

**Aus der Klinik für Unfall-, Hand-, Plastische  
und Wiederherstellungschirurgie  
der Universität Ulm  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Florian Gebhard**

**Rolle von Monozyten bei lokalen und systemischen  
Veränderungen nach einem stumpfen Thoraxtrauma**

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

Vorgelegt von  
Janine Stephanie Fröba  
aus Schleiz  
2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Huber-Lang  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Knippschild  
Tag der Promotion: 25.07.2014

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. Das stumpfe Thoraxtrauma und seine Relevanz .....	1
1.2. Pathophysiologische und immunologische Veränderungen nach einem stumpfen Thoraxtrauma .....	1
1.3. Bedeutung von Monozyten und Makrophagen in der inflammatorischen Reaktion .....	2
1.3.1. Monozyten .....	2
1.3.2. Makrophagen .....	4
1.4. Zytokine beteiligten sich an der lokalen und systemischen Entzündungsreaktion .....	5
1.5. Fragestellung und Zielsetzung .....	8
<b>2. MATERIAL</b> .....	<b>9</b>
2.1. Puffer und Medien.....	9
2.2. Chemikalien und sonstige Reagenzien.....	10
2.3. Kit's .....	11
2.4. Geräte .....	11
2.5. Verbrauchsmaterial .....	12
<b>3. METHODEN</b> .....	<b>14</b>
3.1. Tiere und Tierhaltung .....	14
3.2. Narkose der Versuchstiere .....	14
3.3. Herstellung DiD-gefärbter Liposomen.....	14
3.3.1. Vorbereitungen .....	15
3.3.2. Färbung.....	15
3.4. Vorversuche zur Etablierung der Monozytenanfärbung mit DiD-Liposomen und der Monozyten-Depletion mit Clodronate-Liposomen .....	15
3.4.1. Färbung von Monozyten mit DiD-Liposomen.....	15
3.4.2. Depletion der Monozyten mit Clodronate-Liposomen .....	16
3.5. Hauptstudien zur Untersuchung der Kinetik der Monozyten-Migration in die Lunge und zum Einfluss der Monozyten auf das lokale und systemische Entzündungsgeschehen nach stumpfem Thoraxtrauma.....	17
3.5.1. Versuchsgruppen der Hauptstudien.....	17
3.5.2. Anfärben und Depletion der Monozyten.....	17
3.5.3. Induktion eines stumpfen Thoraxtraumas mittels Druckwellengenerator.....	18
3.5.3.1. Druckwellengenerator .....	18
3.5.3.2. Induktion des stumpfen Thoraxtraumas.....	18
3.5.4. Gewinnung des Probenmaterials .....	19
3.5.5. Aufarbeitung des Probenmaterials.....	20
3.5.5.1. Blutproben.....	20

3.5.5.2.	Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeiten .....	20
3.5.5.3.	Isolation von Monozyten und interstitiellen Makrophagen aus dem Lungengewebe.....	20
3.5.5.4.	Isolation von Knochenmark.....	21
3.5.5.5.	Durchflusszytometrie.....	21
3.5.5.6.	Mikroskopie .....	23
3.5.5.7.	Isolation von Splenozyten und Milzmakrophagen.....	23
3.5.5.8.	Herstellen von Lungenhomogenisaten.....	24
3.5.5.9.	Bestimmung der Proteinkonzentrationen in der bronchoalveolären Lavage- Flüssigkeit und im Lungenhomogenisat.....	24
3.5.5.10.	Messung der Zytokinkonzentrationen .....	25
3.5.5.11.	RNA-Isolation .....	27
3.5.5.12.	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) .....	27
3.5.6.	Statistik .....	29
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>30</b>
4.1.	Vorversuche .....	30
4.1.1.	Anfärbung der Monozyten mit DiD-Liposomen .....	30
4.1.2.	Depletion der Monozyten mit Clodronate-Liposomen .....	32
4.2.	Hauptstudien .....	33
4.2.1.	Untersuchungen zur Kinetik der Monozyten-Migration in die Lunge nach einem stumpfen Thoraxtrauma .....	33
4.2.1.1.	Anzahl an Alveolarmakrophagen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit .....	33
4.2.1.2.	Protein- und Zytokinkonzentrationen in der bronchoalveolären Lavage- Flüssigkeit .....	33
4.2.1.3.	Identifizierung gesuchter Zellpopulationen im Durchflusszytometer .....	36
4.2.1.4.	Migrations- und Umwandlungsprozesse der Monozyten .....	38
4.2.1.5.	Monozyten-Subpopulationen .....	39
4.2.1.6.	mRNA-Expression von Oberflächenmarkern in Monozyten des Knochenmarks .....	41
4.2.2.	Untersuchungen zum Beitrag der Monozyten an der posttraumatischen Entzündungsreaktion nach einem stumpfen Thoraxtrauma.....	41
4.2.2.1.	Nachweis der Monozyten-Depletion .....	41
4.2.2.2.	Auswirkungen der Monozyten-Depletion auf Zellen des Blutes, Knochenmarks und der Lunge .....	43
4.2.2.3.	Zytokinkonzentrationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit und im Lungenhomogenisat.....	45
4.2.2.4.	Zytokinkonzentrationen im Plasma und den Kulturüberständen von Splenozyten und Milzmakrophagen .....	47
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>50</b>
5.1.	Kinetik der pulmonalen Monozyten-Migration nach stumpfem Thoraxtrauma .	50
5.2.	Auswirkungen der Monozyten-Migration auf die posttraumatische Entzündungsantwort .....	62
5.3.	Schlussfolgerung .....	71
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>73</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>75</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALI	Acute lung injury
AMΦ	Alveolarmakrophagen
ANOVA	Varianzanalyse
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
BAL-F	bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CCR2	C-C-Motiv Chemokinrezeptor 2
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CINC-1	Cytokine-induced neutrophil chemoattractant
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CX <sub>3</sub> CL1	C-X <sub>3</sub> -C-Motiv Ligand 1 (Fractalkine)
CX <sub>3</sub> CR1	C-X <sub>3</sub> -C-Motiv Chemokinrezeptor 1
d	Tage
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DiD	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine,4-chlorobenzensulfonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GRO- $\alpha$	Growth regulated oncogene $\alpha$
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HPAEC	Human pulmonary arterial endothelial cells
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL	Interleukin
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IM $\Phi$	interstitielle Makrophagen
ISS	Injury Severity Score
KC	Keratinocyte-derived cytokine
LPS	Lipopolysaccharid
Ly-6C	Lymphocyte antigen 6C
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MIP-2	Macrophage inflammatory protein 2
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PPIA	Peptidylprolylisomerase A
RANTES	Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-medium
RT	reverse Transkription
Sham	Kontrolleingriff
SSC	Seitwärtsstreulicht
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TH-1	Typ-1 T-Helferzelle
TH-2	Typ-2 T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TxT	Thoraxtrauma
VEGF	Vascular endothelial growth factor

# 1. Einleitung

## 1.1. Das stumpfe Thoraxtrauma und seine Relevanz

Das stumpfe Thoraxtrauma ist eine nicht penetrierende Verletzung des Brustkorbes, die beim schwerverletzten Patienten (Injury Severity Score, ISS > 16 [20]) neben Verletzungen des Kopfes sehr häufig vorkommt [28]. Dabei sind die Patienten überwiegend männlich (ca. 70%) und erleiden ihre Verletzungen größtenteils durch Verkehrsunfälle und Stürze [28]. Die letztgenannte Ursache spielt dabei vor allem in fortgeschrittenem Alter eine zunehmende Rolle [153]. Da auch im Jahr 2012 noch immer über 20.000 Menschen an den Folgen eines Unfalls verstarben [153], stellt das Thoraxtrauma ein hochrelevantes Verletzungsmuster dar, das isoliert und insbesondere in Kombination mit anderen Verletzungen, zu einer Verschlechterung der Prognose führt. So konnte nachgewiesen werden, dass die Letalität bei Beteiligung einer Lungenkontusion im polytraumatisierten Patienten auf etwa das Doppelte ansteigt [46]. Erschwerend kommt hinzu, dass das Thoraxtrauma im Rahmen der Primärversorgung oft aufgrund fehlender äußerer Verletzungszeichen oder Verletzungen der knöchernen Strukturen des Brustkorbes nicht erkannt, oder der Grad des Thoraxtraumas unterschätzt wird. Dadurch werden die notwendigen Maßnahmen, wie Thoraxdrainage oder Intubation, oft zu spät eingeleitet [8]. Auch wenn sich die mit einer isoliert auftretenden Lungenkontusion verbundenen Beeinträchtigungen der respiratorischen Funktion meist innerhalb von 3-5 Tagen verbessern [23], kann es vor allem beim polytraumatisierten Patienten zu Komplikationen kommen. So ist die Entwicklung einer Pneumonie [23], eines akuten Atemnotsyndroms [100] (Acute respiratory distress syndrome (ARDS) - vor 2011 in milderer Verlaufsform auch als „Acute lung injury“ (ALI) bezeichnet [132]) oder sogar eines Multiorganversagens möglich [107,166]. Daher kommt dem Thoraxtrauma gerade beim Schwerverletzten noch immer eine entscheidende Rolle zu.

## 1.2. Pathophysiologische und immunologische Veränderungen nach einem stumpfen Thoraxtrauma

Die durch ein Thoraxtrauma hervorgerufene Kontusion der Lunge resultiert zunächst in einer Druckschädigung des Parenchyms mit Zerstörungen der alveolären und kapillären Strukturen [166]. Die Schädigung der Blut-Luft-Schranke führt schließlich zu intraalveolären und interstitiellen Einblutungen und Ödemen, die den Gasaustausch beeinträchtigen und so zu einer posttraumatischen Hypoxämie führen. Gleichzeitig werden neutrophile Granulozyten in die Lunge rekrutiert [61,111], die im aktivierten Zustand vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species, ROS) und

Proteasen freisetzen [111]. Die ROS können *in vitro* Apoptose (programmierter Zelltod) induzieren [16] und wurden ebenfalls mit der im experimentellen stumpfen Thoraxtrauma beobachteten gesteigerten Apoptose des Lungengewebes in Verbindung gebracht [89]. Proteasen schädigen das Gewebe zusätzlich durch Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität und fördern so die Ödembildung [166]. Außerdem werden die Lungenepithelzellen [122,150] sowie die Alveolar- und interstitiellen Makrophagen (ortsständige Gewebsmakrophagen der Lunge) [120,144] zur gesteigerten Abgabe inflammatorischer Zytokine angeregt, die die lokale Entzündungsreaktion nach einem Thoraxtrauma maßgeblich beeinflussen. Neben den lokalen inflammatorischen Vorgängen kann das Thoraxtrauma auch systemisch zu entzündlichen Reaktionen führen. So konnten in klinischen Studien erhöhte Interleukin 6 (IL-6)-Konzentrationen im Serum [155] und eine gesteigerte Aktivierung sowie die Mobilisierung neutrophiler Granulozyten in die Zirkulation [180] der Patienten festgestellt werden. In tierexperimentellen Untersuchungen wurde eine verzögerte, immunsuppressive Wirkung auf Zellen der Milz nachgewiesen, bei der die Milzmakrophagen und Splenozyten in ihrer Zytokinfreisetzung gehemmt wurden [71]. Außerdem führt das Thoraxtrauma in Abhängigkeit einer Complementaktivierung zu einer verschlechterten Frakturheilung [133]. Auch eine Aktivierung des Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), verbunden mit einer gesteigerten systemischen Reaktion auf eine zusätzliche intratracheale Lipopolysaccharid (LPS)-Gabe, wurden nach einem Thoraxtrauma beobachtet [60].

### **1.3. Bedeutung von Monozyten und Makrophagen in der inflammatorischen Reaktion**

#### **1.3.1. Monozyten**

Monozyten sind die nicht teilungsfähigen Vorläuferzellen aller Gewebsmakrophagen [170] und spielen in der Immunabwehr eine wichtige Funktion. Nach ihrer Bildung im Knochenmark [186] gelangen sie ins Blut, wo sie nur kurze Zeit zirkulieren (1-3 Tage) [117,190] und dann für die weitere Differenzierung in Makrophagen ins Gewebe wandern. Neben der Phagozytose körperfremder Strukturen und Präsentation von Antigenen setzen Monozyten auch Mediatoren frei [26]. Im Knochenmark und der Zirkulation definieren sie sich u. a. durch die Expression des Oberflächenmoleküls Integrin- $\alpha$ -M (CD11b), welches in Kombination mit Integrin- $\beta$ -2 (CD18) als Macrophage-1 antigen (Mac-1) der Adhäsion in Vorbereitung der Transmigration ins Gewebe dient [81].

Ursprünglich wurden die Monozyten als eine homogene Zellpopulation des Blutes angesehen [77]. Inzwischen ist jedoch weitgehend anerkannt, dass sie anhand von Größe, Granularität, Funktionalität und der unterschiedlichen Expression bestimmter



Oberflächenmarker in mindestens 2 Subpopulationen unterteilt werden können [154]. Dabei erfolgt die Unterscheidung meist über die Expression von Lymphocyte antigen 6C (Ly-6C), C-X<sub>3</sub>-C-Motiv Chemokinrezeptor 1 (CX<sub>3</sub>CR1), C-C-Motiv Chemokinrezeptor 2 (CCR2), und L-Selektin (CD62L) in Ly-6C<sup>high</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>low</sup> CCR2<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>- bzw. Ly-6C<sup>low</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup> CCR2<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup>-Monozyten [49,105,179]. Die Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten gelten als die „inflammatorische“ Subpopulation. Sie werden bei Entzündungen CCR2-abhängig aus dem Knochenmark [149,167], oder einem Monozyten-Reservoir in der Milz [158] rekrutiert und wandern vermehrt in das entsprechende geschädigte Gewebe ein [4,109,135]. Dort zeigen sie neben der Phagozytose auch eine erhöhte Proteinase-Aktivität [105] und exprimieren die pro-inflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF) und IL-1 $\beta$  [4]. Die Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten verbleiben länger in der Zirkulation, migrieren auch in gesundes Gewebe und fördern nach der Entzündung die Regeneration des Gewebes durch Produktion von Vascular endothelial growth factor (VEGF) [105]. Sie werden daher als „nicht inflammatorisch“ bezeichnet [49] und haben darüber hinaus die Fähigkeit, sich in Gewebsmakrophagen umzuwandeln. So konnte in der Lunge die Differenzierung von Alveolarmakrophagen aus Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten nachgewiesen werden [79]. Insgesamt entsprechen die Subpopulationen keinen ausdifferenzierten Zellen, sondern stellen unterschiedliche Entwicklungsstadien eines Monozyten dar. Mit zunehmender Differenzierung können sich die Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten in Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten umwandeln und diese Umwandlung scheint im Knochenmark stattzufinden [179]. Dafür migrieren die Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten des Blutes unter physiologischen Bedingungen („steady-state“) ins Knochenmark zurück [186]. Da die Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten nicht nur während entzündlicher Vorgänge ins Gewebe wandern, ist die Bezeichnung dieser Subpopulation als „inflammatorisch“ nur eingeschränkt verwendbar. Gleiches gilt auch für die „nicht inflammatorischen“ Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten. Für diese wurde ein „patrouillierendes“ Verhalten über das Endothel beschrieben, das nach Gewebsverletzungen zu einer schnellen Auswanderung ins Gewebe mit Auslösen einer frühen Immunantwort führte [7]. Gelegentlich wird über die Expression von Ly-6C auch eine dritte Monozyten-Subpopulation definiert, deren Menge an exprimierten Ly-6C zwischen den beiden bisher beschriebenen Subpopulationen liegt (Ly-6C<sup>int</sup>) [130,156]. Die Ly-6C<sup>int</sup>-Monozyten exprimieren CCR2, den Rezeptor für das chemotaktisch wirkende Zytokin (Chemokin) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), in vergleichbarem Maße wie die Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten. Allerdings zeigen sie eine hohe Expression weiterer Chemokinrezeptoren (CCR7, CCR8), wodurch sie besonders flexibel zu entzündeten Stellen rekrutiert werden können [130]. Bei der Einteilung in 2 Subpopulationen werden häufig die Ly-6C<sup>low</sup>- und Ly-6C<sup>int</sup>-Monozyten zusammengefasst [32,158].

Obwohl Monozyten essentielle Bestandteile der Immunabwehr gegen mikrobielle Pathogene sind und als Vorläuferzellen von Makrophagen und dendritischen Zellen zum Erhalt der Zell-Homöostase beitragen [148], können sie ebenfalls an der Entstehung verschiedener Erkrankungen beteiligt sein [151]. So wandern Monozyten in artherosklerotische Läsionen [159,160] oder Gelenke bei rheumatoider Arthritis [75] ein und fördern dort das Fortschreiten der Erkrankung. In einer klinischen Studie mit ARDS-Patienten korrelierten die Mengen neu eingewanderter Monozyten sowie die gesteigerten MCP-1-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BAL-F) mit der Schwere der Erkrankung [137]. Außerdem konnte bei Patienten mit beatmungsassoziiertes Pneumonie hervorgerufener Sepsis eine gesteigerte Überlebensrate festgestellt werden, wenn die Apoptoserate der zirkulierenden Monozyten besonders hoch war [51]. Zusammenfassend wird deutlich, dass die vermehrte Migration der Monozyten zum Ort des Entzündungsgeschehens mit der Pathogenese verschiedener Erkrankungen in Zusammenhang steht. Da auch nach einem Thoraxtrauma erhöhte Monozyten-Zellzahlen in der Lunge nachgewiesen werden konnten [144], bleibt jedoch die Frage, inwieweit diese Monozyten zur inflammatorischen Reaktion beitragen und ob daran auch verschiedene Subpopulationen beteiligt sind.

### **1.3.2. Makrophagen**

Makrophagen haben durch die Beseitigung alternder und toter Zellen sowie durch die Reparatur des Gewebes nach einer Entzündung wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase [53]. Sie besitzen einen hohen Heterogenitätsgrad und sind jeweils an das umgebende Milieu angepasst (Alveolarmakrophagen, Osteoklasten, Kupffer-Zellen, etc.) [54]. Sie können über vielfältige Stimuli aktiviert werden (z. B. LPS, Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-4, IL-10 oder IL-13) und entwickeln dementsprechend verschiedene Makrophagen-Phänotypen, die sich an verändernde Bedingungen anpassen können [52].

