutrophiler. Um Interaktionen der jeweiligen Antikörper selbst auszuschließen, wurden Kontrollen von prä-immunem IgG bzw. anti-C5a IgG in HBSS eingeschlossen, die allesamt keine signifikante chemotaktische Antwort bewirkten. Durch diese *in vitro* Versuche ließen sich erhöhte C5a-Konzentrationen in Plasmen 1 h nach stumpfem Thoraxtrauma indirekt nachweisen.

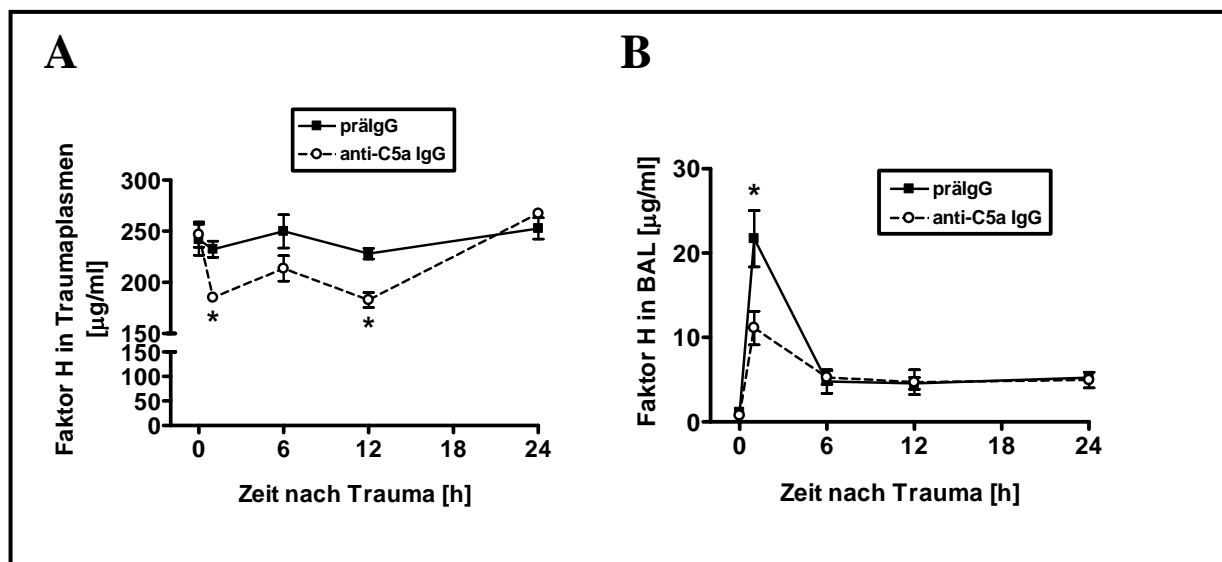


**Abb. 7: CHEMOTAKTISCHE AKTIVITÄT VON PLASMEN TRAUMATISierter RATTEN.**

(A) Zeitkurve nach stumpfem Thoraxtrauma von mit präimmunem IgG (schwarze Kreise) bzw. anti-C5a Antikörpern behandelten Tieren (weiße Kreise). \* signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. n = 5-8 pro experimenteller Gruppe. (B) C5a-Abhängigkeit der chemotaktischen Aktivität von Traumaplasmen. Diese wurden *in vitro* entweder mit prä-immunem IgG oder anti-C5a-IgG vorblockiert und dienten anschließend als Stimulus für isolierte Neutrophile von nichttraumatisierten, unbehandelten Kontroll-Ratten. Um jegliche chemotaktische Interferenz mit den blockierenden Antikörpern selbst auszuschließen, wurden beide als Kontrollen inkludiert. n = 6 pro Kondition. OD = optische Dichte („optical density“), h = Zeit in Stunden, präIgG = prä-immunes IgG, anti-C5a IgG = gegen C5a gerichteter Antikörper. P < 0,001 = statistische Signifikanz.

REDUKTION VON FAKTOR H IN PLASMA UND BRONCHOALVEOLÄREN LAVAGEFLÜSSIGKEITEN (BAL)  
DURCH POSTTRAUMATISCHE ANTI-C5A BEHANDLUNG

In vorliegender Arbeit konnten im Vergleich zu scheinbehandelten Ratten eine erhöhte Faktor H Konzentration in den BAL von Tieren nach Thoraxtrauma festgestellt werden. So war die Faktor H Konzentration 1 h nach Trauma signifikant erhöht (Abb. 8B). Anschließend fiel die Faktor H Konzentration auf einen Plateauwert, welcher sich auf einer ca. 3-fachen Erhöhung der Kontrollwerte einpendelte (Daten nicht gezeigt). Sobald die Versuchstiere unmittelbar nach der traumatisierenden Druckwelle anti-C5a Antikörper i.v. injiziert bekamen, reduzierte sich die Faktor H Konzentration in den BAL-Flüssigkeiten signifikant gegenüber der mit prä-immunem IgG behandelten Versuchsgruppe. Ein vergleichbares Muster wurde in den Plasmen nach Thoraxtrauma beobachtet (Abb. 8A), wo ein deutlicher Anstieg des Faktor H in mit prä-immunem IgG behandelten Tieren gemessen wurde mit einem Zenit zwischen 6-12 h post Trauma. Auch hier (12 h posttraumatisch) zeigte die systemische anti-C5a-Gabe eine signifikante Reduktion der erhöhten Faktor H-Spiegel.



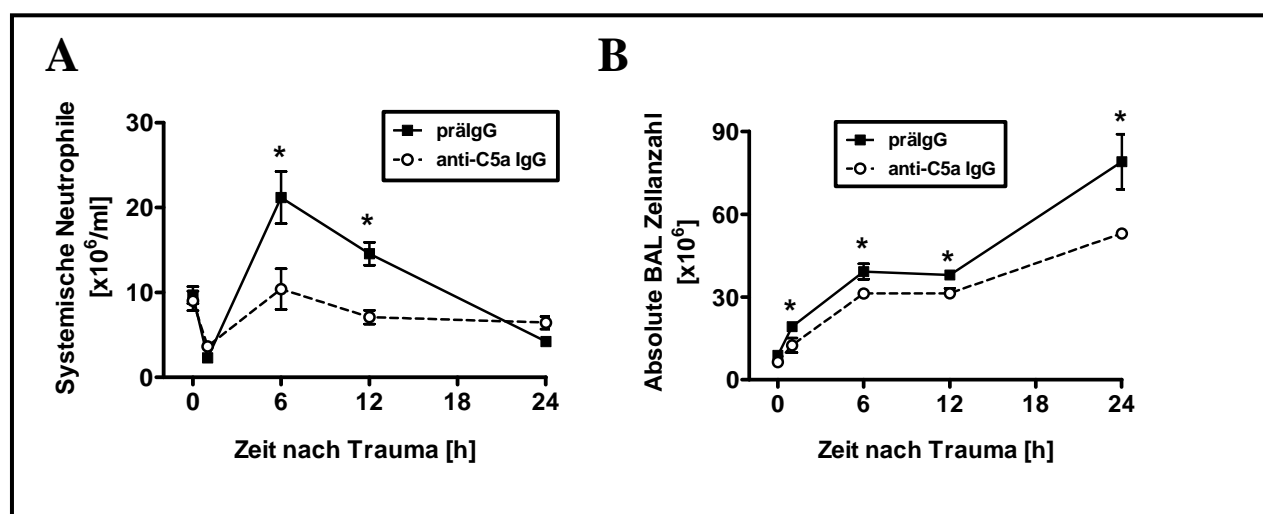
**Abb. 8: EFFEKTE DES STUMPfen THORAXTRAUMAS AUF FAKTOR H KONZENTRATIONEN.**

Faktor H Konzentrationen wurden via ELISA ermittelt in (A) Plasmen bzw. (B) bronchoalveolären Lavagen (BAL) nach Traumaapplikation. Für jede experimentelle Bedingung, n = 5. \* signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. h = Zeit in Stunden, präIgG = prä-immunes IgG, anti-C5a IgG = gegen C5a gerichteter Antikörper.

### 3.2 DIE ZELLULÄRE ANTWORT NACH THORAXTRAUMA IST C5A-ABHÄNGIG

#### SYSTEMISCHE NEUTROPHILEN REKRUTIERUNG UND LOKALE REKRUTIERUNG VON NEUTROPHILEN IN DEN BRONCHOALVEOLARRAUM DURCH STUMPFES THORAXTRAUMA IST C5A-ABHÄNGIG

Nur wenig ist über die systemischen Folgen des stumpfen Thoraxtraumas auf Neutrophile bekannt. Direkt nach Applikation der Druckwelle fiel die systemische Anzahl der Ratten-Neutrophilen signifikant ab (bis 1 h post Trauma). Anschließend zeigte sich eine deutliche Neutrophilenrekrutierung mit Spitzenwerten nach 3 bis 6 h. Der Wert der Kontrolltiere wurde 24 h nach Trauma wieder nahezu erreicht. Während die unmittelbar posttraumatische Applikation von prä-immunem IgG-Antikörper keine Veränderung dieser systemischen Effekte mit sich brachte, konnte die Rekrutierung der Neutrophilen durch die Gabe von anti-C5a Antikörper (i.v., direkt posttraumatisch) unterdrückt und weitestgehend ausbalanciert werden (Abb. 9A).



**Abb. 9: SYSTEMISCHE UND LOKALE REKRUTIERUNG VON NEUTROPHILEN POST TRAUMA.**

(A) Zeitkurve systemischer Neutrophiler nach stumpfem Thoraxtrauma. Unmittelbar nach Trauma erhielten Ratten intravenös entweder prä-immunes IgG (schwarze Symbole) oder anti-C5a IgG (weiße Symbole). (B) Zeitabhängigkeit der absoluten Zellanzahl in BAL. Traumatisierte Ratten erhielten entweder prä-immunes IgG (schwarze Balken) oder anti-C5a (weiße Balken) intravenös.  $n = 5-8$  pro experimenteller Bedingung. \* signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. h = Zeit in Stunden, präIgG = prä-immunes IgG, anti-C5a IgG = gegen C5a gerichteter Antikörper

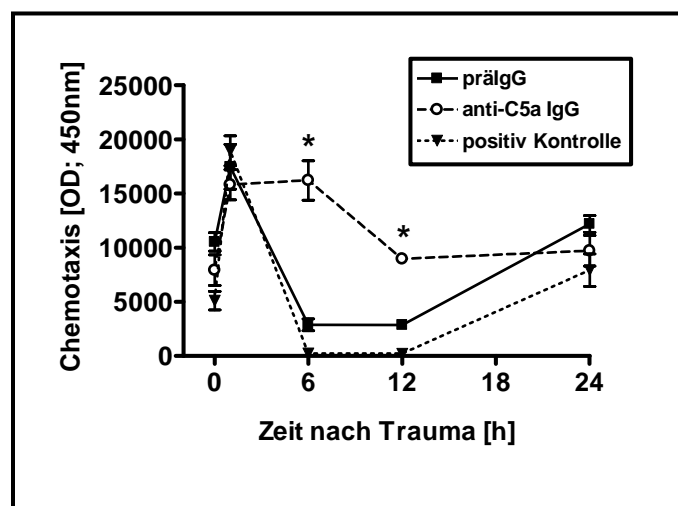
Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach experimentellem Trauma wurde die absolute Zellzahl in bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten (BAL) ermittelt. Wie in Abb. 9B dargestellt, zeigte sich eine stetige, zeitabhängige Zellakkumulation im Bronchoalveolarraum, die 24 h nach

Trauma ein Maximum erreicht. Diese Trauma-induzierte, lokale Zellanhäufung wurde durch systemische C5a-Blockade abgeschwächt.

### 3.3 NORMALISIERUNG DER POSTTRAUMATISCHEN NEUTROPHILEN-DYSFUNKTION DURCH ANTI-C5A

#### ABSCHWÄCHUNG DER THORAXTRAUMA-INDUZIERTEN CHEMOTAKTISCHEN DYSFUNKTION VON NEUTROPHILEN DURCH SYSTEMISCHE C5A-BLOCKADE

Neutrophile wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Trauma verschiedenen chemotaktischen Reizen (rekombinantem Ratten-C5a oder fMLP) ausgesetzt und die zelluläre chemotaktische Aktivität bestimmt. In der frühen posttraumatischen Phase (1 h post Trauma) zeigten Neutrophile eine Zunahme ihrer chemotaktischen Antwort, gefolgt von einer länger dauernden Unterdrückung der chemotaktischen Aktivität (6-12 h). Erst 24 h nach Trauma erreichten die Neutrophilen wieder ihre chemotaktische Ausgangsaktivität (Abb. 9A). Sobald die Thoraxtrauma-Ratten mit intravenösem anti-C5a behandelt wurden, verbesserte sich die chemotaktische Aktivität der isolierten Blut Neutrophilen signifikant sowohl auf fMLP ( $10^{-6}$ M) (Abb. 10), als auch auf Ratten-C5a (50 ng/ml, 6-12 h; nicht gezeigte Daten).

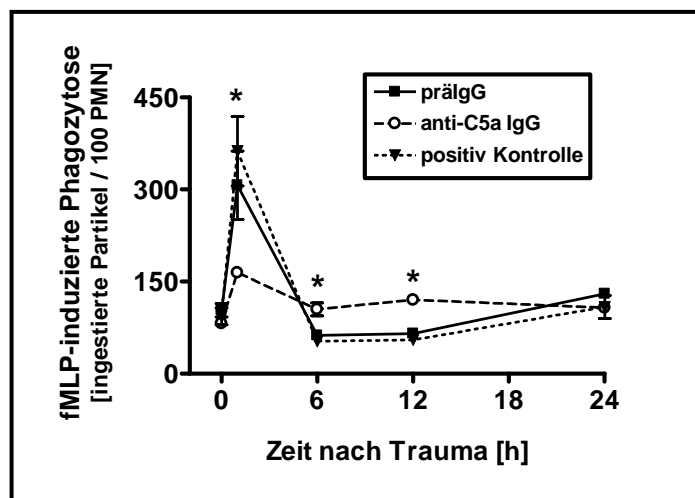


**Abb. 10:** CHEMOTAKTISCHE AKTIVITÄT SYSTEMISCHER NEUTROPHILER POST TRAUMA AUF fMLP-STIMULUS ( $10^{-6}$  M).

Zeitverlauf der chemotaktische Aktivität systemischer Neutrophiler von traumatisierten, ansonsten unbehandelten Tieren (positiv Kontrolle – schwarze Dreiecke). Behandlung mit prä-immunem IgG sind als schwarze Quadrate und anti-C5a behandelte Tiere als weiße Kreise dargestellt. \* zeigt statistische Signifikanz zwischen prä-immuner IgG und anti-C5a Behandlung an. n = 5 pro Zeitpunkt und experimenteller Kondition. h = Zeit in Stunden, prälgG = prä-immunes IgG, anti-C5a IgG = gegen C5a gerichteter Antikörper, OD = optische Dichte („optical density“).

HEMMUNG DER TRAUMA-INDUZIERTEN PHAGOZYTOTISCHEN DYSFUNKTION VON NEUTROPHILEN DURCH C5A-BLOCKADE

In vorliegender Arbeit zeigte die fMLP-induzierte Aufnahme von opsonisierten, fluoreszierenden Mikropartikeln durch Neutrophile einen Aktivitätsgipfel unmittelbar nach Thoraxtrauma und anschließend eine länger andauernde Unterdrückung von 3-12 h post Trauma in mit prä-immunem IgG behandelten Ratten. Die Zellen erreichten 24 h nach Traumaexposition wieder ihre phagozytotische Ausgangsaktivität. Sowohl der initiale Aktivitätsgipfel, als auch die folgende Suppression der phagozytotischen Kapazität der Neutrophilen konnte durch systemische Gabe von anti-C5a Antikörpern reduziert werden (Abb. 11). Durch C5a-Blockade zeigten die Zellen eine äußerst balancierte und adäquate phagozytotische Antwort über das gesamte Beobachtungszeitfenster von 0-24 h post Trauma. Effekte durch prä-immunes IgG und anti-C5a Antikörper selbst wurden durch parallele Experimente ausgeschlossen, indem der Zeitverlauf der phagozytotischen Aktivität nach Trauma ohne jegliche Behandlung untersucht wurden (Abb. 11)

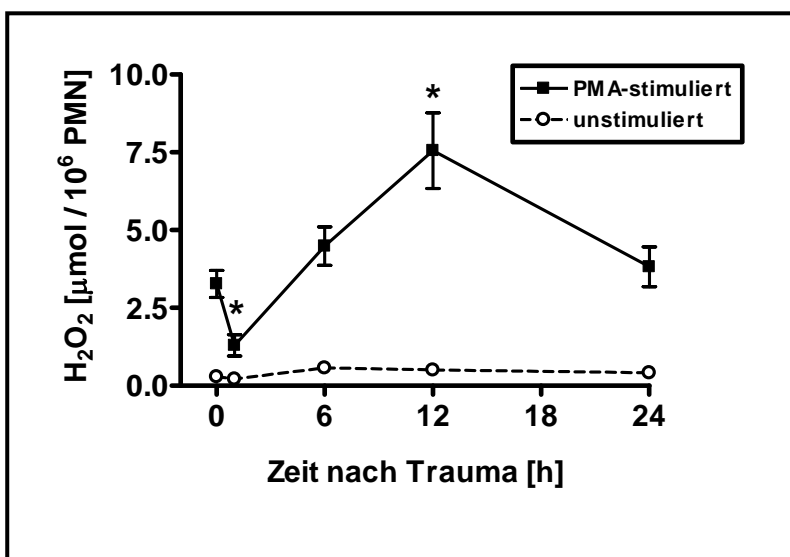


**Abb. 11: PHAGOZYTOTISCHE AKTIVITÄT SYSTEMISCHER NEUTROPHILER GRANULOZYTEN NACH STUPPFEM THORAXTRAUMA.**

Als Kontrolle dienten Neutrophile, welche aus traumatisierten, aber anderweitig unbehandelten Ratten gewonnen und *in vitro* fMLP ( $10^{-6}$  M) als Stimulus ausgesetzt wurden (Positivkontrollen, schwarze Dreiecke). Die fMLP ( $10^{-6}$  M)-induzierte phagozytotische Aktivität nach intravenöser Applikation von prä-immunem IgG sind als schwarze Quadrate und anti-C5a als weiße Kreise dargestellt. Die phagozytotische Ingestition wurde von jeweils 400 Neutrophilen pro Zeitpunkt ermittelt (n = 5-7). \* zeigt statistische Signifikanz zwischen prä-immuner IgG und anti-C5a Behandlung an. h = Zeit in Stunden, präIgG = prä-immunes IgG, anti-C5a IgG = gegen C5a gerichteter Antikörper, fMLP = „N-Formylmethionine leucyl-phenylalanine“, Bestandteil der Bakterienwand.

BIPHASISCHE ANTWORT DES „OXIDATIVE BURST“ VON NEUTROPHILEN NACH TRAUMA

Die „oxidative burst“-Analyse mittels  $H_2O_2$ -Messungen von PMA-stimulierten Neutrophilen (25 ng/ml), ergab nach Thoraxtrauma eine zeitabhängige, biphasische Immunantwort. Während die Generierung von  $H_2O_2$  im Verlauf der frühen posttraumatischen Phase signifikant unterdrückt wurde, war 12 h nach Thoraxtrauma eine erhöhte  $H_2O_2$ -Produktion zu beobachten; auch hier wurden die Ausgangswerte 24 h nach Traumaapplikation nahezu wieder erreicht (Abb. 12). Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Daten kam es hier durch eine C5a-Blockade zu keiner signifikanten Änderung der „oxidative burst“ Antwort (nicht gezeigte Daten).