Alveolarmakrophagen (AM $\Phi$ ) und interstitielle Makrophagen (IM $\Phi$ ) sind die spezialisierten Gewebsmakrophagen der Lunge. Sie stammen von Blutmonozyten ab, die ins Gewebe einwandern und sich zunächst als Zwischenstufe zu IM $\Phi$  entwickeln. Die AM $\Phi$  differenzieren sich schließlich aus den IM $\Phi$  [79,187], so dass die IM $\Phi$  als Reservoir für die Substitution der AM $\Phi$  angesehen werden können. Außerdem wurde für beide Zellpopulationen die Fähigkeit zur lokalen Proliferation beschrieben [79]. AM $\Phi$  dienen hauptsächlich der Phagozytose von toten Zellen und Pathogenen [92], die mit der Atemluft in die Lunge gelangen. Für die IM $\Phi$  wird eher eine immunregulatorische Funktion mit Verbindung zur Lymphozyten-vermittelten spezifischen Immunantwort beschrieben [43]. Unter inflammatorischen Bedingungen ist die Rolle der AM $\Phi$  uneinheitlich, da sie,

offenbar in Abhängigkeit vom entzündungsauslösenden Stimulus, die Entzündungsprozesse in der Lunge sowohl abschwächen [11,134], als auch verstärken [37,76] können. Untersuchungen der AM $\Phi$ -Funktion nach einem Thoraxtrauma deuten auf eine Abschwächung der lokalen Entzündungsreaktion hin [108]. Unstrittig ist allerdings, dass es nach einem Thoraxtrauma zu erhöhten AM $\Phi$ -Zellzahlen in der Lunge kommt [143,145,146] und dass diese vermehrt inflammatorische Mediatoren (wie z. B. IL-6 oder MCP-1) freisetzen [120,144]. Dabei wurde die vermehrte Migration von Monozyten in die Lunge vor allem mit den erhöhten Konzentrationen von MCP-1 in der BAL-F und einer Steigerung der mRNA-Expression von CCR2 auf Monozyten in Verbindung gebracht [144].

#### **1.4. Zytokine beteiligten sich an der lokalen und systemischen Entzündungsreaktion**

In der inflammatorischen Reaktion nach einem Thoraxtrauma kommt den sowohl lokal als auch systemisch freigesetzten Zytokinen entscheidende Bedeutung zu.

Hierzu gehören vor allem die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF, die im entzündlichen Geschehen bereits früh freigesetzt werden und die inflammatorischen Prozesse vorantreiben [90,121,155]. Sie lösen eine Akut-Phase-Reaktion aus, die sich durch die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten sowie durch zusätzlich gesteigerte Zytokinausschüttung aus Fibroblasten, Endothelzellen und Leukozyten auszeichnet [10]. Die hauptsächlichen Produzenten von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF sind Monozyten und Makrophagen [30,36,50,182], aber auch Granulozyten können diese Zytokine freisetzen [18,115]. Nach einem Thoraxtrauma konnten in der BAL-F erhöhte Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF nachgewiesen werden [90,120]. Vermehrtes IL-6 [71,120] und TNF [72,121] sind darüber hinaus auch in der Zirkulation feststellbar, was die systemischen Auswirkungen eines Thoraxtraumas nochmals verdeutlicht.

Der Gegenspieler zu den pro-inflammatorischen Zytokinen ist das von Monozyten [17], Makrophagen [19] und Typ-2 T-Helferzellen [9] generierte, anti-inflammatorisch wirkende IL-10. Dabei hat es nicht nur eine hemmende Wirkung auf die Freisetzung von Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF [42], sondern es kann ebenso die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (z. B. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)) und verschiedenen chemotaktisch wirkenden Zytokinen (z. B. MCP-1, Keratinocyte-derived cytokine (KC)) beeinflussen [102]. IL-10 hat somit wichtige Funktionen in der Regulation inflammatorischer Vorgänge und kann nach einem Thoraxtrauma in der BAL-F [123], im Plasma [121] und im Lebergewebe [120] in erhöhten Konzentrationen festgestellt werden. In einem Thoraxtrauma-Modell der Ratte konnte zusätzlich

intraperitoneal verabreichtes IL-10 sogar die Schwere des Thoraxtraumas reduzieren und die entzündliche Reaktion insgesamt mildern [112].

Von wesentlicher Bedeutung im inflammatorischen Prozess ist die Rekrutierung immunkompetenter Zellen zu den Orten der Entzündung. Diese migratorischen Prozesse werden durch Chemokine [24] wie MCP-1, Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES), KC oder Fractalkine (C-X<sub>3</sub>-C-Motiv Ligand 1 (CX<sub>3</sub>CL1)) [95] gefördert. Während murines KC (entspricht dem Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC-1) der Ratte und dem humanen Growth regulated oncogene- $\alpha$  (GRO- $\alpha$ )) hauptsächlich auf neutrophile Granulozyten wirkt [14,44], werden Monozyten u. a. über MCP-1 [27], Fractalkine [188] und RANTES [140] rekrutiert. KC ist nach einem Thoraxtrauma bereits früh in der BAL-F und im Plasma in erhöhten Konzentrationen nachweisbar [90] und somit für die schnelle Rekrutierung neutrophiler Granulozyten mit verantwortlich. RANTES und MCP-1 werden ebenso vermehrt in die BAL-F freigesetzt [90,143,144], wobei aber vor allem MCP-1 die Wanderung von Monozyten entscheidend beeinflusst. So wurde in Untersuchungen an Mäusen, die für MCP-1 oder CCR2 defizient waren, eine deutlich verminderte Migration von Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten (mit hoher CCR2-Expression und daher besonders sensibel für MCP-1) festgestellt [135]. In jener Studie, wie auch in einem Thoraxtraumamodell [157], führte die Störung des MCP-1/CCR2-Systems zu erhöhter Inflammation und Verschlechterung der Prognose. Daher scheint MCP-1 eine wichtige Rolle in der Rückbildung der entzündlichen Vorgänge zu spielen. Fractalkine wurde in bisherigen Studien zum Thoraxtrauma noch nicht weiter analysiert, ist aber ein Zytokin mit vielfältigen Funktionen (Zelladhäsion, Migration, Überlebenssignal) [78], das im Zusammenhang mit der Expression seines Rezeptors C-X<sub>3</sub>-C-Motiv Chemokinrezeptor 1 (CX<sub>3</sub>CR1) auf Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten [49] und AM $\Phi$  [97] ins inflammatorische Geschehen nach einem Thoraxtrauma eingreifen könnte. Für diese Theorie spricht, dass bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) [97] und unter hypertonen, hypoxischen Bedingungen [124] bereits erhöhte Expressionsraten von Fractalkine und CX<sub>3</sub>CR1 in der Lunge festgestellt werden konnten.

Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und GM-CSF sind ebenfalls multifunktionale Zytokine, die regulierend in entzündliche Prozesse eingreifen. TGF- $\beta$  reguliert die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Leukozyten, wobei die Art des Einflusses vom Differenzierungsstatus der Zelle und den im umgebenden Milieu vorhandenen Zytokinen abhängig ist [88]. So kann es auf Monozyten stimulierend (erhöhte Zytokinausschüttung und Chemotaxis) und auf Makrophagen inhibitorisch (verminderte Zytokinausschüttung, reduzierte Antigenpräsentation) wirken [5]. GM-CSF ist nicht nur ein wichtiger Regulator für die Differenzierung von Makrophagen und Granulozyten aus Vorläuferzellen des Knochenmarks, sondern beeinflusst auch deren

Funktion als bereits ausdifferenzierte Zellen [56]. In der Lunge können TGF- $\beta$  und GM-CSF sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken. Während die Instillation apoptotischer Zellen in LPS-stimulierte Lungen zur Reduktion der inflammatorischen Reaktion mit beschleunigter Heilung durch TGF- $\beta$  führte [63], erhöhte es bei einem ALI die epitheliale Permeabilität, womit die Entstehung von Ödemen gefördert werden kann [125]. Außerdem ist TGF- $\beta$  langfristig an der Entstehung einer Lungenfibrose beteiligt [41]. Erhöhte Konzentrationen von GM-CSF in der Lunge können einerseits protektiv bei einer sonst lethal verlaufenden Influenza-Infektion der Maus wirken [62]. Andererseits führte die systemische Neutralisierung von GM-CSF in LPS-induziertem ALI zu einer Reduktion der inflammatorischen Reaktion [128].

Knöferl et al. konnten nachweisen, dass die systemische Wirkung des Thoraxtraumas auch die Abgabe von Zytokinen durch Splenozyten beeinflussen kann [71]. So waren die Konzentrationen für IL-2, IL-10, IL-12 und IFN- $\gamma$  in den Kulturüberständen von Splenozyten nach dem Trauma deutlich reduziert [71]. Da diese Zytokine von verschiedenen T-Helferzellen abgegeben werden, deutet das auf eine grundsätzliche Beeinflussung dieser Zellen durch das Thoraxtrauma hin. Die pro-inflammatorische Zytokine IL-2, IL-12 und IFN- $\gamma$  werden dabei hauptsächlich von Typ-1 T-Helferzellen (TH-1) freigesetzt [104] und fördern die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen [45] sowie die erhöhte Ausschüttung von IFN- $\gamma$  [57], dass vor allem Makrophagen aktiviert, die Antigenpräsentation stimuliert, Apoptose fördert und die Proliferation von Typ-2 T-Helferzellen (TH-2) hemmt [141]. Anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und IL-4 werden dagegen vermehrt von TH-2 abgegeben, wobei IL-4 die Differenzierung von TH-2 anregt, gleichzeitig hemmend auf TH-1 wirkt [116] und die Ausschüttung von IL-2 und IFN- $\gamma$  inhibiert [142]. Durch ein Thoraxtrauma können also auch immunkompetente Zellen fernab des Ortes der Verletzung beeinflusst werden, was wiederum vor allem im polytraumatisierten Patienten zu Komplikationen führen kann.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Zytokinkonzentrationen nach einem Thoraxtrauma wichtige Indikatoren des Entzündungsprozesses sind. Dabei sind Monozyten und Makrophagen nicht nur Produzenten der meisten hier genannten Zytokine, sondern werden durch diese auch maßgeblich beeinflusst. Somit ist ihre Untersuchung essentiell für das Verständnis der Entzündungsreaktion im Zusammenhang mit den nach einem stumpfen Thoraxtrauma vermehrt in die Lunge einwandernden Monozyten.

### 1.5. Fragestellung und Zielsetzung

Ein stumpfes Thoraxtrauma führt in der Lunge zu einer gesteigerten Zytokinfreisetzung und einer erhöhten Anzahl an AMΦ, was mit einer vermehrten Einwanderung von Monozyten aus der Zirkulation erklärt werden kann. Der Ablauf dieser migratorischen Vorgänge, der Einfluss des Thoraxtraumas auf die Zusammensetzung der Monozyten-Subpopulationen im Blut, sowie die Frage, ob durch das Thoraxtrauma verschiedene Monozyten-Subpopulationen selektiv in die Lunge rekrutiert werden, sind bisher jedoch weitgehend ungeklärt. Zudem wurde in einer Reihe von Studien festgestellt, dass die gesteigerte Einwanderung von Monozyten in entzündetes Gewebe das Entzündungsgeschehen negativ beeinflussen kann. Der Beitrag der eingewanderten, aktivierten Monozyten an der lokalen und systemischen inflammatorischen Reaktion wurde ebenfalls nach einem Thoraxtrauma noch nicht untersucht.

Daraus ergaben sich folgende Hypothesen:

1. Die nach einem Thoraxtrauma stattfindende Einwanderung von Monozyten in die Lunge unterliegt einer klaren zeitlichen Kinetik. Dabei werden hauptsächlich „inflammatorische“ Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten rekrutiert.
2. Die Einwanderung der Monozyten in die Lunge verstärkt die inflammatorische Reaktion auf ein Thoraxtrauma.

## 2. Material

### 2.1. Puffer und Medien

- Aqua dest. (Ampuwa Spüllösung)                      Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
  
- DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)                      Gibco BRL, Grand Island, NY, USA  
     Zusammensetzung:  
     264 mg/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 mg/l  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ; 200 mg/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 400 mg/l KCl; 3700 mg/l  $\text{NaHCO}_3$ ; 6400 mg/l NaCl; 141 mg/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1000 mg/l D-Glucose in A. dest.
  
- DMEM mit 10% FCS                      Zusammensetzung:  
     500 ml DMEM; 55 ml hitzeinaktiviertes FCS, 5 ml Penicillin-Streptomycin, 500  $\mu\text{l}$  Gentamicin
  
- HBSS (Hank's balanced salt solution mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ )                      Gibco BRL, Grand Island, NY, USA  
     Zusammensetzung:  
     140 mg/l  $\text{CaCl}_2$ ; 100 mg/l  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 100 mg/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 400 mg/l KCl; 60 mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 350 mg/l  $\text{NaHCO}_3$ ; 8000 mg/l NaCl; 48 mg/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1000 mg/l D-Glucose in A. dest.
  
- PBS 1x (Dulbecco's phosphate-buffered saline)                      Gibco BRL, Grand Island, NY, USA  
     Zusammensetzung:  
     200 mg/l KCl; 200 mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 8000 mg/l NaCl; 2160 mg/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  in A. dest.
  
- PBS 10x                      Gibco BRL, Grand Island, NY, USA  
     Zusammensetzung:  
     1000 mg/l  $\text{CaCl}_2$ ; 1000 mg/l  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 2000 mg/l KCl; 2000 mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 80 g/l NaCl; 21,6 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  in A. dest.

- 
- RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute-medium) Gibco BRL, Grand Island, NY, USA  
Zusammensetzung:  
100 mg/l  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 48,84 mg/l  $\text{MgSO}_4$ ;  
400 mg/l KCl; 2000 mg/l  $\text{NaHCO}_3$ ; 6000 mg/l NaCl; 800 mg/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 2000 mg/l D-Glucose in A. dest.
  - RPMI 1640 mit 10% FCS Zusammensetzung:  
500 ml RPMI 1640; 55 ml hitzeinaktiviertes FCS, 5 ml Penicillin-Streptomycin, 500  $\mu\text{l}$  Gentamicin

## 2.2. Chemikalien und sonstige Reagenzien

- Aprotinin Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Bovines Serumalbumin Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Buprenorphin (Temgesic<sup>®</sup>) Boehringer, Mannheim, Deutschland
- Collagenase Typ 1 CellSystems, Troisdorf, Deutschland
- Concanavalin A Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- DiD (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzensulfonat) Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
- Desoxyribonuklease I CellSystems, Troisdorf, Deutschland
- EDTA Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Fetales Kälberserum Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Ficoll-Paque GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
- Hemacolor<sup>®</sup> Schnellfärbeset Merck, Darmstadt, Deutschland
- HEPES Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Kristallviolett Apotheke Universitätsklinikum Ulm
- Leupeptin Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Lipopolysaccharid (*Escherichia coli*-LPS, Serotyp 055:B5) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Natriumhydrogencarbonat Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Natriumchlorid B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Natronlauge Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- N-Ethylmaleimid Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Pepstatin Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- RNaseZAP Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland



- Salzsäure Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Schwefelsäure Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Sevofluran (Sevorane™) Abbott, Wiesbaden, Deutschland
- Trypanblau (0,4%ig) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Trypsin-EDTA Gibco BRL, Grand Island, NY, USA
- Trypsininhibitor Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Waschpuffer-Konzentrat für ELISA BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

### 2.3. Kit's

- Absolutely RNA Miniprep Kit Stratagene, Cedar Creek, USA
- AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit Stratagene, Cedar Creek, USA
- Bio-Plex Pro Assays Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
- Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix Stratagene, Cedar Creek, USA
- Mouse CX<sub>3</sub>CL1/Fractalkine DuoSet® ELISA R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
- Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF-beta 1 Quantikine ELISA Kit R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
- Pierce® BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
- RNeasy MinElute Cleanup Kit Qiagen, Hilden, Deutschland

### 2.4. Geräte

- Aurum Vacuum Manifold Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
- Axio Imager.M1 Mikroskop Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- FACSCanto II BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Heraeus Function Line Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
- Heraeus Heracell Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
- Heraeus Multifuge 3SR Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
- Luminex 200 Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
- Mikrozentrifuge 5417 R Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Mx3000P QPCR System Stratagene, Cedar Creek, USA
- Schüttelwasserbad SW23 Julabo, Allentown, USA

- Shandon Cytospin 3 Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
- Sonifier® Branson, Danbury, USA
- Tecan Sunrise Reader Tecan, Crailsheim, Deutschland
- Ultraschall-Reinigungsgerät USR 30H Merck Eurolab, Longuich, Deutschland
- Ultra-Turrax® Dispergierwerkzeug IKA, Staufen, Deutschland
- Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

## 2.5. Verbrauchsmaterial

- BAL-Katheter (PE-Schlauch, Innendurchmesser 0,58 mm, Wandstärke 0,2 mm) VWR, Darmstadt, Deutschland
- Dialyseschlauch (Thomapor Dialyseschlauch Standard) Reichelt Chemietechnik, Heidelberg, Deutschland
- EDTA-Röhrchen, 1,2 ml Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Kanülen, 26 G B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Mikrotiterplatten (unbehandelte 96 MicroWell-Platte mit flachem Boden) NUNC A/S, Roskilde, Dänemark
- Mikrotiterplatten (C96 MaxiSorp NUNC-Immuno Platte) NUNC A/S, Roskilde, Dänemark
- Mylar® Polyesterfolie, 50 µm Du Pont de Nemur, Bad Homburg, Deutschland
- Objektträger für Zytospins Shandon Cytoslide; Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
- Objektträger, Mattrand Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
- Petrischalen, 60 mm BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Pipetten, 10 ml Costar® Stripette®; Corning Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
- Polystyren-Röhrchen mit Rundboden, 5 ml (FACS-Röhrchen) BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2 ml sowie 2 ml RNase-frei (Biopur Safe-Lock Gefäße) Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Röhrchen, 15 ml und 50 ml BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Spritzen, 1 ml und 3 ml BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Transferpipetten VWR, Darmstadt, Deutschland
- Zellkulturschalen, 100 mm BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

- Zellkulturflaschen, 25 cm<sup>2</sup> Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Zellkulturplatten, 24-Wells BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Zellsiebe, 40 µm und 100 µm BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

### **3. Methoden**

#### **3.1. Tiere und Tierhaltung**

Für die Untersuchungen zu den Wanderungsvorgängen der Monozyten und deren Beitrag zur posttraumatischen Entzündungsantwort wurden männliche C57BL/6J-Mäuse (Jackson Laboratories, Sulzfeld) im Alter von 5-6 Wochen verwendet. Sie wurden in einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus bei einer Raumtemperatur von 21°C und einer Luftfeuchtigkeit zwischen 50% und 60% zu maximal 8 Tieren pro Käfig gehalten. Die Tiere erhielten eine standardisierte Versuchstierernährung (Altromin GmbH, Lage) und Wasser ad libitum. Um den Mäusen Zeit zur Akklimatisierung zu geben, wurden die Versuche frühestens 10 Tage nach Transport in die Laborbereichstierhaltung der Universitätsklinik Ulm durchgeführt. Alle Versuche wurden von der zuständigen Behörde des Regierungspräsidiums Tübingen genehmigt (Tierversuch-Nr. 1003) und vom Tierforschungszentrum Ulm überwacht.