**Abb. 12:** „OXIDATIVE BURST“ ( $H_2O_2$ -PRODUKTION) DER NEUTROPHILEN ERMITTELT 0-24 H POST TRAUMA.

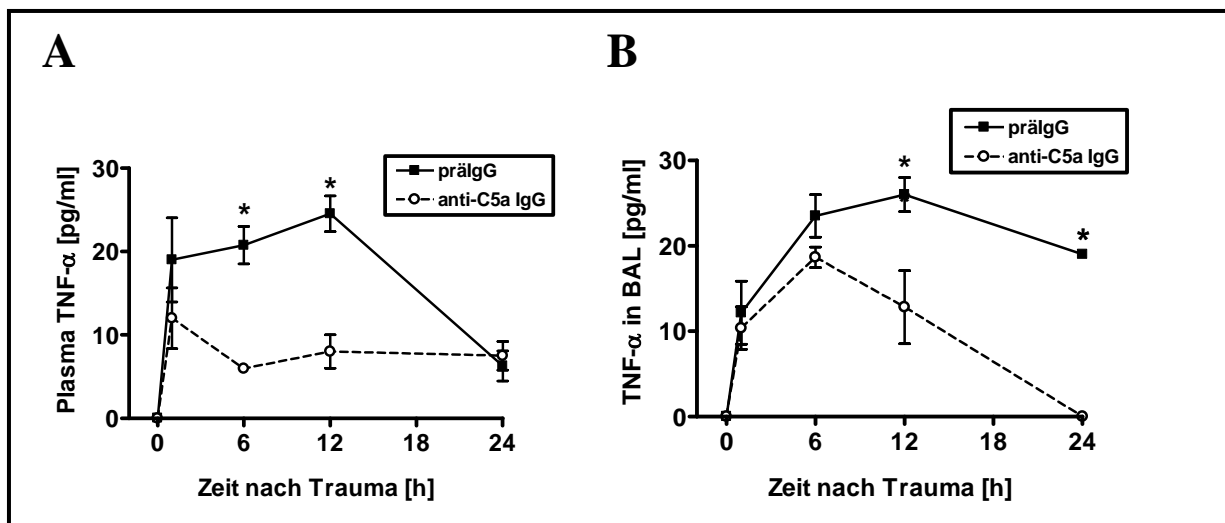
Nach Zellisolation wurden die Neutrophilen *in vitro* mit entweder 100 ng/ml PMA (schwarze Dreiecke) oder HBSS (weiße Dreiecke) stimuliert (n = 5-8 für jeden Zeitpunkt). \* statistische Signifikanz zwischen den beiden Gruppen.  $H_2O_2$  = Wasserstoffperoxid, PMN = neutrophile Granulozyten („polymorphonuclear leukocytes“), h = Zeit in Stunden, PMA = Phorbol-Myristat-Acetat.



### 3.4 WIRKUNG EINER C5A-BLOCKADE AUF DIE TRAUMA-INDUZIERTEN VERÄNDERUNGEN DER ZYTOKIN-/CHEMOKIN-PRODUKTION

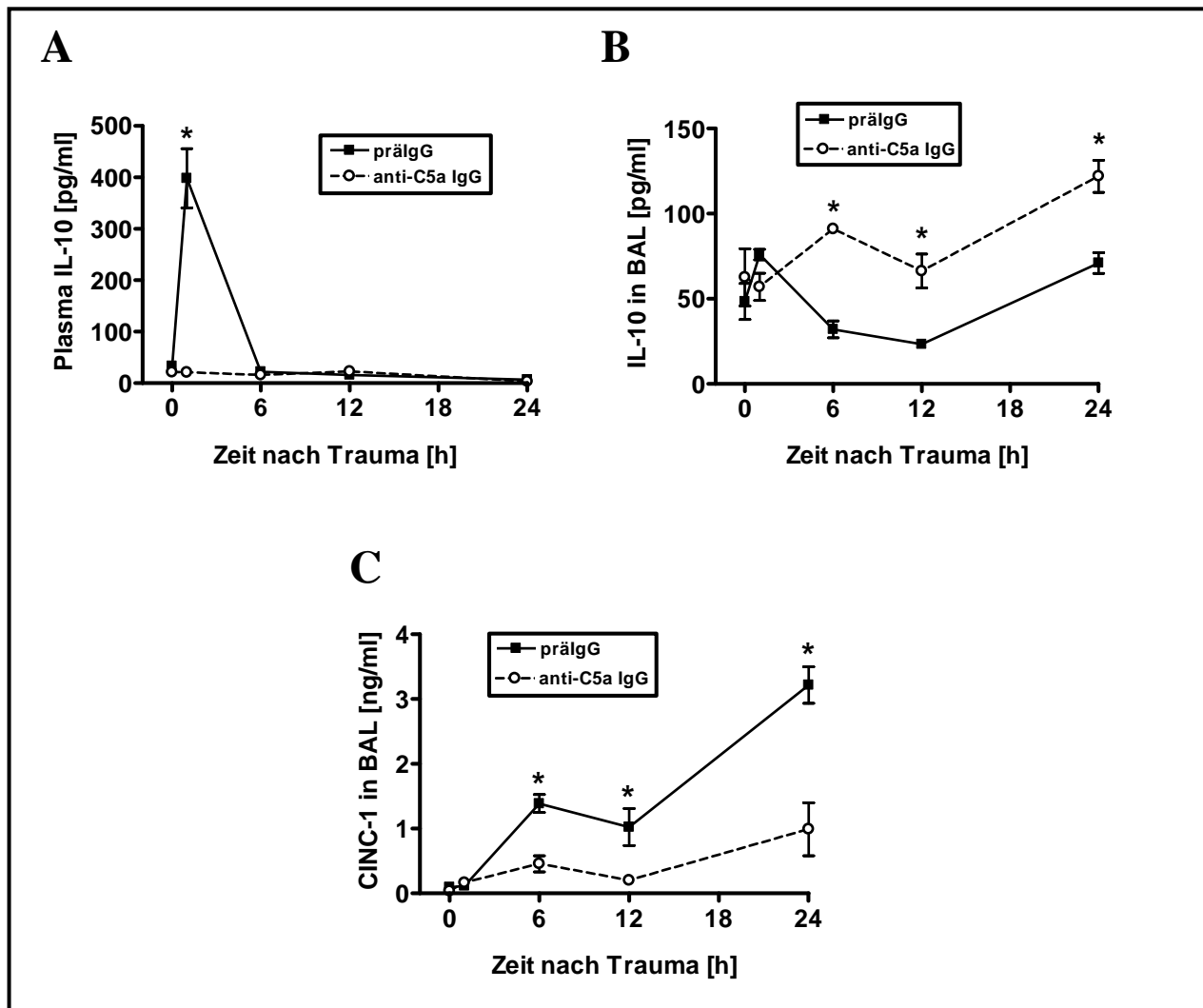
#### REDUKTION DER TRAUMA-INDUZIERTEN ERHÖHUNG VON ZYTOKIN-/CHEMOKIN-KONZENTRATIONEN DURCH ANTI-C5A BEHANDLUNG

In vorliegendem Modell wurden erhöhte systemische Plasmakonzentrationen von TNF $\alpha$  und IL-10 (je 1 h post Trauma) gemessen. Auch die lokale Zytokin-/Chemokin-Konzentration von IL-10 und MCP-1 in BAL-Flüssigkeiten war 1 h bzw. 6 h posttraumatisch im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöht. Sowohl die systemische wie lokale Zytokin-/Chemokinfreisetzung nach Trauma konnte durch eine systemische C5a-Blockade weitgehend reduziert werden (Abb. 13 und Abb. 14).



**Abb. 13:** EFFEKTE DES STUMPFFEN THORAXTRAUMAS AUF LOKALE UND SYSTEMISCHE KONZENTRATIONEN AUSGEWÄHLTER ZYTOKINE UND CHEMOKINE.

Ermittelt in Plasmen und BAL mittels ELISA. Dargestellt sind Zeitverläufe von TNF- $\alpha$  in Traumaplasmen (A) und BAL (B). Anti-C5a IgG = intravenöse Applikation von anti-C5a-Antikörpern unmittelbar nach Trauma, prälgG = präimmune IgG Antikörper zu gleichem Zeitpunkt. Für jede experimentelle Kondition, n = 5. \* zeigt statistische Signifikanz zwischen prä-immuner IgG und anti-C5a Behandlung an. h = Zeit in Stunden, prälgG = prä-immunes IgG, anti-C5a IgG = gegen C5a gerichteter Antikörper, TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , BAL = Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeiten.



**Abb. 14: EFFEKTE DES STUPFEN THORAXTRAUMAS AUF LOKALE UND SYSTEMISCHE KONZENTRATIONEN AUSGEWÄHLTER ZYTOKINE UND CHEMOKINE.**

Ermittelt in Plasmen und BAL mittels ELISA. Dargestellt sind Zeitverläufe von IL-10 in Traumaplasmen (A) und BAL (B) sowie Traumaplasmekonzentration des Chemokins CINC-1 in BAL (C). Anti-C5a IgG = intravenöse Applikation von anti-C5a-Antikörpern unmittelbar nach Trauma, prälgG = präimmune IgG Antikörper zu gleichem Zeitpunkt. \*  $p < 0,05$  zwischen Behandlungsgruppen. Für jede experimentelle Kondition,  $n = 5$ . \* zeigt statistische Signifikanz zwischen prä-immuner IgG und anti-C5a Behandlung an. h = Zeit in Stunden, prälgG = prä-immunes IgG, anti-C5a IgG = gegen C5a gerichteter Antikörper, IL-10 = Interleukin-10, CINC-1 = „Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-1“, BAL = Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeiten.

## 4. DISKUSSION

Die pathophysiologischen Ursachen und Folgen vieler Lungenerkrankungen (wie z.B. Asthma bronchiale, chronisch obstruktive Lungenerkrankung, Pulmonalfibrose etc.) gründen sich überwiegend auf lokalentzündliche, intrapulmonale Reaktionen. Im Gegensatz dazu scheint die „acute lung injury“ (ALI) und das „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) mit vielgestaltigen systemischen Veränderungen vergesellschaftet zu sein [53]. So versterben viele an refraktärer ALI/ARDS erkrankter Patienten weniger an einer isolierten, zunehmenden respiratorischen Insuffizienz, sondern eher an progressiven systemischen Komplikationen, welche sich als SIRS, Sepsis, septischer Schock und multiples Organversagen manifestieren können [83]. Dem Complementaktivierungsprodukt C5a wird aktuell eine Schlüsselrolle in der Entstehung des systemischen Entzündungsgeschehen bis hin zum Multiorganversagen zugesprochen [23, 79]. Neben ihrer respiratorischen Funktion hat die Lunge die Fähigkeit, als zytokin- und complementgenerierendes Organ zu wirken [39]. Da die Lunge die Mehrheit der zirkulierenden Neutrophilen beherbergt [53], vermögen diese problemlos Unmengen verschiedenster proinflammatorischer Mediatoren schlagartig in die systemische Zirkulation freizusetzen, da praktisch das gesamte Blutvolumen innerhalb kürzester Zeit durch ihre Kapillaren strömt [72]. Die lokale Freisetzung dieser proinflammatorischen Mediatoren und insbesondere IL-6 scheint bei dem Trauma-induzierten Zusammenbruch der pulmonalen Endothelzellbarriere beteiligt zu sein und somit mit der systemischen inflammatorischen Reaktion zu korrelieren [61]. Des weiteren sind die nach stumpfem Thoraxtrauma freigesetzten proinflammatorische Mediatoren möglicherweise an apoptotischen Vorgängen in Pneumozyten Typ II beteiligt [69]. In der Pathogenese des extrapulmonalen Organversagens kommt somit der Lunge als Ziel- und Effektororgan während dem ARDS eine weitaus gewichtigere Rolle zu, als bisher angenommen.

Daher wurde in vorliegender Arbeit die globale Entzündungsantwort des angeborenen Immunsystems nach Thoraxtrauma und der Einfluß von C5a durch Funktions-Analyse der systemischen Neutrophilen und des systemischen Complementsystems untersucht. Darüber hinaus wurde die mögliche Schutzwirkung einer Immunmodulation durch anti-C5a Therapie nach Thoraxtrauma evaluiert. Das stumpfe Thoraxtrauma wurde durch eine einzelne Druckwelle induziert, welche eine bilaterale Lungenkontusion nachahmt und jegliche organische

Begleitverletzungen, wie Leber-, Aorten- oder Herzruptur vermeidet und des weiteren die funktionelle und morphologische Integrität der knöchernen Thoraxstrukturen wahrt [46]. Unmittelbar nach dem experimentellen Thoraxtrauma fiel die Anzahl der peripheren Neutrophilen für kurze Zeit rapide ab (siehe Abb. 7A). Diese initiale Leukopenie könnte durch eine vorübergehende, erhöhte Adhärenz der Neutrophilen an das vaskuläre Endothel verursacht sein, wie es nach intravenöser Injektion von C5a oder anderer chemotaktischer Faktoren in Kaninchen beschrieben wurde [44]. Des weiteren verursachen erhöhte C5a-Werte im Serum eine Verklebung der Neutrophilen *in vivo* und *in vitro* [10, 28], welche theoretisch, in Kombination mit einer möglichen druckwelleninduzierten Zelldeformität zu einer Verstopfung der Kapillaren mit nachfolgendem Sistieren der pulmonalen Mikrozirkulation führen könnte. In früheren Studien wurde eine pulmonale Mikrozirkulationsstörung sogar als zentraler pathophysiologischer Ausgangspunkt des ARDS angesehen [27], was jedoch nicht bestätigt werden konnte [53, 83]. Die Fähigkeit zur zellulären Verformung von Neutrophilen korreliert mit TNF $\alpha$ -Konzentrationen im Serum [41], welche in vorliegender Studie ebenfalls 1 h nach Thoraxtrauma ihre maximalen Werte erreichte (von  $7 \pm 6$  auf  $87 \pm 18$  pg/ml, Tabelle I). Die initiale Leukopenie war gefolgt von einer deutlichen Leukozytose, die 24 h post Trauma wieder Normalwerte erreichte. Denkbar wäre, dass dieser Anstieg durch Rekrutierung von Neutrophilen aus dem Knochenmark zustande kommt. Die Ausschwemmung von Neutrophilen aus dem Knochenmark wurde ebenfalls als C5a-abhängig beschrieben [44]. Dafür spricht, dass in vorliegender Arbeit posttraumatisch ebenfalls eine C5a-abhängige, systemische Rekrutierung von Neutrophilen gefunden wurde und die anti-C5a Antikörper zwar weitgehend die massive Ausschwemmung Neutrophiler, nicht jedoch die initiale Leukopenie verhindern konnte. Auch die Neutrophilenfunktion wurde durch das stumpfe Thoraxtrauma mit initialer Erhöhung der phagozytotischen und chemotaktischen Aktivität posttraumatisch spezifisch verändert (Abb. 9A und 10A). Da die chemotaktische Aktivierung 1 h nach Trauma nicht nur in fMLP-stimulierten-, sondern auch in nicht-stimulierten Neutrophilen beobachtet wurde, liegt eine frühe zelluläre Aktivierung durch das stumpfe Thoraxtrauma nahe. Nach dieser frühen Aktivierung war die chemotaktische und phagozytotische Aktivität der Neutrophilen über einen relativ langen Zeitraum deutlich gehemmt. In traumatisierten Patienten wurde während der fortgeschrittenen Phase ebenfalls eine chemotaktische Dysfunktion trotz fMLP-Stimulation gefunden [54, 76]. Auch in Splenozyten, Makrophagen und Monozyten wurde eine deutlich verminderte Immunantwort nach stumpfen Thoraxtrauma beschrieben [62]. Die Generierung von Sauerstoffradikalen („oxidative burst“) der Neutrophilen nach Thoraxtrauma

zeigte einen biphasischen Verlauf. Denkbar wäre, dass in der frühen posttraumatischen Phase ( $\leq 3$  h nach Lungenkontusion) die signifikant verminderte „oxidative burst“-Antwort der Neutrophilen durch erhöhte C5a-Serumkonzentrationen induziert wurde, die zeitgleich (indirekt) gemessen werden konnte (Abb. 10A). Vor kurzem wurde ein Verlust des „oxidative burst“ und eine C5a-abhängige Dysfunktion der NADPH-Oxidase in Neutrophilen beobachtet [39]. Im Gegensatz dazu wurde während der späten posttraumatischen Phase (12 h nach Trauma) ein erhöhter „oxidative burst“ gefunden, der durch C5a-Blockade nicht beeinflusst wurde. Bei der Beseitigung von Pathogenen erkennen und phagozytieren Neutrophile die Partikel zuerst, bevor sich der „oxidative burst“ in vollem Ausmaß entwickelt. In vorliegendem Fall besteht jedoch eine mehr als 10 stündige Verspätung nach der maximalen Chemotaxis- und Phagozytoseaktivität (siehe Abb. 12). Dadurch könnte ein unregulierter und ungerichteter „oxidativer Streß“ auf das Lungengewebe ausgeübt werden, welcher in Folge Eigengewebe zerstören und die Entstehung von lungenfibrotischen Prozessen vorantreiben kann [81].

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Tiermodelle bemüht, um die dem ARDS zugrunde liegende Pathophysiologie und deren Konsequenzen näher zu analysieren und zu verstehen. Obwohl viele der immunologisch-inflammatorischen Modelle zu großen Fortschritten im grundsätzlichen Verständnis des ARDS führten, lassen die meisten dieser Modelle leider eine klinische Übertragbarkeit und Relevanz vermissen und erschweren dadurch einen adäquaten „from bench to bedside“-Transfer der Forschungsergebnisse. Einer der Gründe dafür mag in der Tatsache liegen, dass das ARDS ein völlig uneinheitliches, polyäthiologisches Krankheitsbild darstellt. Dabei scheinen die Lungen nicht nur durch eine isolierte, lokale Organsverletzung in Mitleidenschaft gezogen und für die ARDS Entwicklung empfänglich zu werden, sondern werden vielmehr bei systemischen Geschehnissen (wie SIRS, Sepsis, Hämolyse oder Pankreatitis) selbst zum inflammatorischen Ziel.

Um extrapulmonale Einflußfaktoren zu minimieren und dieselbigen zu untersuchen, entwickelten Irwin et al. ein Rattenmodell der Lungenkontusion [42], welches organische Begleitverletzungen vermeidet und die funktionelle und morphologische Integrität der knöchernen Thoraxstrukturen bewahrt. So wurde in vorliegender Arbeit dieses kliniknahe Modell verwendet, welches, leicht modifiziert, eine isolierte beidseitige Lungenkontusion induziert [46]. In vorliegender Studie zeigte sich, dass die exakte Entfernung der Mündung des Druckwellengenerators zum Rattenthorax als kritischer Faktor anzusehen ist. Während ein Abstand von 3 cm nur noch leichte Symptome hervorrief, wurde durch eine Verringerung auf 1

cm nahezu immer eine letale Apnoe auf dem Boden von Lungen-, Herz- und Gefäßverletzung erzeugt, so dass die Ratten direkt post Trauma verstarben. Somit wurde in vorhergegangene Studien ein Abstand von 2 cm als optimal erachtet [50]. In vorliegender Arbeit verstarben (in einem Beobachtungszeitraum von 24 h) von sämtlichen Versuchstieren lediglich zwei an Herzrupturen (2/90). Kritisch zu hinterfragen ist, ob das vorliegende Thoraxtrauma Modell zum Vollbild des ARDS führt, da trotz inflammatorischer Reaktion eine Spätletalität nicht beobachtet wurde.