#### **3.2. Narkose der Versuchstiere**

Alle Eingriffe am Versuchstier wurden strikt unter Narkose durchgeführt. Hierfür wurde eine im Labor gut etablierte Spülmaskennarkose mit Sevofluran (Sevorane<sup>TM</sup>; Abbott, Wiesbaden) als Narkosegas verwendet. Die Mäuse wurden über die Spülmaske mit einem Gemisch aus 2,5% Sevofluran und 97,5% medizinischem Sauerstoff versorgt, das mit einem Fluss von 0,8 l/Minute (min) zugeführt wurde. Durch die geringe Blutlöslichkeit des Sevoflurans konnte die Narkose schnell eingeleitet und auch wieder beendet werden [127], so dass die Narkosedauer für die Mäuse so kurz wie möglich gehalten werden konnte.

#### **3.3. Herstellung DiD-gefärbter Liposomen**

Die Untersuchung des zeitlichen Ablaufs der Monozyten-Migration in die Lunge nach einem stumpfen Thoraxtrauma wurde durch Liposomen ermöglicht, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt waren [22,174]. Durch die phagozytotischen Eigenschaften der Monozyten [26,170,169] werden die gefärbten Liposomen aufgenommen, was eine anschließende Verfolgung der markierten Monozyten auf ihrem Weg in die Lunge ermöglicht.

### 3.3.1. Vorbereitungen

Für die Anfärbung der Liposomen wurden Dialyseschläuche (Thomapor Dialyseschlauch Standard; Reichelt Chemietechnik, Heidelberg) verwendet, die entsprechend ihrer Trocken-Verpackung zur Entfernung von Keimen und störenden Metallionen vorbehandelt werden mussten. Nach Kochen in 1 l Wasser mit 20 g Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ; Sigma-Aldrich, Steinheim) und 4 ml 250 mM EDTA (Sigma-Aldrich) mit einem pH von 8,0 für 10 min wurden die Schläuche in 1 l Aqua dest. (Ampuwa Spüllösung; Fresenius Kabi, Bad Homburg) gewaschen. Danach wurden die Schläuche erneut in 1 l Wasser mit 4 ml 250 mM EDTA und einem pH von 8,0 für 10 min gekocht. Die Aufbewahrung erfolgte in der Wasser-EDTA-Lösung bei 4°C. Vor Gebrauch wurden die Schläuche gut mit Aqua dest. gespült, um das EDTA zu entfernen.

### 3.3.2. Färbung

Die Liposomen (PBS-gefüllte Liposomen; Dr. Nico van Rooijen, Amsterdam, Niederlande) wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiD (1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine,4-chlorobenzensulfonat; Invitrogen, Darmstadt) angefärbt [152]. Dafür wurde der feste Farbstoff in einer Konzentration von 2 mg/ml in Ethanol gelöst und der Liposomen-Suspension zugegeben (Endkonzentration DiD: 10 µg/ml). Anschließend wurde die Suspension für 60 min bei 60°C im Schüttelwasserbad (SW23; Julabo, Allentown, USA) inkubiert und in einen Dialyseschlauch gefüllt. Dieser wurde für 24 Stunden (h) bei 25°C in ein Becherglas mit PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) gegeben, um das Ethanol per Diffusion durch die semipermeable Membran des Schlauches aus der Liposomen-Suspension zu entfernen. Die Aufbewahrung erfolgte in einem 15 ml-Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) bei 4°C. Alle Schritte zur Färbung der Liposomen wurden in mit Aluminiumfolie abgedunkelten Röhrchen und Bechergläsern durchgeführt, um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu vermeiden. Die Färbung der Liposomen erfolgt dabei durch Einbau von DiD in die Lipidmembran, in der die Farbmoleküle lateral diffundieren können (Herstellerangaben).

## 3.4. Vorversuche zur Etablierung der Monozytenanfärbung mit DiD-Liposomen und der Monozyten-Depletion mit Clodronate-Liposomen

### 3.4.1. Färbung von Monozyten mit DiD-Liposomen

Nach der Färbung der Liposomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiD wurde der Erfolg der Anfärbung überprüft und untersucht, ob die DiD-Liposomen von den Zellen aufgenommen

wurden. Dafür wurden die Liposomen zunächst *in vitro* zu Zellen mit grundsätzlich hoher Phagozytoseaktivität gegeben. Hierfür wurden aus Kostengründen, und um die Anzahl an Versuchstieren so gering wie möglich zu halten, Alveolarmakrophagen (AM $\Phi$ ) der Ratte (männliche Sprague-Dawley-Ratten, Charles River, Sulzfeld) verwendet. Diese wurden während anderer im Labor parallel durchgeführter Versuche in ausreichender Menge isoliert und zur Verfügung gestellt. Die isolierten AM $\Phi$  (Konzentration  $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden mit 200  $\mu$ l DiD-Liposomen/ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ; Gibco) für 90 min auf einer 60 mm Zellkulturschale inkubiert. Nach Ablösen der Zellen mit Trypsin-EDTA (Gibco) wurden die Zellen mit RPMI 1640-Medium (Roswell Park Memorial Institute-Medium, Gibco) mit 10% FCS (Fetal Calf Serum; Biochrom AG, Berlin) gewaschen und bei  $450 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 10 min zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3SR; Thermo Scientific, Langenselbold). Das Pellet wurde in HBSS resuspendiert und die Zellen für die Analyse im Durchflusszytometer in FACS-Röhrchen (5 ml Polystyren-Röhrchen mit Rundboden; BD) überführt. Als Kontrolle wurden unbehandelte AM $\Phi$  verwendet.

Da der *in vitro*-Versuch mit den AM $\Phi$  der Ratte zu validen Ergebnissen führte, wurde anschließend die Anfärbung von zirkulierenden Blutmonozyten im eigentlichen Versuchstier, der Maus, untersucht. Die Durchführung der Versuche erfolgte dabei in Anlehnung an Studien anderer Arbeitsgruppen, in denen Monozyten *in vivo* mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt werden konnten [32,82,156]. Hierbei wurde den Mäusen in Sevofluran-Narkose 200  $\mu$ l der DiD-Liposomen-Suspension bzw. 200  $\mu$ l PBS-Liposomen als Kontrolle intravenös über die Penisvene gespritzt. Nach 24 h wurden die Versuchstiere in Narkose über Punktion des rechten Ventrikels entblutet und je 50  $\mu$ l des Vollblutes für die Messung im Durchflusszytometer in FACS-Röhrchen überführt (siehe 3.5.5.5).

### **3.4.2. Depletion der Monozyten mit Clodronate-Liposomen**

Um den Einfluss der Monozyten-Migration in die Lunge auf die lokale und systemische Entzündungsantwort nach einem stumpfen Thoraxtrauma untersuchen zu können, wurde in Monozyten mit Hilfe von Clodronate-Liposomen (Dichloromethylen-Diphosphonat; Roche Diagnostics, Mannheim) der programmierte Zelltod (Apoptose) ausgelöst [176,177,175]. Dafür wurden den Mäusen in Sevofluran-Narkose 200  $\mu$ l der Clodronate-Liposomen-Suspension (Clodronate-Liposomen in PBS; Dr. Nico van Rooijen, Amsterdam, Niederlande; die verabreichte Konzentration entspricht etwa 1 mg Clodronate) intravenös über die Penisvene gespritzt. Als Kontrollen wurden PBS-Liposomen und PBS verwendet, die den Mäusen in gleicher Menge verabreicht wurden. Gleichzeitig wurde als weitere Kontrolle das Blut einer unbehandelten Maus untersucht,

um eventuelle Einflüsse der Applikation von PBS bzw. PBS-Liposomen auf die Monozyten-Zellzahl auszuschließen. Das Ausmaß der Monozyten-Depletion wurde 18 h nach Applikation der Clodronate-Liposomen durch durchflusszytometrische Analyse des Vollblutes überprüft (siehe 3.5.5.5).

### **3.5. Hauptstudien zur Untersuchung der Kinetik der Monozyten-Migration in die Lunge und zum Einfluss der Monozyten auf das lokale und systemische Entzündungsgeschehen nach stumpfem Thoraxtrauma**

#### **3.5.1. Versuchsgruppen der Hauptstudien**

Die Untersuchungen zur Kinetik der pulmonalen Monozyteneinwanderung nach einem stumpfen Thoraxtrauma durch Markierung der Monozyten mit DiD-gefärbten Liposomen wurden an drei Gruppen durchgeführt.

1. Thoraxtrauma, Monozyten DiD-markiert (n=10)
2. Kontrolleingriff, Monozyten DiD-markiert (n=10)
3. Kontrolleingriff, Monozyten nicht mit DiD-gefärbten Liposomen vorbehandelt (n=4)

Dabei erfolgte die Markierung der Monozyten mit den DiD-Liposomen 24 h vor der Induktion des Thoraxtraumas bzw. des Kontrolleingriffs. Die Versuchstiere wurden 2 h, 24 h und 48 h nach Thoraxtrauma oder der Kontrollbehandlung in tiefer Sevofluran-Narkose durch kardiale Punktion und Entbluten getötet und die Proben am getöteten Tier entnommen.

Die Untersuchung der Bedeutung der Monozyteneinwanderung auf die posttraumatische Entzündungsantwort der Lunge durch Depletion der Monozyten erfolgte an vier Gruppen.

1. Thoraxtrauma, Monozyten-Depletion mit Clodronate-Liposomen (n=10)
2. Kontrolleingriff, Monozyten-Depletion mit Clodronate-Liposomen (n=10)
3. Thoraxtrauma, keine Monozyten-Depletion (als Kontrolle: PBS) (n=10)
4. Kontrolleingriff, keine Monozyten-Depletion (als Kontrolle: PBS) (n=10)

Die Clodronate-Liposomen bzw. das PBS wurde den Versuchstieren 18 h vor dem Thoraxtrauma oder dem Kontrolleingriff verabreicht. Das Töten der Versuchstiere zur Probenentnahme erfolgte in tiefer Sevofluran-Narkose durch kardiale Punktion und Entbluten 24 h nach dem Thoraxtrauma oder der Kontrollbehandlung.

#### **3.5.2. Anfärben und Depletion der Monozyten**

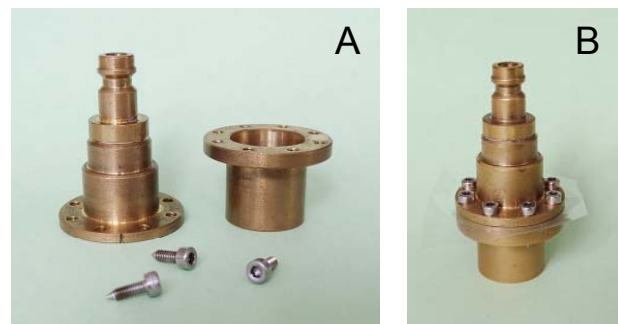
Wie in den Vorversuchen etabliert, wurde den Mäusen entweder 200 µl DiD-Liposomen-Suspension oder 200 µl Clodronate-Liposomen bzw. PBS als Kontroll-Lösung intravenös verabreicht. Dafür wurden die Mäuse in tiefer Sevofluran-Narkose in Rückenlage auf einer

Plexiglasplatte fixiert und die entsprechenden Lösungen über die Penisvene injiziert. Um eventuell verklumpte Liposomen zu lösen wurden sie in der benötigten Menge in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) kurz vor Gebrauch für 60 Sekunden in ein Ultraschallbad (Ultraschall-Reinigungsgerät USR 30H, Merck Eurolab, Longuich) gegeben.

### 3.5.3. Induktion eines stumpfen Thoraxtraumas mittels Druckwellengenerator

#### 3.5.3.1. Druckwellengenerator

Das stumpfe Thoraxtrauma wurde durch einen ursprünglich von Jaffin et al. [64] für die Ratte entwickelten und im Traumalabor der Universitätsklinik Ulm für die Maus abgewandelten [72] Druckwellengenerator erzeugt (Abb. 1, eigene Herstellung: Wissenschaftliche Werkstatt, Feinwerktechnik, Universität Ulm, Oberer



**Abb. 1. Druckwellengenerator.** (A) Getrennter oberer (links) und unterer Zylinder mit Verbindungsschrauben. (B) Generator in zusammengebauter Form mit eingespannter Mylar® Polyesterfolie.

Messingzylindern, die durch eine 50 µm dicke Mylar® Polyesterfolie (Du Pont de Nemur, Bad Homburg) getrennt sind. Der obere Zylinder war über einen auf 13 bar eingestellten Druckminderer (Flaschendruckminderer Zinser; Ebersbach) mit einer Flasche medizinischer Druckluft (MTI, Neu-Ulm) verbunden. Der untere Zylinder (Durchmesser: 1,6 cm, Länge: 2 cm) ist unten offen und wurde in einer Höhe von 1,4 cm über dem Thorax der Versuchstiere angebracht. Über ein elektronisch auslösbares Hochgeschwindigkeitsventil (Hee-D-24; Festo, Esslingen), strömte Druckluft in den oberen Zylinder und der Überdruck führte zum Zerreißen der zwischen den Zylindern angebrachten Polyesterfolie. Die dadurch entstehende Druckwelle entweicht durch den unteren Zylinder auf das Versuchstier und löst so eine stumpfe, beidseitige Lungenkontusion ohne Verletzung der knöchernen Strukturen des Thorax bzw. der abdominalen Organe aus.

#### 3.5.3.2. Induktion des stumpfen Thoraxtraumas

Die Versuchstiere wurden zunächst gewogen und in tiefer Sevofluran-Narkose in Rückenlage auf einer Plexiglasplatte fixiert. Für die genaue Positionierung des Druckwellengenerators wurde den Mäusen Thorax und Abdomen rasiert und



anschließend die Sternum-Mitte, der Processus xiphoideus und der Rippenbogen angezeichnet. Der Druckwellengenerator konnte so mit seinem Unterrand am Übergang des Processus xiphoideus zum Corpus sterni genau über der Mitte des Thorax positioniert werden. In der Inspirationsphase wurde das Hochgeschwindigkeitsventil geöffnet und die Versuchstiere der Druckwelle ausgesetzt. Den nach einer kurzen Apnoephase (ca. 10 Sekunden) wieder spontan atmenden Mäusen wurden anschließend als Analgesie 0,03 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin (Temgesic®; Boehringer, Mannheim) subkutan verabreicht. Nach Beendigung der Narkose wurde im Abstand von 12 h der Allgemeinzustand der Mäuse überprüft und die Buprenorphin-Gabe im Rahmen dieser Überwachung wiederholt. Die Kontrolltiere wurden allen für die Applikation eines Thoraxtraumas notwendigen Manipulationen ausgesetzt, jedoch wurde kein Thoraxtrauma induziert.

#### **3.5.4. Gewinnung des Probenmaterials**

Das Entbluten der Versuchstiere erfolgte in tiefer Sevofluran-Narkose durch Punktion des rechten Ventrikels mit einer 1 ml-Insulinspritze (BD). Anschließend wurde das Blut in ein 1,2 ml-EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und in diesem bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Nach Eröffnung des Thorax wurde über einen kleinen Schnitt ein Katheter (PE-Schlauch, Innendurchmesser 0,58 mm, Wandstärke 0,2 mm; VWR, Darmstadt) in die Luftröhre eingeführt und eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. Dafür wurden 0,7 ml kaltes PBS in die Lunge gespritzt und der Rücklauf in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß zu 1 µl Proteinaseinhibitor-Cocktail gegeben (bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit 1 (BAL-F1)). Der Proteinaseinhibitor-Cocktail bestand aus Leupeptin (1 mg/ml; Sigma-Aldrich), Trypsininhibitor (10 mg/ml; Sigma-Aldrich), Aprotinin (1 mg/ml; Sigma-Aldrich) und Pepstatin (1 mg/ml; Sigma-Aldrich) im Verhältnis 12:10:5:2. Anschließend wurde die Lunge weitere siebenmal mit PBS gespült und der Rücklauf in einem 15 ml-Röhrchen auf Eis gesammelt (BAL-F2). Danach wurden die Lungenflügel separat entnommen. Die linke Lunge wurde in ein 50 ml-Röhrchen (BD) zu 5 ml RPMI 1640 mit 172 U Collagenase Typ 1 (CellSystems, Troisdorf) und 0,1 mg/ml Desoxyribonuklease I (Dnase I; CellSystems, Troisdorf) gegeben, um Monozyten und interstitielle Makrophagen zu isolieren. Die rechte Lunge wurde für später folgende Analysen in einem 2 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Schließlich wurden beide Femora entnommen und bis zur Isolation des Knochenmarks in einem 15 ml-Röhrchen mit 5 ml PBS auf Eis gelagert. Für die Untersuchung der posttraumatischen Entzündungsantwort durch Depletion der Monozyten wurden zusätzlich Zellkulturen von Milzmakrophagen und Splenozyten angelegt. Dafür wurde die

Milz entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in einem 50 ml-Röhrchen in 9 ml PBS auf Eis gelegt.

### **3.5.5. Aufarbeitung des Probenmaterials**

#### **3.5.5.1. Blutproben**

Das Blut wurde in den EDTA-Röhrchen bei  $400 \times g$  und  $4^\circ C$  für 10 min zentrifugiert und das Blutplasma abgenommen. Bis zur Analyse wurde das Plasma in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aliquotiert bei  $-80^\circ C$  gelagert. Die verbliebenen Blutzellen wurden im gleichem Volumen wie das abgenommene Blutplasma mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung resuspendiert und je 50  $\mu l$  Blut für die Analyse im Durchflusszytometer in FACS-Röhrchen gegeben.

#### **3.5.5.2. Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeiten**

Die BAL-F1 und BAL-F2 wurden für 10 min bei  $400 \times g$  und  $4^\circ C$  zentrifugiert. Der Überstand der BAL-F1 wurde aus dem 1,5 ml-Reaktionsgefäß abgenommen und für spätere Analysen bei  $-80^\circ C$  eingefroren. Der Überstand der BAL-F2 wurde verworfen. Die Zellsedimente beider Lavage-Flüssigkeiten wurden in jeweils 250  $\mu l$  PBS resuspendiert und in einem 15 ml-Röhrchen kombiniert. Anschließend erfolgte die Zellzählung mit Kristallviolett (Apotheke Universitätsklinik Ulm). Danach wurden die Zellen erneut für 10 min bei  $400 \times g$  und  $4^\circ C$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200  $\mu l$  PBS mit 1% BSA resuspendiert und auf FACS-Röhrchen verteilt.

#### **3.5.5.3. Isolation von Monozyten und interstitiellen Makrophagen aus dem Lungengewebe**

Die linken Lungenhälften wurden in der Collagenase Typ 1-DNase I-Lösung im 50 ml-Röhrchen mit der Schere mechanisch zerkleinert und danach im Schüttelwasserbad bei  $37^\circ C$  für 90 min inkubiert. Anschließend wurde das Homogenisat über ein 100  $\mu m$ -Zellsieb (BD) filtriert. Das Gewebe wurde dabei unter ständiger Zugabe von RPMI 1640-Medium vorsichtig mit dem Stempel einer 3 ml-Spritze (BD) durch das Sieb gerieben. Nach Auffüllen auf 40 ml mit RPMI 1640-Medium wurde das Homogenisat zusätzlich über ein 40  $\mu m$ -Zellsieb (BD) gegeben, um Bindegewebsreste möglichst vollständig zu entfernen. Anschließend wurde die Zellsuspension für 10 min bei  $400 \times g$  und  $4^\circ C$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen nochmals mit 30 ml RPMI 1640-Medium gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min,  $400 \times g$ ,  $4^\circ C$ )

wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 600 µl PBS mit 1% BSA resuspendiert und auf FACS-Röhrchen aufgeteilt.

#### **3.5.5.4. Isolation von Knochenmark**

Die Femora der Versuchstiere wurden von Muskeln und Sehnen befreit und die Epiphysen abgeschnitten. Danach wurden die Markhöhlen über eine 26 G-Kanüle (B. Braun) mit 10 ml PBS durchspült und das so gewonnene Knochenmark in einer 100 mm-Zellkulturschale (BD) gesammelt. Die Zellsuspension wurde über ein 100 µm-Zellsieb in ein 50 ml-Röhrchen überführt und die Zellkulturschale zweimal mit PBS gespült. Nach der Zentrifugation bei  $400 \times g$  und  $4^{\circ}C$  für 15 min wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet resuspendiert und die Knochenmarkszellen in 5 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco) resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation, bei der die Zellsuspension über 5 ml Ficoll-Paque (GE Healthcare, Freiburg) geschichtet und danach für 30 min bei  $340 \times g$  und Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Die gewünschten Knochenmarkszellen befanden sich in der Interphase zwischen dem Medium und der Schicht mit dem klaren Ficoll-Paque und wurden mit einer Transferpipette (VWR, Darmstadt) in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Nach Auffüllen auf 15 ml mit PBS wurden die Röhrchen für 10 min bei  $400 \times g$  und  $4^{\circ}C$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert, die Zellzahl mit Kristallviolett bestimmt und anschließend mit PBS mit 1% BSA auf  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Ein Teil der Zellsuspension wurde für die Analyse im Durchflusszytometer auf FACS-Röhrchen aufgeteilt. Der andere Teil der Knochenmarkszellen wurde für die Isolation von RNA lysiert (600 µl Lysepuffer + 4,2 µl  $\beta$ -Mercaptoethanol für  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  Zellen; Absolutely RNA Miniprep Kit, Stratagene, Cedar Creek, USA) und bei  $-80^{\circ}C$  aufbewahrt.

#### **3.5.5.5. Durchflusszytometrie**

##### **3.5.5.5.1. Methode**

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren zur Analyse von Zellsuspensionen. Dabei passieren die Zellen in einem Hochgeschwindigkeits-Flüssigkeitsstrom einzeln nacheinander einen oder mehrere Laserstrahlen. Je nach Beschaffenheit der Zelle wird das Licht der Laserstrahlen unterschiedlich gestreut und von speziellen Detektoren ausgewertet. So korreliert das Vorwärtsstreulicht (FSC) mit der Größe einer Zelle und das Seitwärtsstreulicht (SSC) mit deren Granularität und der Beschaffenheit des Zellkerns. Durch zusätzliche Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern oder durch Markierung mit fluoreszenzfarbstoff-gefärbten Liposomen können die Zellen weiter kategorisiert werden.

Der Einsatz unterschiedlicher Fluoreszenzkanäle macht eine gleichzeitige Färbung mit mehreren Farbstoffen möglich. Die Ergebnisse werden in Histogrammen oder sogenannten DotPlots wiedergegeben, bei denen jeder Punkt einer gemessenen Zelle entspricht.

### 3.5.5.5.2. Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen

Die im Vorversuch verwendeten isolierten AM $\Phi$  der Ratte wurden sofort nach ihrer Aufarbeitung mit einem FACSCanto II-Durchflusszytometer (BD) analysiert. Es wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Ereignisse gemessen und mit der dazugehörigen Software (FACSDiva; BD) ausgewertet. Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen des Vollblutes sowie der isolierten Zellen des Knochenmarks, der BAL-F und der Lunge, wurden die Zellen mit den in Tabelle 1 aufgeführten Antikörpern gefärbt. Nach Zugabe der Antikörper wurden die Proben für 25 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben der BAL-F, des Knochenmarks und der Lunge mit 3 ml PBS mit 1% BSA aufgefüllt und die FACS-Röhrchen bei  $300 \times g$  und  $4^\circ C$  für 5 min zentrifugiert. In den Proben der isolierten Blutzellen wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 2 ml Aqua dest. lysiert und der isotonische Zustand der Zellsuspension mit 1 ml 2,7%iger Natriumchlorid-Lösung (VWR) wiederhergestellt. Die FACS-Röhrchen wurden bei  $300 \times g$  und  $4^\circ C$  für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die gefärbten Zellen in 300  $\mu$ l PBS mit 1% BSA resuspendiert. Die Analyse der Zellen erfolgte ebenfalls mit dem FACSCanto II-Durchflusszytometer durch Messung von  $1 \times 10^5$  Ereignissen. Die Zellen wurden anhand von Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität ausgewertet.

**Tabelle 1. Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper.**

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller	Konzentration (mg/ml)	eingesetzte Menge ( $\mu$ l)
rat IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	0,5	1
rat anti-mouse CD11b	FITC	BD Biosciences	0,5	0,5
rat IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$	PerCP	BD Biosciences	0,2	1
rat anti-mouse CD45	PerCP	BD Biosciences	0,2	1
rat anti-mouse CD62L	PE	Acris Antibodies, Herford, Deutschland	0,1	1
rat IgG <sub>2c</sub> , $\kappa$	PE	BD Biosciences	0,2	1
rat anti-mouse Ly-6C	PE	Abcam, Cambridge, UK	0,1	1
Fc-Block (CD16/CD32)		BD Biosciences	0,5	2

### 3.5.5.6. Mikroskopie

Um die Auswirkungen der Clodronate-Liposomen auf die Monozyten im Blut besser beurteilen zu können, wurden die Blutzellen neben der Analyse im Durchflusszytometer auch histologisch untersucht. Dafür wurde von der für die Durchflusszytometrie verwendeten Zellsuspension ein Zytopspinpräparat angefertigt. Dabei wurden die Zellen mit Hilfe einer speziellen Zentrifuge (Shandon Cytospin 3; Thermo Scientific, Dreieich) auf Objektträger (Shandon Cytoslide; Thermo Scientific) aufgebracht (800 × g, 3 min). Die Präparate wurden nach dem Lufttrocknen fixiert (10 min in 100% Methanol) und mit der Schnellfärbemethode Hemacolor<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers gefärbt. Die Färbung führt zu rot bis rotvioletten Zellkernen und grau-blauem Plasma, während die Granula neutrophiler Granulozyten hellviolett gefärbt werden. Die Auswertung der Zytopspins erfolgte bei 400-facher Vergrößerung mit einem Axio Imager.M1-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen).

### 3.5.5.7. Isolation von Splenozyten und Milzmakrophagen

Die in 9 ml PBS gelagerte Milz wurde in eine 60 mm-Petrischale (BD) gegeben und zwischen zwei vorher autoklavierten Mattrand-Objektträgern (Menzel-Gläser, Braunschweig) mit der matten Seite zerrieben. Die Kapsel und Bindegewebsreste wurden entfernt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt und die Petrischale zweimal mit PBS nachgespült. Nach Zentrifugation bei 400 × g und 4°C für 15 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet resuspendiert. Um die Erythrozyten zu lysieren wurden 1,8 ml Aqua dest. zum Zellpellet gegeben, 5-7 Sekunden geschüttelt und dann sofort 200 µl 10x-PBS (Gibco) zugeben um den isotonischen Zustand der Zellsuspension wiederherzustellen. Nach Zugabe von 8 ml 1x-PBS wurde die Zellsuspension mit einer 10 ml-Pipette (Costar<sup>®</sup> 10 ml Stripette<sup>®</sup>; Corning Life Sciences, Amsterdam, Niederlande) aufgezogen und langsam in das 50 ml-Röhrchen abgelassen, so dass die noch in der Suspension enthaltenen Gewebereste in der Pipette zurückblieben. Nach Zentrifugation bei 400 × g und 4°C für 15 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml RPMI 1640 mit 10% FCS resuspendiert. Danach erfolgte eine Zellzahlbestimmung mit Trypanblau (0,4%ig; Sigma-Aldrich) in einer Neubauer-Zählkammer. Um die Splenozyten in Kultur zu bringen, wurden 10 ml der Zellsuspension in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche (Sarstedt) gegeben und zusammen mit Concanavalin A (Konzentration: 1 mg/ml; Sigma-Aldrich) als Stimulanz für 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Heraeus Heracell; Thermo Scientific, Langenselbold) kultiviert. Für die Isolation von Milzmakrophagen wurde die Zellsuspension (Konzentration:  $1 \times 10^7$  Zellen/ml) in einer

24-Well-Zellkulturplatte (BD) für 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die nicht adhärenen Zellen durch zweimaliges Waschen mit DMEM entfernt und die adhärenen Zellen in 1 ml DMEM mit 10% FCS und 1 µg/ml Lipopolysaccharid (*Escherichia coli*-LPS, Serotyp 055:B5; Sigma-Aldrich) für 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Kulturüberstände beider Zellkulturen abgenommen und bei 340 × g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C bis zur Analyse der von den Zellen abgegebenen Mediatoren aufbewahrt.

#### **3.5.5.8. Herstellen von Lungenhomogenisaten**

Für die Bestimmung von Zytokinmengen im Lungenhomogenisat wurden die Lobi medialis, caudalis und accessorius der rechten Lungen verwendet. Sie wurden in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und in einem Puffer (pro Lunge: 721,1 µl PBS, 750 µl EDTA [1 mg/ml, Sigma-Aldrich], 1,875 µl N-Ethylmaleimid [0,1 g/ml 50%iges Ethanol, Sigma-Aldrich], 1,5 µl Pepstatin, 3 µl Aprotinin, 7,5 µl Leupeptin und 15 µl Trypsininhibitor) zunächst mit Hilfe eines Ultra-Turrax<sup>®</sup>-Dispergierwerkzeuges (IKA, Staufen) und anschließend mit einem Sonifier<sup>®</sup> (Branson, Danbury, USA) zerkleinert. Danach wurden weitere 500 µl des Puffers zur Suspension gegeben und für 15 min bei 16000 × g und 4°C zentrifugiert (Mikrozentrifuge 5417 R; Eppendorf). Die Überstände wurden bis zur Analyse bei -80°C eingefroren.

#### **3.5.5.9. Bestimmung der Proteinkonzentrationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit und im Lungenhomogenisat**

Die Gesamtproteinmengen in der BAL-F und im Lungenhomogenisat wurden mit einem Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Bonn) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Proben der BAL-F wurden 1:4 und die des Lungenhomogenisates 1:10 verdünnt eingesetzt. Für die Messung wurden pro Probe 3 x 10 µl in eine Mikrotiterplatte (unbehandelte 96 MicroWell-Platte mit flachem Boden; NUNC A/S, Roskilde, Dänemark) pipettiert, mit je 200 µl der BCA-Reagenz versetzt und für 30 min bei 37°C im Brutschrank (Heraeus Function Line; Thermo Scientific, Langenselbold) inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm an einem Tecan Sunrise Reader (Tecan, Crailsheim) gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand des Standards ermittelt.

### 3.5.5.10. Messung der Zytokinkonzentrationen

#### 3.5.5.10.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Konzentration von Fractalkine (CX<sub>3</sub>CL1) in der BAL-F sowie die Konzentrationen von Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in der BAL-F und im Lungenhomogenisat wurden mittels ELISA bestimmt. Dafür wurden ein Mouse CX<sub>3</sub>CL1/Fractalkine DuoSet<sup>®</sup> ELISA (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) mit einer Sensitivität von 0,391 – 25 ng/ml und ein Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF-beta 1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) mit einer Sensitivität von 31,2 – 2000 pg/ml verwendet. Die Durchführung richtete sich nach den Empfehlungen des Herstellers.

#### Fractalkine

Zunächst wurde eine Mikrotiterplatte (C96 MaxiSorp NUNC-Immuno Platte; NUNC A/S) mit dem für Fractalkine spezifischen Antikörper (Konzentration: 4  $\mu$ g/ml, verdünnt mit PBS) beschichtet. Dafür wurden 100  $\mu$ l des Antikörpers pro Well pipettiert und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 300  $\mu$ l Waschpuffer („Wash Concentrate“, BD; Verdünnung 1:20) wurden pro Well 200  $\mu$ l „Reagent Diluent“ (1% BSA in PBS) auf die Platte gegeben, um unspezifische Bindungen zu blocken. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 90 min bei Raumtemperatur gefolgt von dreimaligem Waschen mit 300  $\mu$ l Waschpuffer. Es wurden jeweils 100  $\mu$ l der Proben (1:4 verdünnt mit „Reagent Diluent“) bzw. des Standards (in Konzentrationen von 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,125 ng/ml, 1,563 ng/ml, 0,781 ng/ml, 0,391 ng/ml und 0 ng/ml, verdünnt mit „Reagent Diluent“) in Doppelbestimmung auf die Platte pipettiert. Nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht und drei Waschschritten wurden pro Well 100  $\mu$ l des Detektions-Antikörpers (Konzentration: 200 ng/ml, verdünnt mit „Reagent Diluent“) gegeben und die Platte erneut für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der Platte wurden 100  $\mu$ l Streptavidin-Meerrettichperoxidase pro Well zugegeben, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Platte erneut gewaschen. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Tetramethylbenzidin-Substrat (Mischung aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin im Verhältnis 1:1, TMB Substrat Reagent Set; BD) pro Well pipettiert und nach einer Inkubationszeit von 30 min im Dunkeln die Farbentwicklung mit 50  $\mu$ l 2 N Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Sigma-Aldrich) gestoppt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch bestimmt (Tecan Sunrise Reader, Referenzfilter 570 nm) und die Fractalkine-Konzentrationen anhand des Standards ermittelt.

## TGF- $\beta$ 1

Um TGF- $\beta$ 1 in der BAL-F und im Lungenhomogenisat nachweisen zu können, musste das latente TGF- $\beta$ 1 in seine aktive Form überführt werden. Dafür wurden 100  $\mu$ l der Proben mit 20  $\mu$ l 1 N Salzsäure (HCl; Sigma-Aldrich) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisierung der Proben wurde durch Zugabe von 20  $\mu$ l 1,2 N Natronlauge (NaOH; Sigma-Aldrich) mit 0,5 M HEPES (Sigma-Aldrich) realisiert. Die Proben des Lungenhomogenisates wurden nach der Aktivierung mit 1% BSA in PBS weiter verdünnt. Nach der Vorbereitung der Proben wurden 50  $\mu$ l „Assay Diluent“ in die Wells der mit dem TGF- $\beta$ 1-spezifischen monoklonalen Antikörper beschichteten Mikrotiter-Streifenplatte pipettiert. Anschließend wurden 50  $\mu$ l des Standards (in Konzentrationen von 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml und 0 pg/ml), der Kontrolle sowie der Proben in Doppelbestimmung auf die Platte gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Platte viermal mit 300  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen wurde, wurden 100  $\mu$ l des mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten polyklonalen TGF- $\beta$ 1-Antikörpers dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur wurde die Platte erneut gewaschen und 100  $\mu$ l des Tetramethylbenzidin-Substrates dazupipettiert. Die Farbentwicklung wurde nach 30 min im Dunkeln durch Zugabe von 100  $\mu$ l verdünnter Salzsäure (im Kit enthalten) gestoppt und die Absorption wie oben bereits beschrieben gemessen.

### **3.5.5.10.2. Multiplex Immunoassay**

Diese Methode zur Analyse von Zytokinkonzentrationen basiert auf dem Prinzip eines ELISA. Die Besonderheit hierbei ist, dass die Antikörper gegen die zu bestimmenden Zytokine an Mikropartikel („Beads“) gebunden sind. Jedes Bead hat dabei einen eigenen Farbcode, der durch Färbung mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen möglich wird. An jedes dieser speziell gefärbten Beads kann also ein anderer Antikörper gekoppelt werden. Anhand des Farbcodes können die Beads und somit auch die an deren Antikörper gebundenen Moleküle unterschieden werden. Dies ermöglicht die gleichzeitige Analyse mehrerer Zytokine in einer einzigen Probe. Die Durchführung erfolgt in einer speziellen Mikrotiterplatte, bei der durch Vakuum die Flüssigkeiten abgesaugt werden, ohne die Beads und deren gebundene Stoffe aus den Wells zu entfernen (Aurum Vacuum Manifold, Bio-Rad Laboratories, München). Sind die Zytokine über die Antikörper an die Beads gebunden werden biotinylierte Detektionsantikörper dazugegeben, die an die Zytokine binden. Die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in der Probe erfolgt schließlich durch Ankoppeln eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Phycoerythrin)



konjugierten Streptavidins an die Detektionsantikörper. Analysiert werden die Proben in einem Durchflusszytometer mit zwei unterschiedlichen Lasern (Luminex 200, Invitrogen), wobei einer für die Erkennung des Farbcodes der verschiedenen Beads und der andere für die Konzentrationsbestimmung des Zytokins verantwortlich ist.

Mit Hilfe dieser Methode wurden folgende Zytokine in der BAL-F, im Plasma, in den Lungenhomogenisaten sowie in den Kulturüberständen von Splenozyten und Milzmakrophagen gemessen: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, MCP-1, KC, GM-CSF, IFN- $\gamma$  und RANTES. Dafür wurden selbst zusammengestellte Bio-Plex Pro Assays (Bio-Rad Laboratories) verwendet, die nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurden.

#### **3.5.5.11. RNA-Isolation**

Die RNA der bereits lysierten Knochenmarkszellen (siehe 3.5.5.4.) wurde mit dem Absolutely RNA Miniprep Kit (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Um einen RNA-Abbau durch RNasen (Ribonuklease) zu verhindern, wurden zusätzlich RNase-freie Reaktionsgefäße (2 ml Biopur Safe-Lock Gefäße; Eppendorf) verwendet und die benutzen Geräte und Oberflächen mit RNaseZAP (Sigma-Aldrich) behandelt. Da die isolierte RNA in einer reversen Transkription in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben werden sollte, wurde zu den Proben RNase-freie DNase I gegeben um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern. Nach der Isolation wurde die RNA mit Hilfe eines RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und konzentriert. Die Bestimmung der RNA-Menge erfolgte spektrophotometrisch (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) bei 260 nm. Bis zur Durchführung der reversen Transkription wurde die RNA bei -80°C gelagert.

#### **3.5.5.12. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

Um die RNA-Expression von CD11b, CD62L, CCR2, CX<sub>3</sub>CR1 und TGF- $\beta$ 1 in den Knochenmarkszellen zu untersuchen, wurde eine RT-PCR durchgeführt.