Andere Modelle wie die IgG-Immunkomplex-induzierte Lungenverletzung gaben erste Hinweise auf die zentrale Schlüsselrolle des C5a Moleküls in der Entwicklung der komplexen inflammatorischen Antwort nach intraalveolärer Immunkomplex Platzierung. Die ausgeprägte intraalveoläre Immunreaktion wurde durch massive Aktivierung des Complementsystems, Generierung diverser Zytokinen/Chemokinen und Rekrutierung unterschiedlicher Phagozyten hervorgerufen [5, 57]. In diesen Immunkomplexmodellen vermochte jedoch lediglich die lokale (intratracheale) Instillation von anti-C5a Antikörpern entsprechende Entzündungszeichen *in vivo* zu hemmen, während eine systemische C5a-Blockade keinen protektiven Effekt zeigte [57, 80]. Im Gegensatz dazu wurde in CVF-induzierten ALI-Modellen nur bei systemischer C5a-Blockade eine gegensätzliche Schutzwirkung gefunden [80], was mit einer Kompartimentalisierung der Complementaktivierung erklärt wurde. So wurde gemutmaßt, dass die lokale, intraalveoläre Complementaktivierung durch IgG-Immunkomplexe auf die Lungen beschränkt bleibt und die systemische Complementaktivierung durch CVF ein vorwiegend intravaskuläres Geschehen darstellt. In vorliegender Arbeit ergeben sich jedoch Hinweise, dass sowohl im alveolären als auch intravaskulären Kompartiment Complement aktiviert wurde, da die systemische (intravenöse) Applikation von anti-C5a Antikörpern offensichtlich auch im alveolären Kompartiment die Entzündungsantwort zu unterdrücken vermochte (verminderte intraalveoläre Zellrekrutierung und reduzierte Neutrophilenakkumulation in bronchoalveolären Lavagen). Parallel hierzu wurde auch in Zytokin/Chemokin-Messungen in Plasmen und BAL-Flüssigkeiten ein deutlicher protektiver Effekt durch anti-C5a Antikörper gefunden (Tab. I). Somit liegt nahe, dass im vorliegenden Modell sowohl eine intravaskuläre als auch intraalveoläre Complementaktivierung stattfindet, oder aber dem Entzündungsgeschehen keine Grenzen durch unterschiedliche Kompartimente gesetzt sind und sowohl eine lokale als auch eine ungerichtete systemische Entzündung durch das stumpfe Thoraxtrauma erzeugt wird.

Erhöhte C5a-Plasmakonzentrationen können mit einer schwerwiegenden Neutrophilen-Dysfunktion vergesellschaftet sein. So wurde durch exzessives C5a eine Herunterregulation des C5a-Rezeptors (C5aR), eine reduzierte chemotaktische und phagozytotische Aktivität sowie eine verminderte Produktion von Sauerstoffradikalen („oxidative burst“) beschrieben [35, 39], was letztlich zu einer herabgesetzten Bakterienvernichtung führen kann. In einzelnen Primaten wurde bereits vor vielen Jahren ein protektiver Effekt von anti-C5a Antikörpern im ARDS- und Sepsis-Modell beobachtet [75]. Allerdings konzentrierten sich diese Studien auf die Verbesserung der kardiopulmonalen Funktion und beschrieben vereinzelt verbesserte Überlebensraten und wurden nicht weiter verfolgt. Im vorliegenden Ratten-Tiermodell wurde durch das stumpfe Thoraxtrauma eine Aktivierung des Complementsystems induziert, wie durch den Complementverbrauch in CH-50 Assays deutlich wurde. Seren von traumatisierten Ratten wiesen im Zeitverlauf eine rückläufige hämolytische Aktivität auf. Zusätzlich war die C5a-abhängige, chemotaktische Aktivität von mit präimmunem IgG-behandelten Tieren 12 h post Trauma signifikant reduziert, während die chemotaktische Aktivität unter C5a-Blockade aufrechterhalten wurde. Unlängst konnte gezeigt werden, dass C5a die Produktion eines der wichtigsten endogenen Inhibitoren des Complementsystems, des Faktor H, erhöht [67]. Dieses lösliche Protein verhindert die Bindung des aktivierten Faktor B (Bb) an C3b, unterstützt die Dissoziation des C3bBb-Komplexes („Decay“-beschleunigende Aktivität) und fungiert als Kofaktor für die Spaltung von C3b durch den Faktor I [91]. Daher reguliert C5a möglicherweise selbst die Produktion des Faktor H im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife. In vorliegender Studie wurde im Plasma und in BAL-Flüssigkeiten durch C5a-Blockade der Faktor H vermindert vorgefunden (siehe Abb. 13A und 13B). Schlaf et al. schlußfolgerten in einer kürzlich publizierten Studie, dass erhöhte Faktor H Serumkonzentrationen mit erhöhten C5a-Konzentrationen korreliert [67]. Eine Stunde nach Thoraxtrauma waren die Faktor H-Konzentrationen in den bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten deutlich erhöht (Abb. 13B). Dies könnte möglicherweise durch erhöhte C5a-Produktion erklärt werden. Unterstützt wird dies von der Tatsache, dass anti-C5a Antikörper die Faktor H Konzentration in den Lavageflüssigkeiten eindeutig verringern konnte (siehe Abb. 13B). Parallel dazu fiel in den Plasmen traumatisierter Ratten 12 h nach Lungenkontusion ebenfalls eine Faktor H-Erhöhung auf. Auch dieser Effekt konnte durch C5a-Blockade beinahe bis auf den 12 h-Kontrollwert verringert werden (siehe Abb. 13A). Es liegt nahe zu spekulieren, dass die Neutralisation von C5a durch den oben beschriebenen negativen Rückkopplungsmechanismus zu einer verminderten Produktion von Faktor H und damit zu einer

balancierteren und besser gesteuerten Complementaktivierung unter Beibehaltung der hämolytischen Aktivität führten könnte. Zukünftige Experimente werden jedoch die exakte Rolle von C5a auf die Regulatoren der Complementkaskade näher definieren müssen.

Die vorliegende Arbeit gibt erstmalig Hinweise auf eine sowohl lokale wie systemische Complementaktivierung im experimentellen stumpfen Thoraxtrauma. Des weiteren ergaben sich erste Hinweise, dass vor allem das Anaphylatoxin C5a im vorliegenden Lungenkontusionsmodell zu einer massiven Dysfunktion des angeborenen Immunsystems führt. Die intravenöse Administration von anti-C5a Antikörper erbrachte nicht nur protektive systemische Effekte, sondern vermochte sogar die lokale, pulmonale Entzündungsreaktion posttraumatisch abzuschwächen. Die C5a-Blockade könnte somit einen neuen therapeutischen Ansatz für die Funktionsverbesserung des geschwächten angeborenen Immunsystems nach Thoraxtrauma darstellen.





## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die dem schweren stumpfen Thoraxtrauma folgende entzündliche Reaktion mündet häufig im akuten Lungenversagen („acute respiratory distress syndrome“, ARDS), welches mit einer hohen Letalitätsrate vergesellschaftet ist. Während die *lokale* Entzündungsantwort auf die akute Lungenverletzung intensiv untersucht wurde, ist die *systemische* posttraumatische Immunantwort nach Lungenverletzung nur unzureichend erforscht. Daher wurde in vorliegender Arbeit hypothetisiert, dass durch Trauma-induzierte Lungenkontusion systemische Complementfaktoren aktiviert werden, welche systemische Neutrophile in ihrer bakteriziden Funktionalität signifikant beeinträchtigen.

Das stumpfe Thoraxtrauma mit bilateraler Lungenkontusion wurde in Ratten durch eine singuläre, auf den Thorax zentrierte Druckwelle erzeugt. Es wurden systemisch wie lokal Complementaktivierung, Neutrophilenakkumulation, Neutrophilenfunktionen, entzündliche Mediatorproduktion, sowie der Effekt einer systemischen C5a-Blockade untersucht.

Die systemische Complementfunktion war nach Thoraxtrauma in ihrer hämolytischen Aktivität deutlich reduziert. Des weiteren wurde eine C5a-abhängige systemische Rekrutierung von Neutrophilen beobachtet, welche mit dramatischen Veränderungen der Neutrophilenfunktionen einherging. Nach kurzer, initialer Aktivierung waren die systemischen Neutrophilen signifikant in ihrer phagozytotischen und chemotaktischen Aktivität reduziert, während der „oxidative burst“ ein umgekehrtes Muster zeigte. Die zellulären Funktionsstörungen konnten durch eine unmittelbar posttraumatische, intravenöse Applikation von anti-C5a Antikörper weitestgehend rückgängig gemacht werden. Auch die Trauma-induzierte Verminderung der chemotaktischen Serumaktivität fand sich C5a-abhängig. Darüber hinaus wurde die lokal-alveoläre Rekrutierung von Entzündungszellen (Neutrophilen und Alveolarmakrophagen) und Entzündungsmediatoren durch die systemische C5a-Blockade abgeschwächt.

Vorliegende Daten legen beim stumpfen Thoraxtrauma eine systemische Aktivierung des Complementsystems mir nachfolgender, C5a-abhängiger Dysfunktion der Neutrophilen nahe. Daher mag C5a vielleicht ein zukünftiges Ziel für therapeutische Immunomodulation bieten und dessen Blockade ein Fortschreiten der Entzündungsreaktion nach stumpfem Thoraxtrauma und die Entwicklung des akuten Lungenversagen („acute respiratory distress syndrome“, ARDS) verhindern.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT: Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52: 741-744 (1973)
2. Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D: Epidemiology of the severely injured patient. A prospective assessment of preclinical and clinical management. *AG Polytrauma of DGU. Unfallchirurg* 103: 355-363 (2000)
3. Bernofsky C: Nucleotide chloramines and neutrophil-mediated cytotoxicity. *Faseb J* 5: 295-300 (1991)
4. 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)
5. 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)
6. Borregaard N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA: Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J Cell Biol* 97: 52-61 (1983)
7. 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)
8. Clark CJ, Pollock AJ, Reid WH, Campbell D, Gemmell C: Role of pulmonary alveolar macrophage activation in acute lung injury after burns and smoke inhalation. *Lancet* 2: 872-874 (1988)
9. Clark R: Extracellular effects of myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. In: Weissmann G (Hrsg) *Advances in inflammatory research*, 5. Aufl, Raven Press, S. 107-146 (1983)