##### **3.5.5.12.1. Reverse Transkription**

In der reversen Transkription wurde die RNA der isolierten Knochenmarkszellen mit dem AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene) in cDNA umgeschrieben. Es wurde 1  $\mu$ g RNA in einem Gesamt-Reaktionsvolumen von 40  $\mu$ l eingesetzt und wie folgt inkubiert: 5 min bei 25°C, 15 min bei 42°C und 5 min bei 95°C. Danach wurden die Proben 1:5 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20°C aufbewahrt. Zusätzlich zu

den Proben der Knochenmarkszellen wurde eine Referenz-RNA (QPCR Mouse Reference Total RNA; Stratagene) in cDNA umgeschrieben. Sie diente später dazu mehrere PCR-Läufe zu einem Zytokin durch Bestimmung eines Umrechnungsfaktors miteinander vergleichen zu können. Parallel wurde von jeder Probe eine „NoRT-Kontrolle“ zum Ausschluss der Amplifikation genomischer DNA durchgeführt.

### 3.5.5.12.2. Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt und enthielt 5 µl cDNA, 2,5 µl Primerassay (Tabelle 2) und 12,5 µl Mastermix (Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix; Stratagene). Die Durchführung erfolgte mit einem Mx3000P QPCR System und der dazugehörigen MxPro Software (Stratagene). Nach der anfänglichen Denaturierung bei 94°C für 10 min wurde folgendes Temperaturprofil in 39 Zyklen durchlaufen: 15 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 55°C und 30 Sekunden bei 72°C. Bei jedem PCR-Lauf wurden als Kontrollen die NoRT-Proben, eine Negativkontrolle ohne cDNA sowie die aus der Referenz-RNA transkribierte cDNA mitgeführt. Als Housekeeping-Gen für die Normalisierung der Proben wurde Peptidylprolylisomerase A (PPIA) verwendet. Für die Kontrolle der Spezifität der entstandenen PCR-Produkte wurde an jeden PCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse angeschlossen. Dabei wurden die Proben kontinuierlich von 55°C auf 95°C erhitzt. Der dabei entstandene Peak gab Aufschluss über das entstandene Amplifikat. Die relative Genexpression der Traumatiere im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet und die Werte für die statistische Auswertung mit dem Logarithmus ( $\log_2$ ) linearisiert.

**Tabelle 2. Für die Real-Time-PCR verwendete Primer.**

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Produktlänge (Basenpaare)</b>
CD11b	QuantiTect Primer Assay (Qiagen, Hilden, Deutschland) Bestellnr. QT00156471	139
CD62L	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) Bestellnr. QT00101164	141
CCR2	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) Bestellnr. QT02276813	114
CX <sub>3</sub> CR1	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) Bestellnr. QT00259126	63
TGF-β1	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) Bestellnr. QT00145250	145
PPIA	QuantiTect Primer Assay (Qiagen) Bestellnr. QT00247709	119

### **3.5.6. Statistik**

Die Daten wurden mit SigmaStat 3.5 (Systat Software, Erkrath) auf statistische Unterschiede untersucht. Dafür wurde zunächst eine einfaktorielle Varianzanalyse (One Way ANOVA) durchgeführt, um signifikante Unterschiede nachzuweisen und anschließend mit einem post-hoc-Test nach Student-Newman-Keuls bestimmt, zwischen welchen Gruppen die statistischen Unterschiede bestehen. Bei einem  $p$ -Wert  $<0,05$  wurden die Daten als signifikant erachtet. Die grafische Aufarbeitung erfolgte mit SigmaPlot 11.0 (Systat Software) und zeigt die Daten, falls nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SEM).

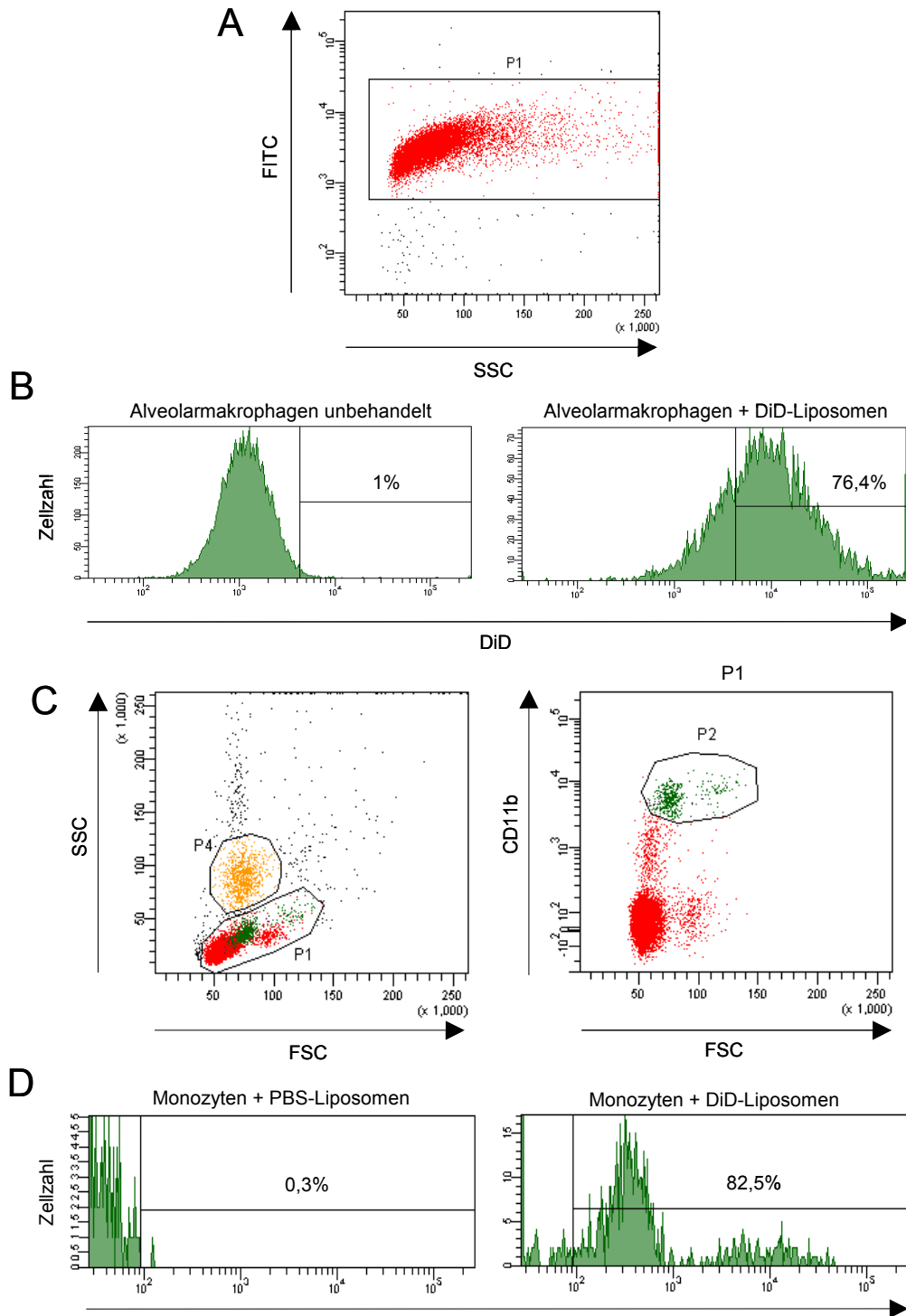
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Vorversuche

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Monozyten bei lokalen und systemischen inflammatorischen Veränderungen nach einem stumpfen Thoraxtrauma im Maus-Tiermodell zu untersuchen. Um die Monozyten auf ihrem Weg verfolgen zu können bzw. ihren Einfluss auf die Entzündungsantwort besser beurteilen zu können, war zunächst die Etablierung der Methoden zur Anfärbung der Monozyten mit DiD-Liposomen und zur Depletion von Monozyten durch Clodronate-Liposomen nötig.

#### 4.1.1. Anfärbung der Monozyten mit DiD-Liposomen

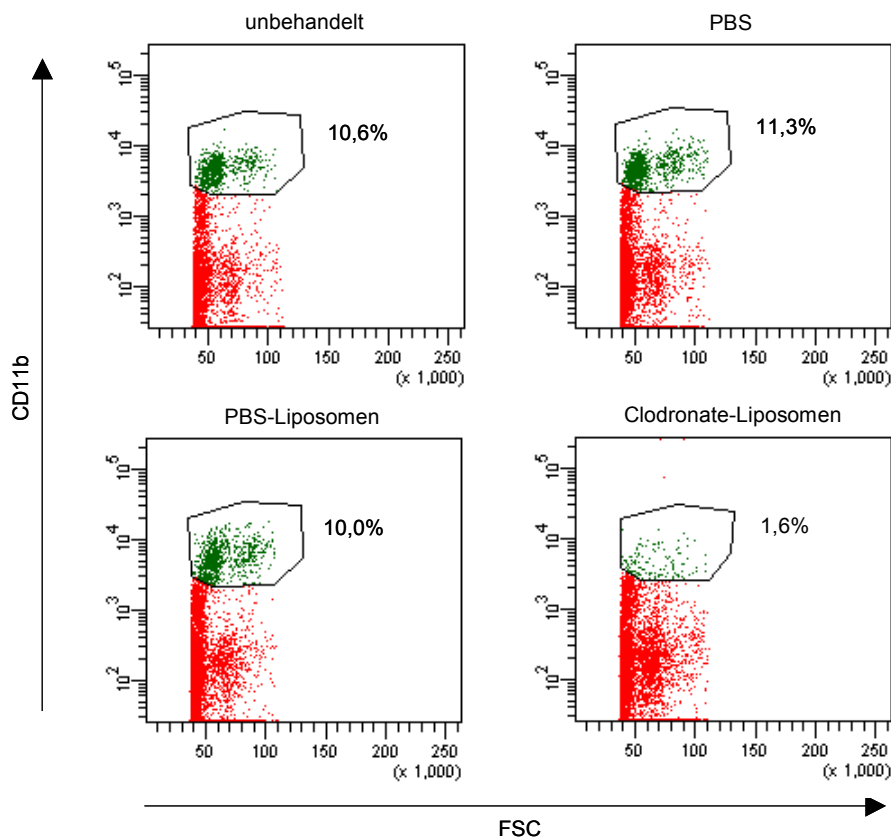
Nach Färbung der PBS-gefüllten Liposomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiD wurde zunächst der Erfolg der Färbung und die Aufnahme der Liposomen durch phagozytisch aktive Zellen (in diesem Fall: Alveolarmakrophagen (AM $\Phi$ ) der Ratte) überprüft. Die durchflusszytometrische Identifizierung der AM $\Phi$  erfolgte dabei durch eine im FITC-Kanal messbare grüne Autofluoreszenz der Zellen. Da die AM $\Phi$  bereits isoliert vorlagen, wurden sie lediglich von eventuell in der Suspension vorliegenden Zelltrümmern durch das Seitwärtsstreulicht (SSC) getrennt (Abb. 2A). Die Messung der mit DiD-Liposomen behandelten AM $\Phi$  konnte aufgrund des Absorptions- und Emissionsspektrums von DiD (tiefrote Fluoreszenz) im APC-Kanal des Durchflusszytometers durchgeführt werden. Es zeigte sich, dass über 75% der AM $\Phi$  im Vergleich zu Kontroll-AM $\Phi$  DiD-positiv waren (Abb. 2B). Dies bestätigte einerseits die Färbung der Liposomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff und andererseits eine weitgehende Aufnahme der DiD-Liposomen durch die Makrophagen. Die durchflusszytometrische Identifizierung der Monozyten im Blut der Maus erfolgte anhand phänotypischer Charakteristika im Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsstreulicht sowie der Expression des Oberflächenmoleküls CD11b. Die Monozyten zeichnen sich aufgrund der im Vergleich zu Granulozyten geringen Menge an Granula durch ein niedriges SSC aus (Abb. 2C). Gleichzeitig exprimieren sie in hohem Maße das Oberflächenmolekül CD11b und können so von Lymphozyten unterschieden werden. Innerhalb der Monozyten wurde anschließend der Anteil DiD-positiver Zellen (wie oben bereits beschrieben) bestimmt. Es konnten 24 h nach der intravenösen Applikation der Liposomen über 80% DiD-positiver Monozyten im Vergleich zu mit PBS-Liposomen behandelten Monozyten nachgewiesen werden (Abb. 2D). Die zwei Gipfel im Histogramm lassen dabei vermuten, dass einige Monozyten besonders aktiv die gefärbten Liposomen aufnahmen.



**Abb. 2. Etablierung der Markierung von Monozyten mit fluoreszenzgefärbten Liposomen.** (A) Durchflusszytometrische Identifizierung von Alveolarmakrophagen der Ratte (Gate P1) anhand von Seitwärtsstreulicht (SSC) und Autofluoreszenz im FITC-Kanal. (B) Überprüfen der Färbung von Liposomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine,4-chlorobenzensulfonat (DiD). Alveolarmakrophagen wurden für 90 min mit DiD-Liposomen inkubiert und die Menge an DiD-positiven Makrophagen im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt. (C) Durchflusszytometrische Identifizierung von zirkulierenden Monozyten im Blut der Maus. Die Monozyten und Lymphozyten mit niedrigem SSC (Gate P1) wurden von den Granulozyten (Gate P4) separiert. Innerhalb der Zellen in P1 wurden die Monozyten durch die Expression von CD11b bestimmt (Gate P2). (D) Markierung von Blutmonozyten der Maus mit DiD-Liposomen 24 h nach intravenöser Applikation im Vergleich zu einem mit PBS-Liposomen behandelten Tier. Dargestellt sind repräsentative Grafiken von mindestens n=2.

#### 4.1.2. Depletion der Monozyten mit Clodronate-Liposomen

In diesem Vorversuch sollte das Ausmaß der Monozyten-Depletion untersucht und eine geeignete Kontrolle bestimmt werden. Die durchflusszytometrische Analyse der mit Clodronate-Liposomen behandelten Mäuse zeigte 18 h nach intravenöser Verabreichung eine deutliche Abnahme der Monozyten-Zellzahl von über 84% (Abb. 3). Die Applikation von PBS bzw. PBS-Liposomen als Kontrolle schien keinen Einfluss auf die Monozyten im Blut zu haben, da weder zwischen diesen beiden Gruppen noch im Vergleich zu einem unbehandelten Tier Unterschiede in der Monozyten-Zellzahl festgestellt werden konnten (Abb. 3). Um die Anzahl der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten, wurde daher in den folgenden Untersuchungen mit Monozyten-Depletion lediglich die Verabreichung von PBS als Kontrolle weitergeführt.



**Abb. 3. Etablierung der Monozyten-Depletion mit Clodronate-Liposomen.** Die Versuchstiere wurden unbehandelt belassen, oder es wurden intravenös 200  $\mu$ l PBS, PBS-Liposomen oder Clodronate-Liposomen appliziert. Der Anteil zirkulierender Monozyten im Blut wurde 18 h nach der Behandlung durchflusszytometrisch bestimmt. (n=1)

## **4.2. Hauptstudien**

### **4.2.1. Untersuchungen zur Kinetik der Monozyten-Migration in die Lunge nach einem stumpfen Thoraxtrauma**

Es ist bekannt, dass das stumpfe Thoraxtrauma im Alveolarraum zu einer erhöhten Anzahl mononukleärer Zellen führt. Allerdings wurde bisher nicht hinreichend untersucht, welchen zeitlichen Abläufen die Einwanderung von Monozyten in die Lunge folgt und inwieweit verschiedene Monozyten-Subpopulationen an den inflammatorischen Vorgängen in der Lunge beteiligt sind. Um dies zu untersuchen, wurden die Monozyten mit fluoreszenzgefärbten Liposomen markiert und auf ihrem Weg in die Lunge verfolgt. In der Lunge selbst wurden eventuelle Reifungsprozesse der Monozyten zu interstitiellen Makrophagen (IM $\Phi$ ) und AM $\Phi$  analysiert. Gleichzeitig wurde die Einteilung der Monozyten in Subpopulationen untersucht und die Menge ausgewählter Zytokine in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BAL-F) zur Beurteilung der nach dem Thoraxtrauma vorherrschenden inflammatorischen Vorgänge in der Lunge bestimmt. Eine Analyse der mRNA-Expression verschiedener Oberflächenmarker in Knochenmarksmonozyten sollte Aufschluss über die Vorgänge im Knochenmark geben.

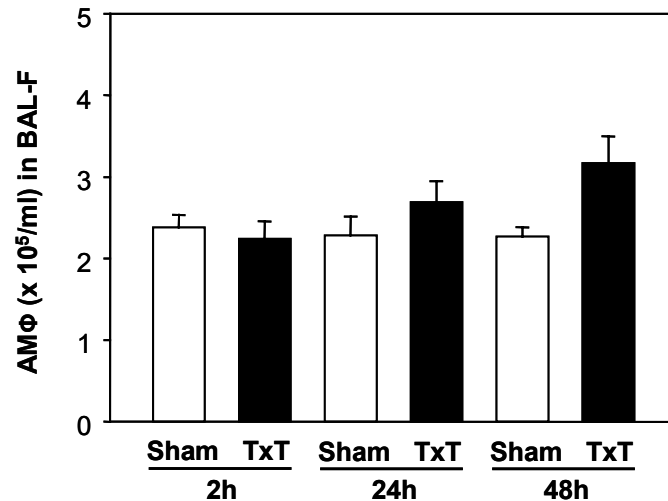
#### **4.2.1.1. Anzahl an Alveolarmakrophagen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit**

Um zu überprüfen, ob in der BAL-F eine erhöhte Anzahl an AM $\Phi$  nach einem Thoraxtrauma nachweisbar ist, wurde deren Anzahl lichtmikroskopisch bestimmt. Es zeigte sich eine 24 h nach Trauma oder Kontrolleingriff beginnende langsame Steigerung der AM $\Phi$ -Zellzahlen in der Traumagruppe, die 48 h nach dem Trauma gegenüber der entsprechenden Kontrolle mit einem p-Wert von 0,06 nur knapp nicht signifikant war (Abb. 4).

#### **4.2.1.2. Protein- und Zytokinkonzentrationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit**

Um die nach einem stumpfen Thoraxtrauma in der Lunge ablaufenden inflammatorischen Vorgänge besser beurteilen zu können, wurden der Proteingehalt der BAL-F als Hinweis auf eine alveolokapilläre Schrankenstörung sowie die Konzentrationen verschiedener Zytokine bestimmt.