10. Craddock PR, Hammerschmidt D, White JG, Dalmosso AP, Jacob HS: Complement (C5-a)-induced granulocyte aggregation in vitro. A possible mechanism of complement-mediated leukostasis and leukopenia. *J Clin Invest* 60: 260-264 (1977)
11. Czermak BJ, Sarma V, Pierson CL, Warner RL, Huber-Lang M, Bless NM, Schmal H, Friedl HP, Ward PA: Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nat Med* 5: 788-792 (1999)
12. Dallegri F, Goretti R, Ballestrero A, Ottonello L, Patrone F: Neutrophil-induced depletion of adenosine triphosphate in target cells: evidence for a hypochlorous acid-mediated process. *J Lab Clin Med* 112: 765-772 (1988)
13. Demberg T, Pollok-Kopp B, Gerke D, Gotze O, Schlaf G: Rat complement factor H: molecular cloning, sequencing and quantification with a newly established ELISA. *Scand J Immunol* 56: 149-160 (2002)
14. Dempsey PW, Vaidya SA, Cheng G: The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci* 60: 2604-2621 (2003)
15. Desaga H: Blast injuries. In: Office UGP (Hrsg) *German Aviation Medicine*, 2. Aufl, S. 1274-1293 (1950)
16. Eisner MD, Thompson T, Hudson LD, Luce JM, Hayden D, Schoenfeld D, Matthay MA: Efficacy of low tidal volume ventilation in patients with different clinical risk factors for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 231-236 (2001)
17. Elsayed NM: Toxicology of blast overpressure. *Toxicology* 121: 1-15 (1997)
18. Frank JA, Matthay MA: Science review: mechanisms of ventilator-induced injury. *Crit Care* 7: 233-241 (2003)
19. Fujita T: Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2: 346-353 (2002)
20. Fulton JF: Blast and concussion in the present war. *N Engl J Med*. 226: 1 (1942)
21. Garzon AA, Gourin A, Seltzer B, Chiu CJ, Karlson KE: Severe blunt chest trauma. Studies of pulmonary mechanics and blood gases. *Ann Thorac Surg* 2: 629-639 (1966)
22. Geerts L, Jorens PG, Willems J, De Ley M, Slegers H: Natural inhibitors of neutrophil function in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 29: 1920-1924 (2001)
23. Gerard C: Complement C5a in the sepsis syndrome--too much of a good thing? *N Engl J Med* 348: 167-169 (2003)

24. Gerard C, Gerard NP: C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu Rev Immunol* 12: 775-808 (1994)
25. Goss CH, Brower RG, Hudson LD, Rubenfeld GD: Incidence of acute lung injury in the United States. *Crit Care Med* 31: 1607-1611 (2003)
26. Gurka DP: Acute Respiratory Failure, Including Acute Lung Injury and ARDS. In: Ross A (Hrsg) *Critical Care Medicine - Principles of diagnosis and management in the adult*, 2. Aufl, Mosby, S. 705-723 (2001)
27. Hammerschmidt DE, Weaver LJ, Hudson LD, Craddock PR, Jacob HS: Association of complement activation and elevated plasma-C5a with adult respiratory distress syndrome. Pathophysiological relevance and possible prognostic value. *Lancet* 1: 947-949 (1980)
28. Hammerschmidt DE, White JG, Craddock PR, Jacob HS: Corticosteroids inhibit complement-induced granulocyte aggregation. A possible mechanism for their efficacy in shock states. *J Clin Invest* 63: 798-803 (1979)
29. Headley AS, Tolley E, Meduri GU: Infections and the inflammatory response in acute respiratory distress syndrome. *Chest* 111: 1306-1321 (1997)
30. Henson PM, Johnston RB, Jr.: Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. *J Clin Invest* 79: 669-674 (1987)
31. Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM, Matte-Martyn A, Diaz-Granados N, Al-Saidi F, Cooper AB, Guest CB, Mazer CD, Mehta S, Stewart TE, Barr A, Cook D, Slutsky AS: One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 348: 683-693 (2003)
32. Hildebrand F, Giannoudis PV, Griensven M, Zelle B, Ulmer B, Krettek C, Bellamy MC, Pape HC: Management of polytraumatized patients with associated blunt chest trauma: a comparison of two European countries. *Injury* 36: 293-302 (2005)
33. Hildebrandt H, Dornblüh O, Pschyrembel W: In: Hildebrandt H, Dornblüh O, Pschyrembel W (Hrsg) *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 257. Aufl, deGruyter, S. 275 (1994)
34. Hooker DR: Physiological effects of air contusion. *Am J Physiol.* 67: 219-274 (1924)
35. Huber-Lang M, Sarma VJ, Lu KT, McGuire SR, Padgaonkar VA, Guo RF, Younkin EM, Kunkel RG, Ding J, Erickson R, Curnutte JT, Ward PA: Role of C5a in multiorgan failure during sepsis. *J Immunol* 166: 1193-1199 (2001)

36. Huber-Lang M, Younkin EM, Sarma JV, Riedemann N, McGuire SR, Lu KT, Kunkel R, Younger JG, Zetoune FS, Ward PA: Generation of C5a by phagocytic cells. *Am J Pathol* 161: 1849-1859 (2002)
37. Huber-Lang MS, Sarma JV, McGuire SR, Lu KT, Padgaonkar VA, Younkin EM, Guo RF, Weber CH, Zuiderweg ER, Zetoune FS, Ward PA: Structure-function relationships of human C5a and C5aR. *J Immunol* 170: 6115-6124 (2003)
38. Huber-Lang MS, Sarma JV, Rittirsch D, Schreiber H, Weiss M, Flierl M, Younkin E, Schneider M, Suger-Wiedeck H, Gebhard F, McClintock SD, T. N, Zetoune FS, Brückner U, Guo RF, Monk PN, Ward PA: Changes in the novel orphan C5a receptor (C5L2) during experimental sepsis and sepsis in humans. *J Immunol* 174: 1104-1110 (2005)
39. Huber-Lang MS, Younkin EM, Sarma JV, McGuire SR, Lu KT, Guo RF, Padgaonkar VA, Curnutte JT, Erickson R, Ward PA: Complement-induced impairment of innate immunity during sepsis. *J Immunol* 169: 3223-3231 (2002)
40. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ: Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 293-301 (1995)
41. Hutchison J: Neutrophils in sepsis, septic shock, and adult respiratory distress syndrome: how stiff is too stiff? *Crit Care Med* 28: 2659-2660 (2000)
42. Irwin RJ, Lerner MR, Bealer JF, Lightfoot SA, Brackett DJ, Tuggle DW: Global primary blast injury: a rat model. *J Okla State Med Assoc* 91: 387-392 (1998)
43. Jaffin JH, McKinney L, Kinney RC, Cunningham JA, Moritz DM, Kraimer JM, Graeber GM, Moe JB, Salander JM, Harmon JW: A laboratory model for studying blast overpressure injury. *J Trauma* 27: 349-356 (1987)
44. Jagels MA, Hugli TE: Neutrophil chemotactic factors promote leukocytosis. A common mechanism for cellular recruitment from bone marrow. *J Immunol* 148: 1119-1128 (1992)
45. Jardin F, Fellahi JL, Beauchet A, Vieillard-Baron A, Loubieres Y, Page B: Improved prognosis of acute respiratory distress syndrome 15 years on. *Intensive Care Med* 25: 936-941 (1999)
46. Knoferl MW, Liener UC, Seitz DH, Perl M, Bruckner 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)
47. Krafft P, Fridrich P, Pernerstorfer T, Fitzgerald RD, Koc D, Schneider B, Hammerle AF, Steltzer H: The acute respiratory distress syndrome: definitions, severity and clinical

- outcome. An analysis of 101 clinical investigations. *Intensive Care Med* 22: 519-529 (1996)
48. Lambris JD, Reid KB, Volanakis JE: The evolution, structure, biology and pathophysiology of complement. *Immunol Today* 20: 207-211 (1999)
  49. Lewandowski K, Metz J, Deutschmann C, Preiss H, Kuhlen R, Artigas A, Falke KJ: Incidence, severity, and mortality of acute respiratory failure in Berlin, Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 1121-1125 (1995)
  50. Liener UC, Knoferl MW, Strater J, Barth TF, Pauser EM, Nussler AK, Kinzl L, Bruckner UB, Gebhard F: Induction of apoptosis following blunt chest trauma. *Shock* 20: 511-516 (2003)
  51. Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M, Aardal S, Thorsteinsson A, Frostell CG, Bonde J: Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1849-1861 (1999)
  52. Markowicz P, Wolff M, Djedaini K, Cohen Y, Chastre J, Delclaux C, Merrer J, Herman B, Veber B, Fontaine A, Dreyfuss D: Multicenter prospective study of ventilator-associated pneumonia during acute respiratory distress syndrome. Incidence, prognosis, and risk factors. ARDS Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1942-1948 (2000)
  53. Matthay MA, Zimmerman GA, Esmon C, Bhattacharya J, Collier B, Doerschuk CM, Floros J, Gimbrone MA, Jr., Hoffman E, Hubmayr RD, Leppert M, Matalon S, Munford R, Parsons P, Slutsky AS, Tracey KJ, Ward P, Gail DB, Harabin AL: Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 1027-1035 (2003)
  54. Meakins JL, McLean AP, Kelly R, Bubenik O, Pietsch JB, MacLean LD: Delayed hypersensitivity and neutrophil chemotaxis: effect of trauma. *J Trauma* 18: 240-247 (1978)
  55. Moss M, Burnham EL: Chronic alcohol abuse, acute respiratory distress syndrome, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 31: S207-212 (2003)
  56. Muller-Eberhard HJ: Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem* 57: 321-347 (1988)

57. Mulligan MS, Schmid E, Beck-Schimmer B, Till GO, Friedl HP, Brauer RB, Hugli TE, Miyasaka M, Warner RL, Johnson KJ, Ward PA: Requirement and role of C5a in acute lung inflammatory injury in rats. *J Clin Invest* 98: 503-512 (1996)
58. Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* 6: 3051-3064 (1992)
59. Neff TA, Stocker R, Frey HR, Stein S, Russi EW: Long-term assessment of lung function in survivors of severe ARDS. *Chest* 123: 845-853 (2003)
60. Orme J, Jr., Romney JS, Hopkins RO, Pope D, Chan KJ, Thomsen G, Crapo RO, Weaver LK: Pulmonary function and health-related quality of life in survivors of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 690-694 (2003)
61. Perl M, Gebhard F, Braumuller S, Tauchmann B, Bruckner UB, Kinzl L, Knoferl 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)
62. Perl M, Gebhard F, Bruckner UB, Ayala A, Braumuller S, Buttner C, Kinzl L, Knoferl 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)
63. Reid KB, Porter RR: The proteolytic activation systems of complement. *Annu Rev Biochem* 50: 433-464 (1981)
64. Reynolds HN, McCunn M, Borg U, Habashi N, Cottingham C, Bar-Lavi Y: Acute respiratory distress syndrome: estimated incidence and mortality rate in a 5 million-person population base. *Crit Care* 2: 29-34 (1998)
65. Rocco PR, Negri EM, Kurtz PM, Vasconcellos FP, Silva GH, Capelozzi VL, Romero PV, Zin WA: Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1067-1071 (2001)
66. Rusca F: *Deutsche Ztschr. f. Chir.* 132: 315 (1915)
67. Schlaf G, Nitzki F, Heine I, Hardeland R, Schieferdecker HL, Gotze O: C5a anaphylatoxin as a product of complement activation up-regulates the complement inhibitory factor H in rat Kupffer cells. *Eur J Immunol* 34: 3257-3266 (2004)
68. Schmidt HH, Walter U: NO at work. *Cell* 78: 919-925 (1994)

69. Seitz DH, Perl M, Mangold S, Neddermann A, Braumuller ST, Zhou S, Bachem MG, Huber-Lang MS, Knoferl MW: Pulmonary Contusion Induces Alveolar Type 2 Epithelial Cell Apoptosis: Role of Alveolar Macrophages and Neutrophils. *Shock* 30: 537-544 (2008)
70. Shorr RM, Crittenden M, Indeck M, Hartunian SL, Rodriguez A: Blunt thoracic trauma. Analysis of 515 patients. *Ann Surg* 206: 200-205 (1987)
71. Silliman CC, Ambruso DR, Boshkov LK: Transfusion-related acute lung injury. *Blood* 105: 2266-2273 (2005)
72. Slutsky AS: Hot new therapy for sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 110: 737-739 (2002)
73. Solomkin JS, Cotta LA, Satoh PS, Hurst JM, Nelson RD: Complement activation and clearance in acute illness and injury: evidence for C5a as a cell-directed mediator of the adult respiratory distress syndrome in man. *Surgery* 97: 668-678 (1985)
74. Stellin G: Survival in trauma victims with pulmonary contusion. *Am Surg* 57: 780-784 (1991)
75. Stevens JH, O'Hanley P, Shapiro JM, Mihm FG, Satoh PS, Collins JA, Raffin TA: Effects of anti-C5a antibodies on the adult respiratory distress syndrome in septic primates. *J Clin Invest* 77: 1812-1816 (1986)
76. Tennenberg SD, Jacobs MP, Solomkin JS: Complement-mediated neutrophil activation in sepsis- and trauma-related adult respiratory distress syndrome. Clarification with radioaerosol lung scans. *Arch Surg* 122: 26-32 (1987)
77. Toy P, Popovsky MA, Abraham E, Ambruso DR, Holness LG, Kopko PM, McFarland JG, Nathens AB, Silliman CC, Stroncek D: Transfusion-related acute lung injury: definition and review. *Crit Care Med* 33: 721-726 (2005)
78. Tsokos M, Paulsen F, Petri S, Madea B, Puschel K, Turk EE: Histologic, immunohistochemical, and ultrastructural findings in human blast lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 549-555 (2003)
79. Ward PA: The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol* 4: 133-142 (2004)
80. Ward PA: Rous-Whipple Award Lecture. Role of complement in lung inflammatory injury. *Am J Pathol* 149: 1081-1086 (1996)
81. Ward PA, Hunninghake GW: Lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 157: S123-129 (1998)



82. Ward PA, Lentsch AB: The acute inflammatory response and its regulation. *Arch Surg* 134: 666-669 (1999)
83. Ware LB, Matthay MA: The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342: 1334-1349 (2000)
84. Weigelt JA, Chenoweth DE, Borman KR, Norcross JF: Complement and the severity of pulmonary failure. *J Trauma* 28: 1013-1019 (1988)
85. Wetsel RA, Kildsgaard J, Haviland DL: Complement anaphylatoxins (C3a, C4a, C5a) and their receptors (C3aR, C4aR, C5aR/CD88) as therapeutic targets in inflammation. In: Lambris JD, Holers VM (Hrsg) *Contemporary immunology: therapeutic interventions in the complement system*, 1. Aufl, Humana Press, S. 113-153 (2000)
86. White TO, Jenkins PJ, Smith RD, Cartlidge CW, Robinson CM: The epidemiology of posttraumatic adult respiratory distress syndrome. *J Bone Joint Surg Am* 86-A: 2366-2376 (2004)
87. Williams ER: Blast effects in warfare. *Br J Surg.* 30: 38 (1942)
88. Winterbourne C: Neutrophil oxidants: Production and reactions. In: Das DK, Essma WB (Hrsg) *Oxygen radicals: systemic events and disease processes*, 1. Aufl, Karger, S. 31-70 (1990)
89. Xinmin D, Yunyou D, Chaosheng P, Huasong F, Pingkun Z, Jiguang M, Zhiqian X, Qinzhi X: Dexamethasone treatment attenuates early seawater instillation-induced acute lung injury in rabbits. *Pharmacol Res* (2006)
90. Zhou Q, Bai M, Zou S: Intercellular adhesion molecule-1 in the pathogenesis of heroin-induced acute lung injury in rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 24: 430-432 (2004)
91. Zipfel PF, Skerka C, Hellwage J, Jokiranta ST, Meri S, Brade V, Kraiczky P, Noris M, Remuzzi G: Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem Soc Trans* 30: 971-978 (2002)
92. Zuckerman: Experimental Study Of Blast Injuries To The Lungs. *Lancet* 2: 219-224 (1940)

## DANKSAGUNG

*„Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen“*

MARCUS TULLIUS CICERO (106-43 n.Chr.)

Mein erster und innigster Dank geht an meinen phantastischen Doktorvater und Mentor PD Dr. med. Markus Huber-Lang für eine menschlich wie fachlich hochinteressante, lehrreiche und produktive – kurz: wunderbare – Zeit. Er vermochte es, wissenschaftliches Interesse und Begeisterung in mir zu wecken. Einen besonderen Dank auch für seine fortlaufende und selbstlose klinische wie wissenschaftliche Förderung!

Prof. Dr. med. Florian Gebhard und Prof. Dr. med. Lothar Kinzl sei für Ihre stete Unterstützung und Bereitstellung von Laborräumlichkeiten, Gerätschaften und Kongressgeldern gedankt.

Prof. Dr. med. Uwe Brückner als Sektionsleiter der Experimentellen Chirurgie danke ich ebenfalls für stete wissenschaftliche Unterstützung sowie großzügige Bereitstellung seiner Laboratorien.

Für die Hilfestellung bei der Durchführung des tierexperimentellen Parts gilt mein Dank Dr. med. Mario Perl und Dr. med. Christoph Bartl.

Weiterhin möchte ich meinen Mitdoktoranden und hochkompetenten fachlichen Helfern und Ratgebern im Traumalabor für eine stets angenehm-fröhliche wie effektive Zusammenarbeit und ihre großartige Hilfe danken: Daniel Rittirsch, Heike Schreiber, Vera Fleig, Maudy Burk, Sonja Albers, Barbara Acker, Sonja Braumüller und Silke Beil.

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

## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Michael Andreas Flierl  
 Geburtsdatum: 22. Juli 1978  
 Geburtsort: Nürnberg  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Konfession: röm.-kath.  
 Familienstatus: ledig

### AUSBILDUNG

1985 - 1989 St.-Martin-Volkschule (Grundschule), Marktobendorf  
 1989 - 1998 Peter-Dörfler-Gymnasium, Marktobendorf  
 1998 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)  
 1999-2005 Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm und der Technischen Universität München  
 2001 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)  
 2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen)  
 2003 United States Medical Licensing Examination (USMLE) Step 1  
 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)  
 2004 United States Medical Licensing Examination (USMLE) Step 2 CK  
 2004-2005 Praktisches Jahr (PJ):

- Innere Medizin
  - University Hospital, University of Cincinnati, USA
  - Cleveland Clinic, Cleveland Clinic Lerner College of Medicine, Cleveland, USA
- Orthopädie/Unfallchirurgie

- Vancouver General Hospital (VGH),  
University of British Columbia, Vancouver,  
Canada
- Chirurgie
  - Kantonsspital Luzern, Schweiz

2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)
2005	Vollapprobation als Arzt
2008	United States Medical Licensing Examination (USMLE) Step 2 CS
2009	ECFMG Zertifikation

#### WISSENSCHAFTLICHE AKTIVITÄTEN

Jan. 2006 - Jun. 2008      Postdoktorand am Department of Pathology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan, USA unter der Leitung des Godfrey D. Stobbe Professor of Pathology P.A. Ward

*seit Jun. 2008                      Postdoktorand am Department of Orthopedic Surgery, Denver Health Medical Center, University of Colorado School of Medicine, Denver, Colorado*

#### PUBLIKATIONEN

1.     Huber-Lang MS, Sarma JV, Rittirsch D, Schreiber H, Weiss M, **Flierl M**, Younkin E, Schneider M, Suger-Wiedeck H, Gebhard F, McClintock SD, T. N, Zetoune FS, Brückner U, Guo RF, Monk PN, Ward PA: Changes in the novel orphan C5a receptor (C5L2) during experimental sepsis and sepsis in humans. *J Immunol* 174: 1104-1110 (2005)
2.     Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, Lambris JD, Warner RL, **Flierl MA**, Hoesel LM, Gebhard F, Younger JG, Drouin SM, Wetsel RA, Ward PA: Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 12: 682-687 (2006)