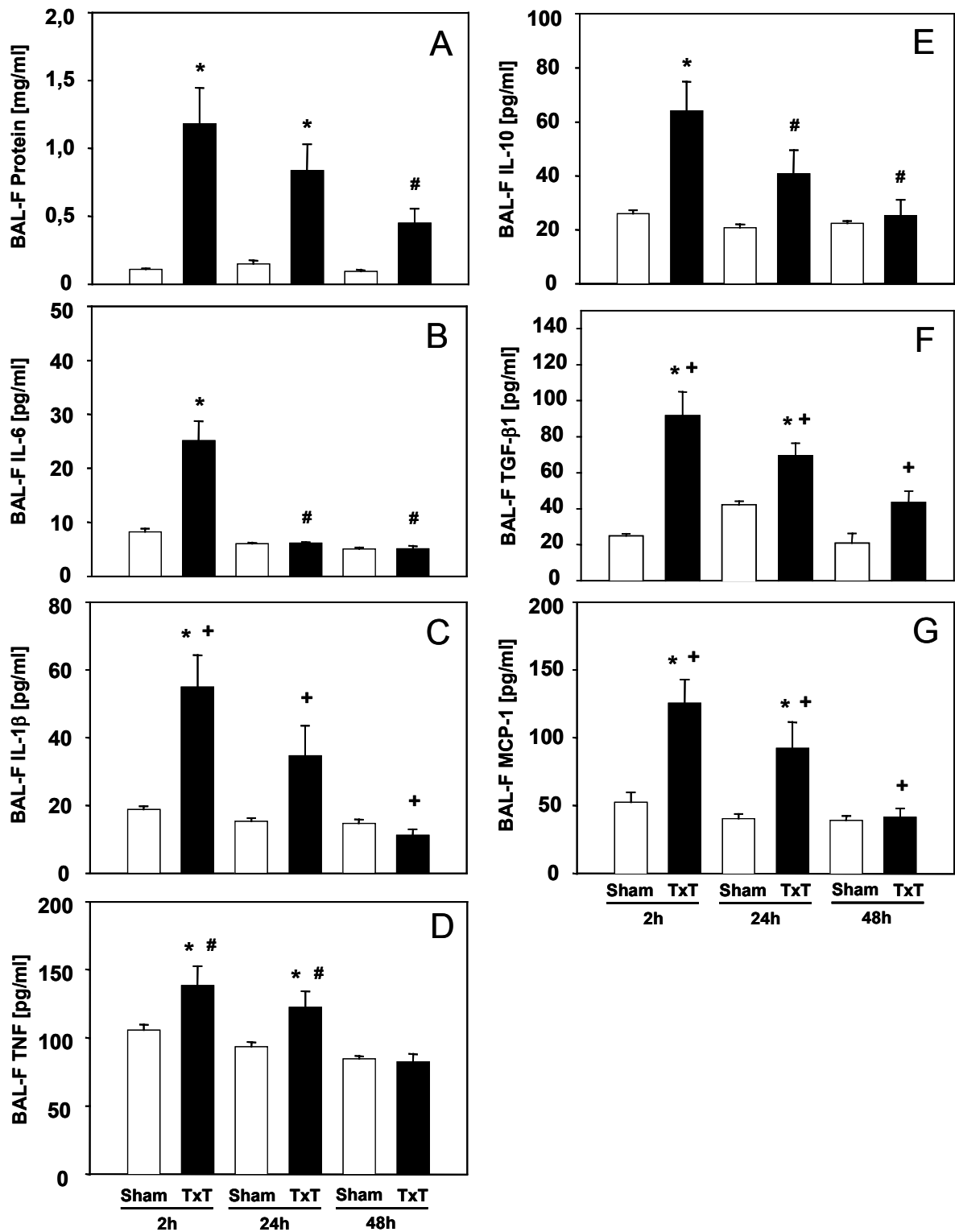
Die Menge an Protein in der BAL-F war 2 h und 24 h nach dem Thoraxtrauma gegenüber den Kontrollgruppen signifikant erhöht (Abb. 5A). 48 h nach dem Trauma konnte kein Unterschied zur entsprechenden Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Konzentrationen



**Abb. 4. Alveolarmakrophagen-Zellzahl (AMΦ) in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BAL-F).** C57BL/6-Mäuse wurden intravenös mit DiD-Liposomen behandelt und 24 h später einem Thoraxtrauma (TxT) bzw. der Kontrollbehandlung (Sham) ausgesetzt. Nach 2 h, 24 h und 48 h wurde die BAL-F gewonnen und die Alveolarmakrophagen-Zellzahl lichtmikroskopisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler, n=10 Tiere pro Gruppe, One Way ANOVA.

von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF stiegen 2 h nach dem Thoraxtrauma im Vergleich zu den Kontrollen signifikant an (Abb. 5B – 5D). Dabei war die IL-6-Konzentration bereits 24 h nach der Lungenschädigung wieder auf Niveau der Kontrollgruppen zurückgesunken (Abb. 5B). Die Konzentration von IL-1 $\beta$  nahm im Zeitverlauf in den Versuchsgruppen mit Thoraxtrauma kontinuierlich bis auf Kontrollniveau ab (Abb. 5C). Lediglich die TNF-Konzentration war 24 h nach dem Trauma noch signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöht und fiel erst nach 48 h auf Kontrollniveau (Abb. 5D). Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich auch bei den Zytokinen IL-10 und TGF- $\beta$ 1 (Abb. 5E und 5F). Die IL-10-Konzentration stieg früh nach dem Trauma signifikant an (Abb. 5E). Nach 24 h war die Konzentration bei Traumatieren zwar noch erhöht, aber gegenüber der Kontrollgruppe nicht mehr wesentlich unterschiedlich. Die Konzentration von TGF- $\beta$ 1 war 2 h und 24 h nach dem Thoraxtrauma im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 5F). Es zeigte sich außerdem in den Traumagruppen eine kontinuierliche Abnahme der Konzentration über die 3 Untersuchungszeitpunkte, die alle signifikant unterschiedlich waren. Die Untersuchung von MCP-1, RANTES und GM-CSF ergaben 2 h und 24 h nach dem Thoraxtrauma ebenfalls signifikant erhöhte Konzentrationen. Nach 48 h waren die Konzentrationen wieder auf Niveau der Kontrolltiere gesunken (Abb. 5G, MCP-1; RANTES und GM-CSF ohne Abb.).





**Abb. 5. Protein- und Zytokinkonzentrationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BAL-F).** C57BL/6-Mäuse wurden intravenös mit DiD-Liposomen behandelt und 24 h später einem Thoraxtrauma (TxT) bzw. der Kontrollbehandlung (Sham) ausgesetzt. Nach 2 h, 24 h und 48 h wurde die BAL-F gewonnen und die Proteinkonzentrationen (A) sowie die Konzentrationen von IL-6 (B), IL-1β (C), TNF (D), IL-10 (E), TGF-β1 (F) und MCP-1 (G) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler, n=9-10 Tiere pro Gruppe, One Way ANOVA, \* p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle, # p<0,05 vs. Thoraxtrauma 2 h, + p<0,05 Traumagruppen aller 3 Zeitpunkte gegeneinander signifikant.

#### 4.2.1.3. Identifizierung gesuchter Zellpopulationen im Durchflusszytometer

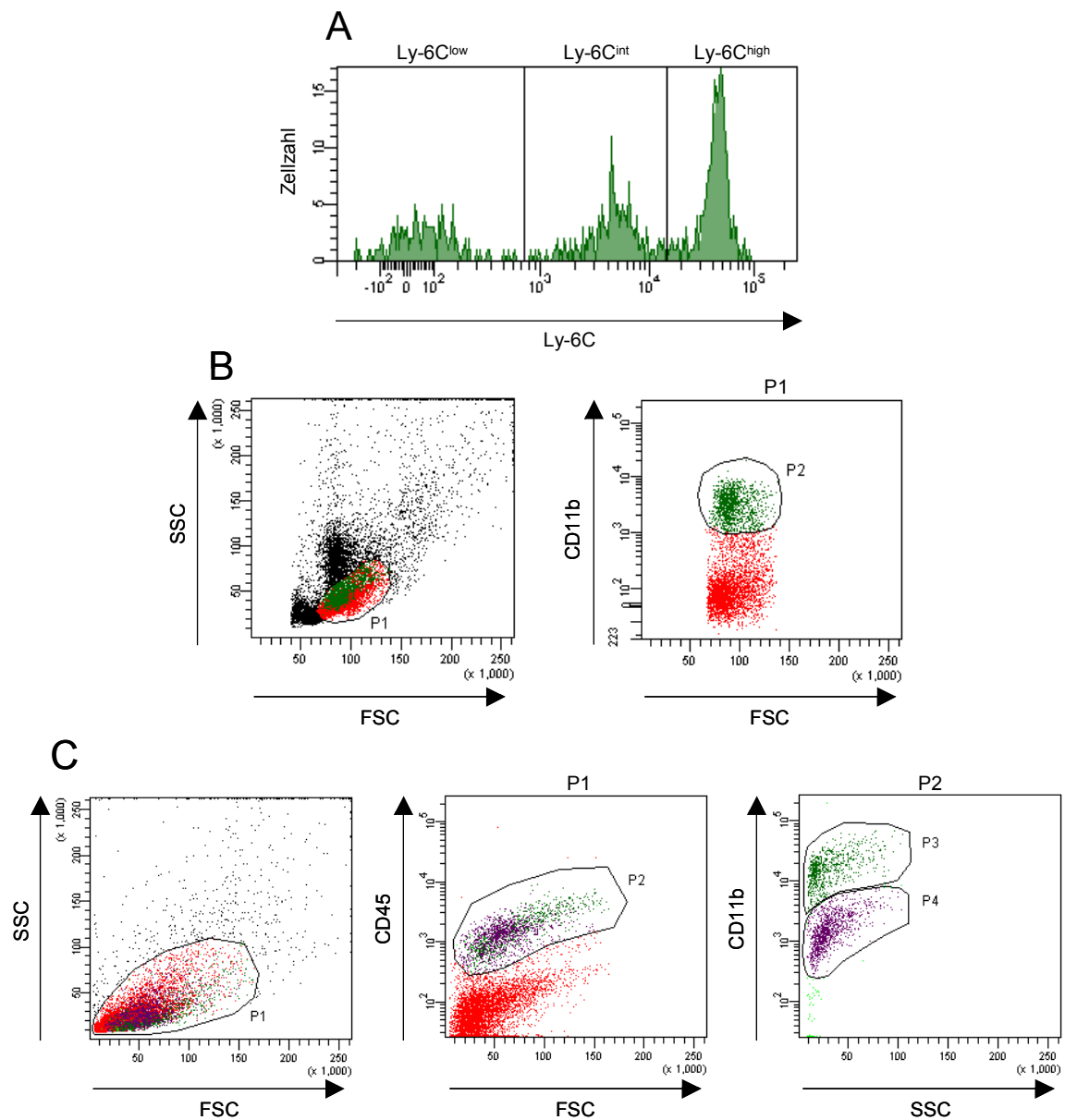
Die isolierten AM $\Phi$  sowie die Monozyten im zirkulierenden Blut der Maus wurden wie im Vorversuch beschrieben identifiziert (Abb. 2A und 2C). Um eine Unterteilung der Monozyten in Subpopulationen zu untersuchen, wurde deren Expression von Ly-6C analysiert. Es zeigten sich drei abgrenzbare Zellpopulationen, die in Monozyten mit hoher (Ly-6C<sup>high</sup>), mittlerer (Ly-6C<sup>int</sup>) und niedriger (Ly-6C<sup>low</sup>) Ly-6C-Expression eingeteilt wurden (Abb. 6A).

Die Monozyten des Knochenmarks wurden, wie die des Blutes, zunächst über den FSC/SSC von granulozytären Zellen separiert und anschließend über die Expression von CD11b identifiziert (Abb. 6B). Die Knochenmarksmonozyten konnten wie die Blutmonozyten in Ly-6C<sup>high</sup>-, Ly-6C<sup>int</sup>- und Ly-6C<sup>low</sup>-Subpopulationen unterschieden werden (ohne Abb.).

Um die Monozyten und IM $\Phi$  im Lungengewebe zu identifizieren, wurde im FSC/SSC eine Population eingegrenzt, in der die gesuchten Zellen erwartet wurden (Abb. 6C). Durch die Färbung mit einem anti-CD45 Antikörper wurden anschließend in dieser Population alle leukozytären Zellen dargestellt. Innerhalb der Leukozytenpopulation konnten wiederum durch die Expression von CD11b die Monozyten und Granulozyten mit hoher Expression des Oberflächenmarkers (CD11b<sup>high</sup>) von den IM $\Phi$  als Zellen mit niedrigerer CD11b-Expression (CD11b<sup>low</sup>) unterschieden werden. Eine Abgrenzung der Granulozyten von den Monozyten war durch diese Art der Auswertung nicht möglich.

Der Anteil an mit DiD-Liposomen markierten Zellen wurde bei allen untersuchten Zellpopulationen (Monozyten des Blutes und Knochenmarks, IM $\Phi$  sowie AM $\Phi$ ), wie im Vorversuch etabliert, durch Messung der DiD-Fluoreszenz im APC-Kanal im Vergleich zu einem nicht mit DiD-Liposomen behandelten Tier bestimmt.

Konnten einzelne Zellpopulationen nicht wie beschriebenen eindeutig identifiziert werden, führte dies zum Ausschluss aus der Auswertung. Dies war der Fall, wenn sich die Zellen des Blutes und des Knochenmarkes bereits im FSC/SSC so darstellten, dass ein Gaten von Populationen nicht möglich war, oder das Blut untypisch aussah (z. B. Fehlen einzelner Zellpopulationen). Außerdem wurden Tiere nicht in die Auswertung integriert, deren CD45-Färbung keine eindeutige Identifikation der Leukozyten-Population ermöglichte. Insgesamt wurden so maximal n=2 Tiere aus der Auswertung ausgeschlossen.

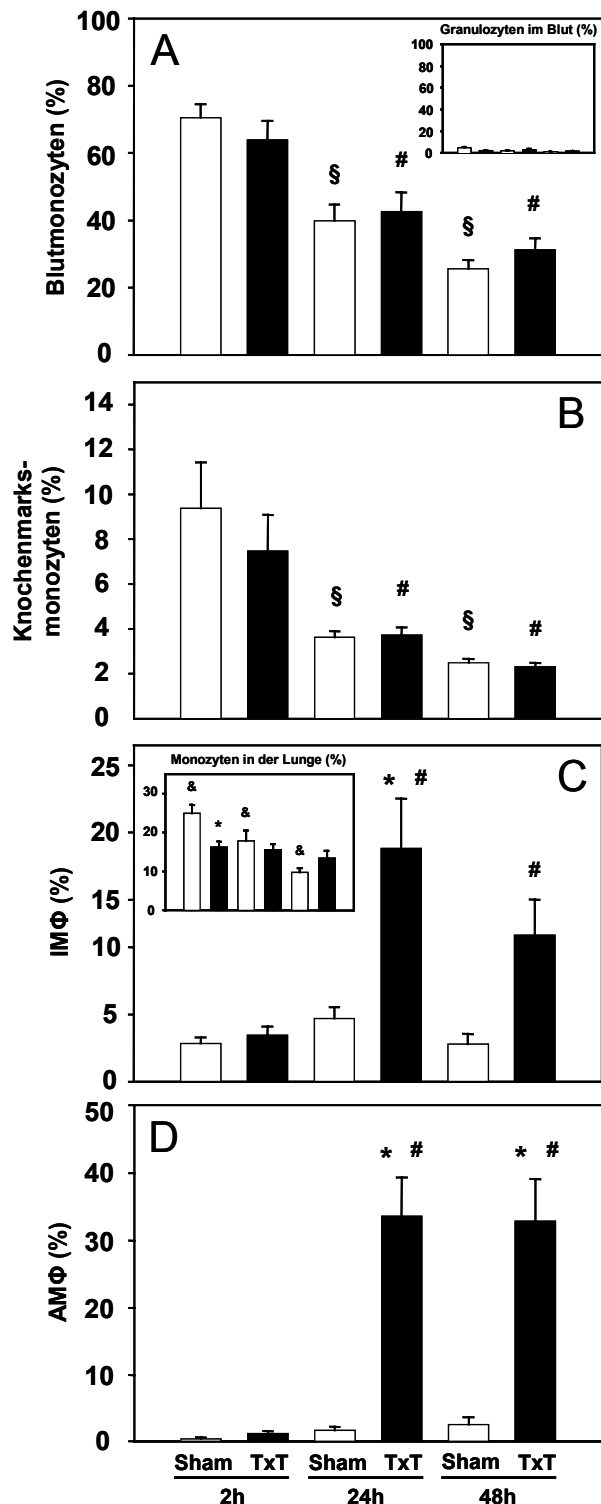


**Abb. 6. Durchflusszytometrische Identifizierung von Monozyten-Subpopulationen, Knochenmarksmonozyten und interstitiellen Makrophagen der Lunge.** (A) Unterteilung von Monozyten in Subpopulationen anhand der unterschiedlichen Expression von Ly-6C in Ly-6C<sup>high</sup> (hohe Expression), Ly-6C<sup>int</sup> (mittlere Expression) und Ly-6C<sup>low</sup> (niedrige Expression). (B) Identifizierung von Knochenmarksmonozyten durch niedriges Seitwärtsstreichlicht (SSC, Gate P1) und hohe Expression von CD11b (Gate P2). (C) Interstitielle Makrophagen sowie Monozyten und Granulozyten in der Lunge wurden zunächst im FSC (Vorwärtsstreichlicht) und SSC eingegrenzt (Gate P1) und in dieser Population die Leukozyten durch Färbung mit einem Antikörper gegen CD45 (Gate P2) bestimmt. Innerhalb der Leukozyten erfolgte die Unterteilung in Monozyten und Granulozyten mit hoher CD11b-Expression (Gate P3) und interstitielle Makrophagen mit niedriger CD11b-Expression (Gate P4).

#### 4.2.1.4. Migrations- und Umwandlungsprozesse der Monozyten

Um das Migrationsverhalten der Monozyten und deren mögliche Reifung in IM $\Phi$  und AM $\Phi$  unter Kontroll- und Traumabedingungen zu untersuchen, wurden die DiD-positive Zellen im Blut und im Knochenmark sowie in der Lunge und der BAL-F wie oben beschrieben identifiziert und analysiert. Außerdem wurde der Anteil von Monozyten und Granulozyten im zirkulierenden Blut sowie von Monozyten im Knochenmark bestimmt.

Die Analyse des Blutes der Versuchstiere zeigte zu allen Untersuchungszeitpunkten weder in den Gruppen mit Thoraxtrauma noch in den Kontrollgruppen eine Veränderung im Anteil der Monozyten, der zwischen 6,1% und 8,0% lag. Der prozentuale Anteil an Granulozyten war hingegen 2 h nach dem Trauma signifikant um 125% gegenüber der Kontrolle erhöht (ohne Abb.). Durch die intravenöse Gabe DiD-gefärbter Liposomen konnten die Monozyten im Blut markiert werden (Abb. 7A). Dabei nahm der Anteil DiD-positiver Zellen 24 h nach Trauma oder Kontrolleingriff im Vergleich zum 2 h-Zeitpunkt signifikant ab. Nach 48 h konnte eine weitere Reduktion des Anteils der DiD-positiven



**Abb. 7. Anteil DiD-positiver Zellpopulationen.** C57BL/6-Mäuse wurden intravenös mit DiD-Liposomen behandelt und 24 h später einem Thoraxtrauma (TxT) bzw. der Kontrollbehandlung (Sham) ausgesetzt. Nach 2 h, 24 h und 48 h wurde die Menge DiD-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Monozyten und Granulozyten (kleines Fenster) im Blut. (B) Knochenmarksmonozyten. (C) Monozyten (kleines Fenster) und interstitiellen Makrophagen (IM $\Phi$ ) in der Lunge. (D) Alveolarmakrophagen (AM $\Phi$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n=7-10 Tiere pro Gruppe, One Way ANOVA, \* p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle, # p<0,05 vs. Thoraxtrauma 2 h, § p<0,05 vs. Kontrolle 2 h, & p<0,05 Kontrollgruppen aller 3 Zeitpunkte gegeneinander signifikant.

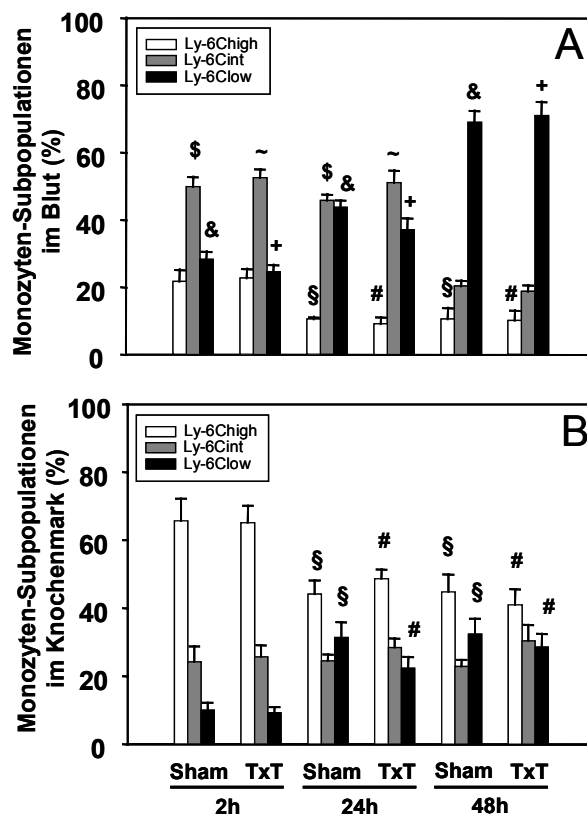
Monozyten festgestellt werden, die allerdings gegenüber dem 24 h-Zeitpunkt keine Signifikanz erreichte. Die Analyse der Granulozyten (Abb. 7A, kleines Fenster) und Lymphozyten (ohne Abb.) im Blut ergab, dass diese nicht oder nur zu einem sehr geringen Teil mit den DiD-Liposomen markiert wurden. So waren im Mittel 2,4% der Granulozyten und 1,7% der Lymphozyten DiD-positiv (ohne Abb.). Die Gesamtmenge der Knochenmarksmonozyten blieb ebenfalls in den Trauma- und Kontrollgruppen über alle Untersuchungszeitpunkte unverändert (ohne Abb.). Auch im Knochenmark konnten DiD-markierte Monozyten festgestellt werden, deren Anteil nach 24 h und 48 h signifikant im Vergleich zum frühen Zeitpunkt abnahm (Abb. 7B). In der Lunge zeigte die Analyse der DiD-markierten Monozyten deren stetige signifikante Abnahme über alle drei Untersuchungszeitpunkte in den Kontrollgruppen (Abb. 7C, kleines Fenster). 2 h nach dem Thoraxtrauma war der Anteil der Monozyten signifikant geringer als in der Kontrolle und blieb im zeitlichen Verlauf in den Traumagruppen annähernd unverändert. Bei der Analyse der IM $\Phi$  und AM $\Phi$  konnten ebenfalls DiD-positive Zellen nachgewiesen werden. Der Anteil DiD-markierter IM $\Phi$  stieg 24 h und 48 h nach dem Trauma im Vergleich zum 2 h-Zeitpunkt signifikant an (Abb. 7C). Gleichzeitig war der prozentuale Anteil der IM $\Phi$  24 h und 48 h nach dem Thoraxtrauma gegenüber der Kontrolle erhöht, wenn auch nur bei 24 h statistische Signifikanz erreicht wurde. Die Untersuchung der DiD-positiven AM $\Phi$  ergab 24 h und 48 h nach der Lungenkontusion signifikant erhöhte Werte sowohl im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen als auch gegenüber der Traumagruppe zum 2 h-Zeitpunkt (Abb. 7D).

#### 4.2.1.5. Monozyten-Subpopulationen

Da die Monozyten des Blutes und des Knochenmarks durchflusszytometrisch in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden konnten, wurde anschließend eine mögliche Veränderung in der Zusammensetzung der Subpopulationen in Bezug auf das Thoraxtrauma untersucht.

Diese Veränderungen konnten bei der Analyse der DiD-positiven Monozyten sowohl im Blut (Abb. 8A) als auch im Knochenmark (Abb. 8B) im zeitlichen Verlauf nachgewiesen werden. So waren im Blut 2 h nach Trauma- oder Kontrollbehandlung hauptsächlich Ly-6C<sup>int</sup>-Monozyten vorhanden, deren Anteil auch nach 24 h unverändert blieb und sich erst nach 48 h signifikant reduzierte (Abb. 8A). Der Anteil an Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten war zum 2 h-Zeitpunkt deutlich geringer als der der Ly-6C<sup>int</sup>-Subpopulation und sank 24 h nach Trauma- oder Kontrolleingriff weiter ab. Im Gegensatz dazu nahm der Anteil an Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten zu jedem Untersuchungszeitpunkt signifikant zu, so dass diese Monozyten 48 h nach Trauma- oder Kontrollbehandlung die vorherrschende Subpopulation darstellten. Im Knochenmark waren 2 h nach dem Thoraxtrauma oder der

Kontrollbehandlung hauptsächlich Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten vorhanden (Abb. 8B). Ihr Anteil nahm nach 24 h signifikant ab und blieb bis zum 48 h-Zeitpunkt unverändert. Im Gegensatz dazu waren die Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten 2 h nach Trauma- oder Kontrolleingriff nur spärlich vorhanden, jedoch nahm ihr Anteil zum 24 h-Zeitpunkt signifikant zu und veränderte sich anschließend nicht mehr. Der Anteil an Ly-6C<sup>int</sup>-Monozyten zeigte sich über alle Untersuchungszeitpunkte annähernd unverändert und war 24 h und 48 h nach dem Thoraxtrauma oder der Kontrollbehandlung auf Niveau der anderen beiden Monozyten-Subpopulationen. Ein Unterschied zwischen Thoraxtrauma- und Kontrollgruppen konnte nicht festgestellt werden. Bei der Untersuchung der DiD-positiven Monozyten in der Lunge zeigten sich keine eindeutig unterscheidbaren Subpopulationen wie im Blut oder Knochenmark. Es konnten zwar durchaus Zellen mit hoher, mittlerer und niedriger Expression des Ly-6C identifiziert werden, jedoch waren die Übergänge zwischen den Populationen fließend. Zur Gewährleistung einer objektiven Auswertung wurde daher keine Einteilung in Subpopulationen vorgenommen.



**Abb. 8. Einteilung der DiD-positiven Monozyten in Subpopulationen.** C57BL/6-Mäuse wurden intravenös mit DiD-Liposomen behandelt und 24 h später einem Thoraxtrauma (TxT) bzw. der Kontrollbehandlung (Sham) ausgesetzt. Nach 2 h, 24 h und 48 h wurde innerhalb der DiD-positiven Monozyten der prozentuale Anteil der einzelnen Subpopulationen anhand der Ly-6C-Expression bestimmt. (A) Monozyten-Subpopulationen im peripheren Blut. (B) Monozyten-Subpopulationen im Knochenmark. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n=7-10$  Tiere pro Gruppe, One Way ANOVA, \*  $p<0,05$  vs. entsprechende Kontrolle, §  $p<0,05$  vs. Kontrolle 2 h, #  $p<0,05$  vs. Thoraxtrauma 2 h, \$  $p<0,05$  vs. Kontrolle 48 h, ~  $p<0,05$  vs. Thoraxtrauma 48 h, &  $p<0,05$  Kontrollgruppen aller 3 Zeitpunkte gegeneinander signifikant, +  $p<0,05$  Traumagruppen aller 3 Zeitpunkte gegeneinander signifikant.

#### **4.2.1.6. mRNA-Expression von Oberflächenmarkern in Monozyten des Knochenmarks**

Um den Einfluss des Thoraxtraumas auf den Monozyten-Pool im Knochenmark weiter zu untersuchen wurde die Expression von CCR2, CX<sub>3</sub>CR1, CD62L, CD11b und TGF- $\beta$ 1 in Knochenmarksmonozyten auf mRNA-Ebene untersucht. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit Thoraxtrauma und den entsprechenden Kontrollgruppen zu allen Untersuchungszeitpunkten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

#### **4.2.2. Untersuchungen zum Beitrag der Monozyten an der posttraumatischen Entzündungsreaktion nach einem stumpfen Thoraxtrauma**

Die gesteigerte Einwanderung von Monozyten in die Lunge und die dort durch das Thoraxtrauma vorangetriebenen postulierten Umwandlungsprozesse der Monozyten in IM $\Phi$  und AM $\Phi$  lassen auf eine wichtige Rolle im inflammatorischen Geschehen nach einer Lungenkontusion schließen. In dieser Studie sollte daher untersucht werden, inwieweit diese Prozesse die posttraumatische Entzündungsreaktion positiv oder negativ beeinflussen. Dafür wurden die Monozyten des zirkulierenden Blutes durch intravenöse Applikation von Clodronate-Liposomen depletiert. Die Auswirkungen der Verabreichung des Clodronates wurden durchflusszytometrisch auf Granulozyten und den verbliebenen Monozyten des Blutes, den Knochenmarksmonozyten sowie den mononukleären Zellen des Lungenhomogenisates untersucht. Die Analyse der Entzündungsantwort erfolgte durch Bestimmung von Zytokinkonzentrationen lokal in der bronchoalveolären Lavage und im Lungenhomogenisat sowie systemisch im Plasma und den Kulturüberständen von Splenozyten und Milzmakrophagen.

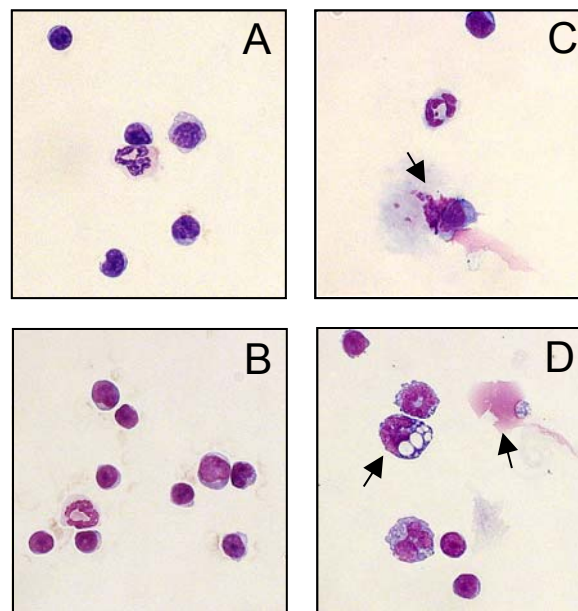
##### **4.2.2.1. Nachweis der Monozyten-Depletion**

Die Menge an Monozyten im Blut wurde 42 h nach intravenöser Gabe der Clodronate-Liposomen und 24 h nach Durchführen des Thoraxtrauma bzw. des Kontrolleingriffes durchflusszytometrisch wie im Vorversuch etabliert bestimmt. Es konnte bei den traumatisierten Versuchstieren eine Reduktion der Monozytenzahlen um 55% sowie bei den Kontrolltieren eine Reduktion um 60% nachgewiesen werden (Tabelle 3). Die Analyse der Zytospinpräparate des Blutes zeigte bei mit PBS behandelten Versuchstieren vollkommen intakte Mono-, Granulo- und Lymphozyten (Abb. 9A und 9B). Bei den mit Clodronate-Liposomen behandelten Tieren waren die Monozyten geschädigt oder völlig zerstört (durch Pfeile in Abb. 9C und 9D markiert). Die Granulozyten und Lymphozyten

erschieden hingegen unbeeinflusst. Allein durch das Thoraxtrauma hervorgerufene Änderungen in den Zellstrukturen wurden nicht beobachtet.

**Tabelle 3. Anteil an Monozyten im peripheren Blut nach Monozyten-Depletion.** C57BL/6-Mäuse wurden mit Clodronate-Liposomen (CL) bzw. PBS behandelt und 18 h später einem stumpfen Thoraxtrauma (TxT) oder dem Kontrolleingriff (Sham) ausgesetzt. 24 h danach wurde der Anteil an Monozyten im Blut durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte in Prozent (%) von n=9-10 Tieren pro Gruppe. One Way ANOVA, § p<0,05 vs. Kontrolle PBS, # p<0,05 vs. Thoraxtrauma PBS.

	PBS	CL	Reduktion um (%)
Sham	5,9	2,7 §	54,8
TxT	7,0	2,8 #	60,0



**Abb. 9. Mikroskopischer Nachweis der Monozyten-Depletion.** C57BL/6-Mäuse wurden mit PBS bzw. Clodronate-Liposomen behandelt und 18 h später einem stumpfen Thoraxtrauma oder dem Kontrolleingriff ausgesetzt. 24 h danach wurden Zytospinpräparate des Blutes angefertigt und mit dem Hemacolor Schnellfärbe-Set gefärbt. (A) Kontrolle PBS-Behandlung. (B) Thoraxtrauma PBS-Behandlung. (C) Kontrolle Clodronate-Behandlung. (D) Thoraxtrauma Clodronate-Behandlung. Pfeile stellen apoptotische bzw. zerstörte Monozyten dar.

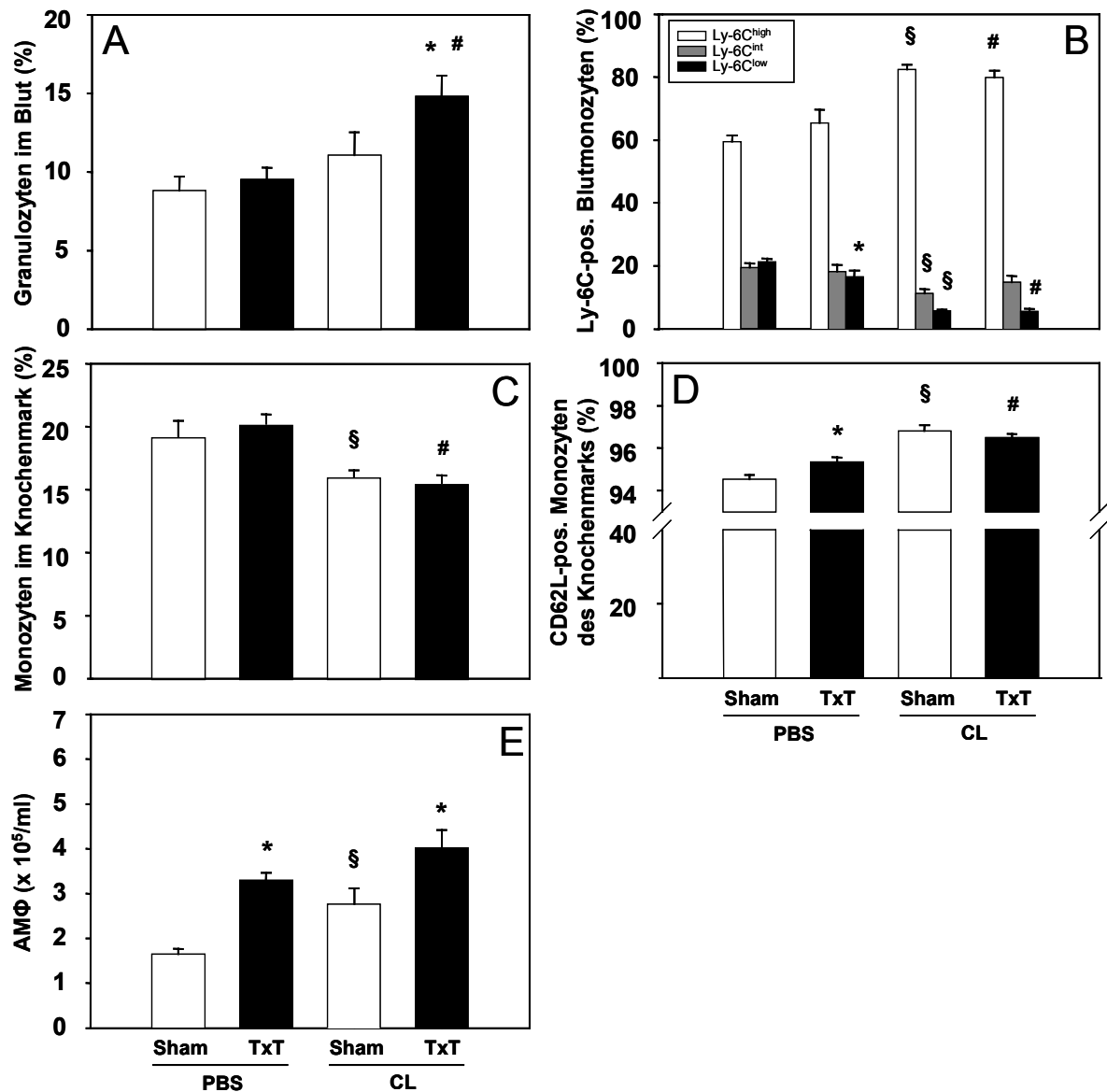


#### 4.2.2.2. Auswirkungen der Monozyten-Depletion auf Zellen des Blutes, Knochenmarks und der Lunge

Um zu untersuchen, welche Effekte die intravenöse Applikation der Clodronate-Liposomen neben der Depletion der Blutmonozyten auf andere Zellpopulationen hat, wurden die Anteile von Granulozyten, Knochenmarksmonozyten und AM $\Phi$  bestimmt. Außerdem erfolgte eine Analyse des Oberflächenmarkers L-Selektin (CD62L) auf den verbliebenen bzw. neu eingewanderten Monozyten des Blutes, auf Knochenmarksmonozyten und den mononukleären Zellen der Lunge.