3. **Flierl MA**, Schreiber H, Huber-Lang MS: The role of complement, C5a and its receptors in sepsis and multiorgan dysfunction syndrome. *J Invest Surg* 19: 255-265 (2006)
4. Schreiber H, Rittirsch D, **Flierl M**, Brueckner U, Schneider M, Weiss M, Gebhard F, Huber-Lang M: Complement activation during sepsis in humans. *Adv Exp Med Biol* 586: 217-226 (2006)
5. **Flierl MA**, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, McGuire SR, List RP, Day DE, Hoesel LM, Gao H, Van Rooijen N, Huber-Lang MS, Neubig RR, Ward PA: Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 449: 721-725 (2007)
6. **Flierl MA**, Perl M, Rittirsch D, Bartl C, Schreiber H, Fleig V, Schlaf G, Liener U, Brueckner UB, Gebhard F, Huber-Lang MS: The role of C5a in the innate immune response after experimental blunt chest trauma. *Shock* 29: 25-31 (2008)
7. **Flierl MA**, Rittirsch D, Huber-Lang M, Sarma JV, Ward PA: Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? *Mol Med* 14: 195-204 (2008)
8. **Flierl MA**, Rittirsch D, Huber-Lang MS, Sarma JV, Ward PA: Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis. *Mol Med* 14: 327-336 (2008)
9. Hoesel LM, **Flierl MA**, Niederbichler AD, Rittirsch D, McClintock SD, Reuben JS, Pianko MJ, Stone W, Yang H, Smith M, Sarma JV, Ward PA: Ability of antioxidant liposomes to prevent acute and progressive pulmonary injury. *Antioxid Redox Signal* 10: 973-981 (2008)
10. **Flierl MA**, Rittirsch D, Gao H, Hoesel LM, Nadeau BA, Day DE, Zetoune FS, Sarma JV, Huber-Lang MS, Ferrara JL, Ward PA: Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis. *Faseb J* 22: 2198-2205 (2008)
11. **Flierl MA**: German surgical residency training - quo vadis? *Patient Saf Surg* 2: 9 (2008)
12. Rittirsch D, **Flierl MA**, Nadeau BA, Day DE, Huber-Lang M, Mackay CR, Zetoune FS, Gerard NP, Cianflone K, Kohl J, Gerard C, Sarma JV, Ward PA: Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat Med* 14: 551-557 (2008)
13. Rittirsch D, **Flierl MA**, Day DE, Nadeau BA, McGuire SR, Hoesel LM, Ipaktchi K, Zetoune FS, Sarma JV, Leng L, Huber-Lang MS, Neff TA, Bucala R, Ward PA: Acute lung injury induced by lipopolysaccharide is independent of complement activation. *J Immunol* 180: 7664-7672 (2008)

14. **Flierl MA**, Rittirsch D, Nadeau BA, Day DE, Zetoune FS, Sarma JV, Huber-Lang MS, Ward PA: Functions of the complement components C3 and C5 during sepsis. *FASEB J* 22:3483-3490 (2008)
15. **Flierl MA**, Rittirsch D, Chen AJ, Nadeau BA, Day DE, Sarma JV, Huber-Lang MS, Ward PA: The Complement Anaphylatoxin C5a Induces Apoptosis in Adrenomedullary Cells during Experimental Sepsis. *PLoS ONE* Jul 2, 3: e2560 (2008)
16. Stahel PF, **Flierl MA**. Orthopedic residency training in Germany: an endangered species? *Orthopedics* 31:742-743 (2008)
17. Rittirsch D, **Flierl MA**, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8:776-787 (2008)
18. Amara U, Rittirsch D, **Flierl M**, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang MS: Interaction between the Coagulation and Complement System. *Adv Exp Med Biol*, 632:71-80 (2008).
19. **Flierl MA**, Rittirsch D, Sarma JV, Huber-Lang MS, Ward PA: Adrenergic Regulation of Complement-induced Acute Lung Injury. *Adv Exp Med Biol*, 632:88-98 (2008).
20. Rittirsch D, Huber-Lang MS, **Flierl MA**, Ward PA. Immunodesign of Experimental Sepsis by Cecal Ligation and Puncture. *Nat Protoc* 4:31-6 (2009)
21. Stahel PF, **Flierl MA**, Morgan BP, Persigehl I, Stoll C, Conrad C, Touban BM, Smith WR, Beauchamp K, Schmidt OI, Ertel W, Leinase I. Absence of the complement regulatory molecule CD59a leads to exacerbated neuropathology after traumatic brain injury in mice. *J Neuroinflammation* 6:2 (2009)
22. **Flierl MA**, Stahel PF, Rittirsch D, Huber-Lang M, Niederbichler AD, Hoesel LM, Touban BM, Morgan SJ, Smith WR, Ward PA, Ipaktchi K. Inhibition of complement C5a prevents breakdown of the blood-brain barrier and pituitary dysfunction in experimental sepsis. *Crit Care* 13:R12 (2009)
23. **Flierl MA**, Rittirsch D, Nadeau BA, Sarma JV, Day DE, Lentsch AB, Huber-Lang MS, Ward PA. Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. *PLoS ONE* 4:e4414 (2009)

24. **Flierl MA**, Beauchamp KM, Bolles GE, Moore EE, Stahel PF. Fatal outcome after insufficient spine fixation for pyogenic thoracic spondylodiscitis: an imperative for 360 degrees fusion of the infected spine. *Patient Saf Surg* 3:4 (2009)
25. Stahel PF, Moore EE, Schreier SL, **Flierl MA**, Kashuk JL. Transfusion strategies in postinjury coagulopathy. *Curr Opin Anaesthesiol* 22:289-298 (2009)
26. Stahel PF, **Flierl MA**, Moore EE, Smith WR, Beauchamp K, Dwyer A. Advocating “spine damage control” as a safe and effective treatment modality for unstable thoracolumbar fractures in polytrauma patients: a hypothesis. *J Trauma Manag Outcomes* 3(1):6 (2009)
27. Rittirsch D, **Flierl MA**, Day DE, Nadeau BA, Zetoune FS, Sarma JV, Werner CM, Wanner GA, Simmen HP, Huber-Lang MS, Ward PA. Cross-Talk between TLR4 and FcgReceptorIII (CD16) Pathways. *PLoS Pathog* 5(6):e1000464 (2009)
28. **Flierl MA**, Stahel PF, Touban BM, Beauchamp K, Morgan SJ, Smith WR, Ipaktchi K. Burn-induced cerebral inflammation - a neglected entity? *Crit Care* 13:215 (2009)
29. **Flierl MA**, Stahel PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, Shohami E. Mouse closed head injury model induced by a weight drop device. *Nat Protoc* 4(9):1328-37 (2009)
30. Lutes WB, **Flierl MA**, Dayton MR, Morgan SJ. Improving accuracy of total knee component cementation: description of a simple technique. *J Orthop Surg Res* 4:38 (2009)
31. Amara U, Kalbitz M, Perl M, **Flierl MA**, Rittirsch D, Weiss M, Schneider M, Gebhard F, Huber-Lang M. Early expression changes of complement regulatory proteins (CRegs) and C5a receptor (CD88) on leukocytes after multiple injury in humans. *Shock*. Epub Oct 27 2009
32. **Flierl MA**, Stahel PF, Morgan SJ. Surgical fixation of extra-articular tibia fractures: Tips and tricks. *Minerva Ortopedica e Traumatologica*. 60(6): 527-540 (2009)
33. Stahel PF, Flierl MA, Morgan SJ, Smith WR. Management of a trochanteric fracture complicated by a bent solid intramedullary femoral nail in situ - description of technique. *J Orthop Trauma, in press* (2009)

34. **Flierl MA**, Stoneback JW, Beauchamp KM, Hak DJ, Morgan SJ, Smith WR, Stahel PF. Femur shaft fracture fixation in head-injured patients - when is the right time? *J Orthop Trauma, in press (2009)*
35. Blum ALL, Bongiovanni JC, Morgan SJ, **Flierl MA**, dos Reis FB. Complications associated with distraction osteogenesis for infected femur shaft nonunion with bone defect: a retrospective series. *J Bone Joint Surg Br, in press (2009)*
36. Stahel PF, **Flierl MA**, Smith WR, Morgan SJ, Victoroff MS, Clarke TJ, Sabel AL, Mehler PS. Disclosure of surgical complications – a double-edged sword? *Am J Med Qual, in press (2009)*
37. Angelinia AJ, Livania B, **Flierl MA**, Morgan SJ, Belangero WD. Minimally invasive percutaneous wave plating of simple femur shaft fractures: a prospective series. *Injury, in press (2009)*
38. Stahel PF, Fakler JKM, **Flierl MA**, Moldenhauer K, Mehler PS. Aktuelle Konzepte der Patientensicherheit: Das “*Rapid Response*” System. *Unfallchirurg, in press (2009)*
39. **Flierl MA**, Stahel PF, Hak DJ, Morgan SJ, Smith WR. Traction Table-related Complications in Orthopaedic Surgery. *J Am Acad Orthop Surg, in press (2009)*.

#### PRÄSENTATIONEN ALS ERSTAUTOR

1. Poster Präsentation auf dem 1. International Kongress der Deutschen Sepsis Gesellschaft, Weimar, 2003.
2. „Oral Poster“ - Präsentation auf dem “6<sup>th</sup> World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis“, München, 2004.
3. Poster Präsentation auf dem “Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Meeting 2004”, Washington D.C., USA, 2004.
4. Kurzvortrag in *Highlights: Graduate Student Posters in Pathology* auf dem “Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Meeting 2005”, San Diego, USA, 2005.



5. Vortrag auf dem “Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Meeting 2006”, San Francisco, USA, 2006.
6. Einladung zum Vortrag auf dem “6<sup>th</sup> annual Pathology Research Symposium”, an der University of Michigan Medical School, Ann Arbor, USA, 2007 (*“Phagocytes: A New Adrenergic Organ”*).
7. Einladung zum Vortrag auf dem “7<sup>th</sup> World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis”, München, 2007 (*“Adrenergic Regulation of Lung Inflammation”*).
8. Einladung zum Vortrag auf dem “37th Critical Care Congress“ Honolulu, Hawaii, USA, 2008 (*“Phagocytes: A New Adrenergic Organ”*).
9. Einladung zum Vortrag auf dem “Colorado AO Faculty Dinner”, Denver, Colorado, USA, 2009 (*“The Lobenhoffer approach – a solution for postero-medial fracture-dislocations of the tibial plateau”*)