Der Anteil an Granulozyten im Blut war 24 h nach Applikation des Thoraxtraumas bei PBS-behandelten Tieren in der Traumagruppe nicht erhöht (Abb. 10A). Jedoch stieg der Anteil bei traumatisierten Tieren mit vorheriger Depletion der Monozyten signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Traumagruppe PBS-behandelter Tiere an. Die Analyse der verbliebenen bzw. bereits neu eingewanderten Monozyten des Blutes auf Einteilung in Subpopulationen zeigte nach der Monozyten-Depletion signifikant mehr Ly-6C<sup>high</sup>- und weniger Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten im Vergleich zu PBS-behandelten Tieren (Abb. 10B). Der Anteil der Ly-6C<sup>int</sup>-Monozyten war nur bei depletierten Kontrolltieren signifikant niedriger als in der entsprechenden PBS-Gruppe. Innerhalb der nicht-depletieren Versuchstiere zeigten sich durch das Thoraxtrauma bis auf eine Reduktion des Anteils der Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten keine Veränderungen in den Anteilen der Subpopulationen (Abb. 10B). Der Anteil an Monozyten im Knochenmark wurde durch die Applikation von Clodronate-Liposomen sowohl in der Kontroll- als auch in der Traumagruppe leicht, aber dennoch signifikant im Vergleich zu PBS-behandelten Tieren reduziert (Abb. 10C). Eine Veränderung in der Zusammensetzung der Monozyten-Subpopulationen konnte nicht festgestellt werden (ohne Abb.). Die Expression von CD62L stieg bereits in den mit PBS behandelten Versuchstieren in der Traumagruppe signifikant im Vergleich zur Kontrolle an (Abb. 10D). Durch die Depletion wurde die CD62L-Expression weiter erhöht und war in der Kontroll- und der Traumagruppe gegenüber den nicht depletierten Tieren signifikant gestiegen. Diese Erhöhung der Expression von CD62L in depletierten Mäusen wurde außerdem auf den verbliebenen Monozyten des peripheren Blutes und den als CD11b<sup>high</sup> identifizierten Zellen der Lunge (Monozyten und Granulozyten) nachgewiesen. Gleichzeitig zeigte sich auf den IM $\Phi$  (CD11b<sup>low</sup>) eine tendenzielle, wenn auch nicht signifikante Reduktion der CD62L-Expression (ohne Abb.). Die Anzahl an AM $\Phi$  in der BAL-F stieg bei depletierten und nicht depletierten Tieren mit Thoraxtrauma signifikant gegenüber den entsprechenden Kontrollen an (Abb. 10E). Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Traumagruppen konnte trotz leicht erhöhter Werte der AM $\Phi$ -Zahl bei depletierten Mäusen nicht festgestellt werden.

Außerdem zeigte sich eine erhöhte Anzahl an AM $\Phi$  in der Kontrollgruppe depletierter Tiere im Vergleich zur PBS-Gruppe.



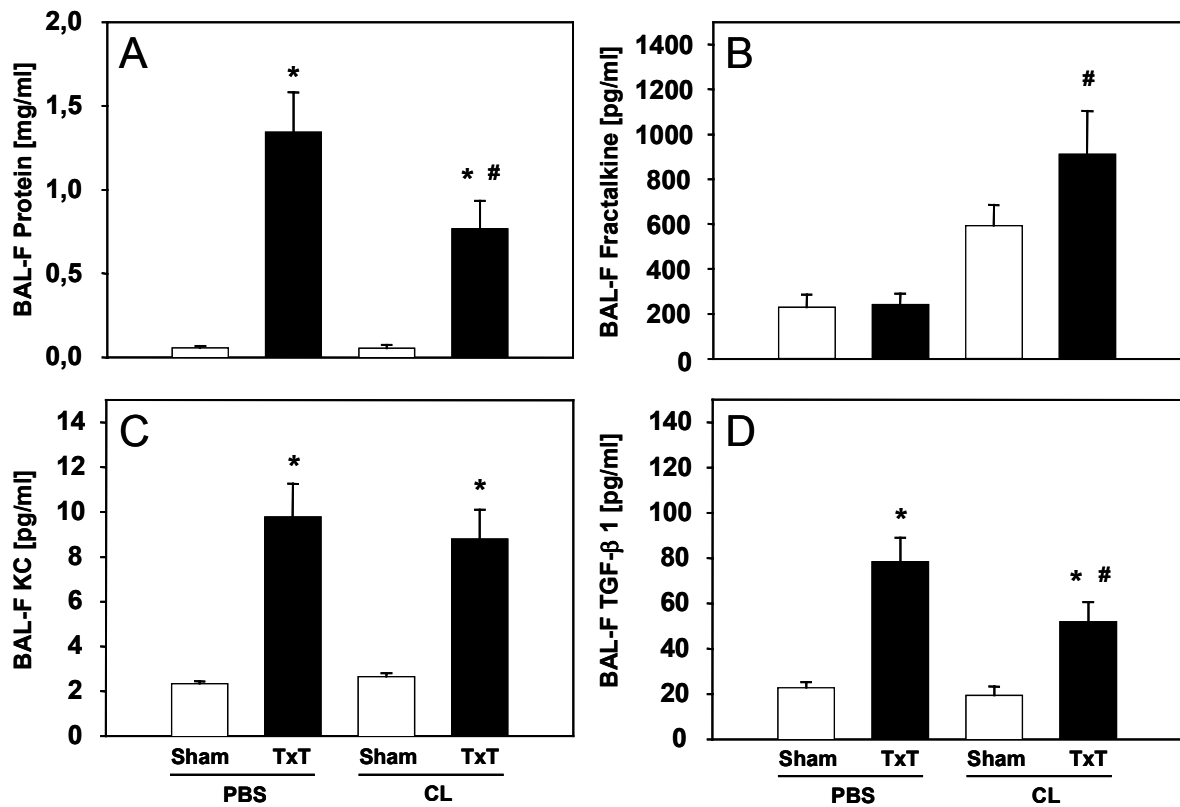
**Abb. 10. Auswirkungen der Monozyten-Depletion auf Zellen des Blutes, Knochenmarks und der Lunge.** C57BL/6-Mäuse wurden mit Clodronate-Liposomen (CL) bzw. PBS behandelt und 18 h später einem stumpfen Thoraxtrauma (TxT) oder dem Kontrolleingriff (Sham) ausgesetzt. Nach weiteren 24 h wurde der Anteil an Granulozyten (A) und die Zusammensetzung der Monozyten-Subpopulationen im Blut (B) sowie der Anteil an Knochenmarksmonozyten (C) und deren Expression von CD62L (D) durchflusszytometrisch bestimmt. Die Menge an Alveolarmakrophagen (AM $\Phi$ ) wurde durch Zellzählung in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit ermittelt (E). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n=8-10 Tiere pro Gruppe, One Way ANOVA, \* p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle, § p<0,05 vs. Kontrolle PBS, # p<0,05 vs. Thoraxtrauma PBS.

#### 4.2.2.3. Zytokinkonzentrationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit und im Lungenhomogenisat

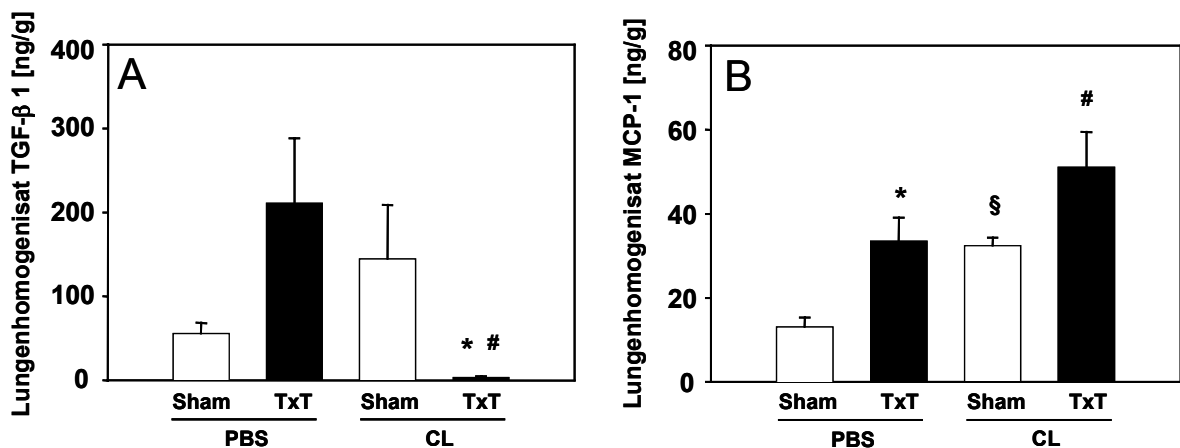
Zur Beurteilung der lokal in der Lunge vorherrschenden inflammatorischen Vorgänge nach Monozyten-Depletion und Thoraxtrauma wurden die Proteinkonzentrationen und Konzentrationen verschiedener Zytokine in der BAL-F und im Lungenhomogenisat bestimmt.

Die Proteinkonzentration in der BAL-F war 42 h nach Monozyten-Depletion und 24 h nach Applikation des Thoraxtraumas bei PBS-behandelten Versuchstieren signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Abb. 11A). Bei depletierten und traumatisierten Tieren stieg die Proteinkonzentration ebenfalls gegenüber der Kontrolle signifikant an, war jedoch im Vergleich zu traumatisierten, PBS-behandelten Tieren signifikant reduziert. Die Konzentration von Fractalkine zeigte sich bei depletierten Traumatieren signifikant gegenüber nicht depletierten Traumatieren erhöht (Abb. 11B). Die leichte Steigerung der Fractalkine-Konzentration bei Clodronate-Liposomen behandelten Kontrolltieren erreichte im Vergleich zur entsprechenden PBS-Gruppe keine Signifikanz. Die Konzentrationen von KC und TGF- $\beta$ 1 waren sowohl bei depletierten als auch bei nicht depletierten Mäusen mit Trauma signifikant gegenüber den Kontrollen angestiegen (Abb. 11C und 11D). Allerdings wurde bei depletierten Traumatieren signifikant weniger TGF- $\beta$ 1 als bei nicht depletierten, traumatisierten Tieren in die BAL-F abgegeben. Ein solcher Unterschied konnte bei den Konzentrationen von KC nicht festgestellt werden.

Die Untersuchung der TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen im Lungenhomogenisat nicht depletierter Tiere zeigte eine Konzentrationssteigerung in der Traumagruppe, die allerdings durch eine ausgeprägte Streuung der Messwerte gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant wurde (Abb. 12A). Gleichzeitig war die TGF- $\beta$ 1-Konzentration in der Traumagruppe depletierter Versuchstiere gegenüber der entsprechenden Kontrolle und der Traumagruppe PBS-behandelter Tiere signifikant erniedrigt. Die Konzentration von MCP-1 stieg bei nicht depletierten Versuchstieren durch das Thoraxtrauma signifikant an (Abb. 12B). Die Monozyten-Depletion verursachte bereits bei Kontrolltieren eine im Vergleich zur entsprechenden PBS-behandelten Gruppe signifikante Erhöhung der MCP-1-Konzentration, die sich auf dem Niveau traumatisierter, nicht depletierter Tiere befand. Durch das Thoraxtrauma stieg die Konzentration von MCP-1 bei depletierten Mäusen weiter an, so dass sie im Vergleich zu PBS-behandelten Traumatieren signifikant erhöht war, jedoch gegenüber depletierten Kontrolltieren keine Signifikanz erreichte ( $p$ -Wert: 0,06).



**Abb. 11. Protein- und Zytokinkonzentrationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BAL-F).** C57BL/6-Mäuse wurden mit Clodronate-Liposomen (CL) bzw. PBS behandelt und 18 h später einem stumpfen Thoraxtrauma (TxT) oder dem Kontrolleingriff (Sham) ausgesetzt. Nach weiteren 24 h wurde die BAL-F gewonnen und die Proteinkonzentrationen (A) sowie die Konzentrationen von Fractalkine (B), KC (C) und TGF-β1 (D) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler, n=6-10 Tiere pro Gruppe, One Way ANOVA, \* p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle, # p<0,05 vs. Thoraxtrauma PBS.

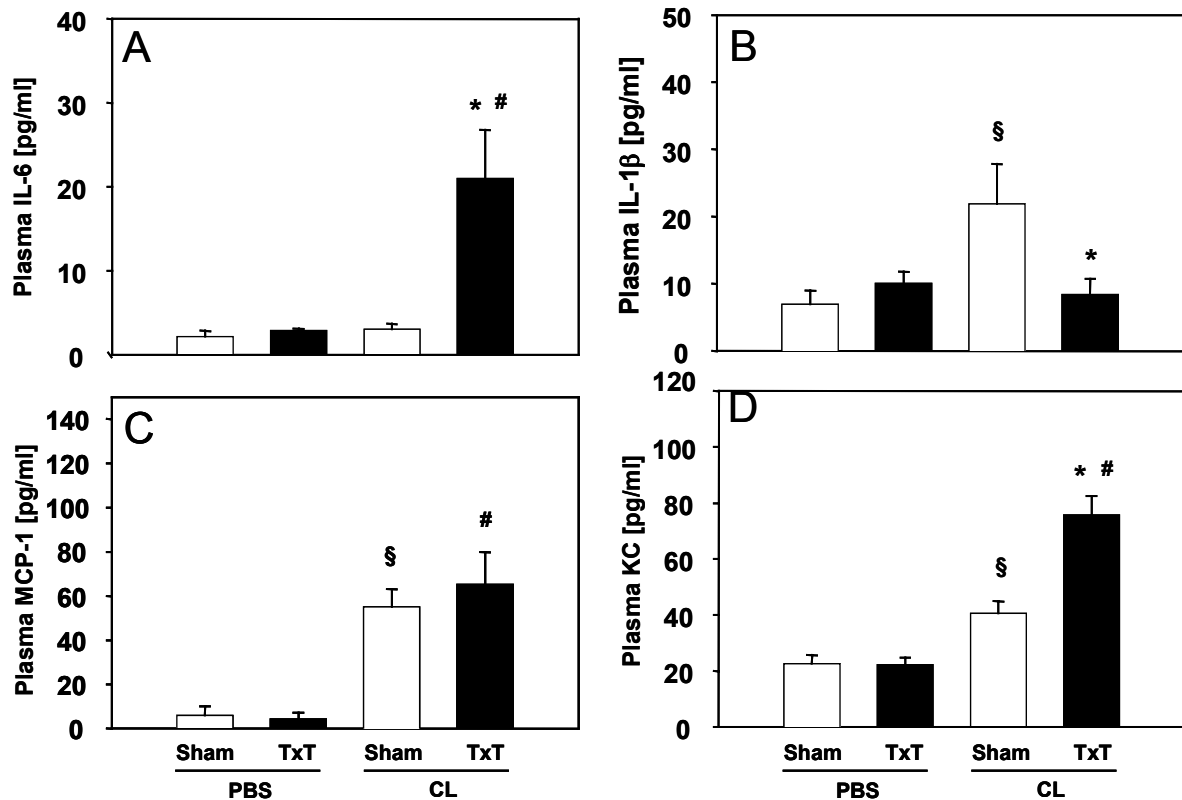


**Abb. 12. Zytokinkonzentrationen im Lungenhomogenisat.** C57BL/6-Mäuse wurden mit Clodronate-Liposomen (CL) bzw. PBS behandelt und 18 h später einem stumpfen Thoraxtrauma (TxT) oder dem Kontrolleingriff (Sham) ausgesetzt. Nach weiteren 24 h wurde die Lunge zur Herstellung von Lungenhomogenisat entnommen und die Konzentrationen von TGF-β1 (A) und MCP-1 (B) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler von auf die Proteinmenge des Lungenhomogenisates normalisierten Werten, n=8-10 Tiere pro Gruppe, One Way ANOVA, \* p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle, § p<0,05 vs. Kontrolle PBS, # p<0,05 vs. Thoraxtrauma PBS.

#### **4.2.2.4. Zytokinkonzentrationen im Plasma und den Kulturüberständen von Splenozyten und Milzmakrophagen**

Zur Untersuchung der durch Monozyten-Depletion und Thoraxtrauma hervorgerufenen systemischen Entzündungsreaktion wurden die Konzentrationen verschiedener Zytokine im Plasma sowie den Kulturüberständen von Milzmakrophagen und Splenozyten analysiert.

Die Konzentration von IL-6 zeigte sich in nicht depletierten Tieren 24 h nach Applikation des Thoraxtraumas im Vergleich zur Kontrolle unverändert (Abb. 13A). Durch die Depletion der Monozyten stieg die IL-6-Konzentration in der Traumagruppe jedoch signifikant gegenüber depletierten Kontrolltieren und nicht depletierten Traumatieren an. Auch die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen waren in nicht depletierten Tieren mit und ohne Thoraxtrauma unverändert (Abb. 13B). Mit der Depletion stieg IL-1 $\beta$  in der Kontrollgruppe depletierter Tiere signifikant gegenüber der Kontrollgruppe nicht depletierter Tiere an. Die IL-1 $\beta$ -Konzentration depletierter Traumatiere war im Vergleich zu nicht depletierten Traumatieren nicht erhöht und zeigte sich gegenüber depletierten Kontrolltieren signifikant erniedrigt. Die Konzentrationen von MCP-1 waren ebenfalls bei depletierten Versuchstieren erhöht, jedoch zeigten sich keine Unterschiede zwischen Kontroll- und traumatisierten Tieren (Abb. 13C). Die Analyse von KC ergab signifikant höhere Konzentrationen sowohl in der Trauma- als auch in der Kontrollgruppe depletierter Versuchstiere (Abb. 13D). Verglichen mit depletierten Kontrolltieren konnte eine zusätzliche signifikante Steigerung der KC-Konzentration bei depletierten Traumatieren nachgewiesen werden.



**Abb. 13. Zytokinkonzentrationen im Plasma.** C57BL/6-Mäuse wurden mit Clodronate-Liposomen (CL) bzw. PBS behandelt und 18 h später einem stumpfen Thoraxtrauma (TxT) oder dem Kontrolleingriff (Sham) ausgesetzt. Nach 24 h wurde das Plasma gewonnen und die Konzentrationen von IL-6 (A), IL-1 $\beta$  (B), MCP-1 (C) und KC (D) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n=7-10 Tiere pro Gruppe, One Way ANOVA, \* p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle, § p<0,05 vs. Kontrolle PBS, # p<0,05 vs. Thoraxtrauma PBS.

Die von Milzmakrophagen und Splenozyten in den Kulturüberstand abgegebenen Zytokinkonzentrationen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Milzmakrophagen nicht depletierter Versuchstiere zeigten nach dem Thoraxtrauma signifikant erhöhte Konzentrationen von TNF und IL-12 (ohne Abb.) sowie eine unveränderte Ausschüttung von IL-10. Bei Monozyten-depletierten Mäusen wurde hingegen eine signifikante Reduktion aller gemessenen Zytokine sowohl in der Kontroll- als auch in der Traumagruppe im Vergleich zu nicht depletierten Tieren festgestellt.

Die Zytokin-Ausschüttung von Splenozyten nicht depletierter Tiere in die Kulturüberstände blieb durch das Thoraxtrauma unverändert. In depletierten Mäusen waren die Konzentrationen von IL-2 und IL-4 in beiden Untersuchungsgruppen signifikant reduziert. Die Analyse der IL-10-Konzentrationen zeigte keinen Unterschied zwischen den Kontrollgruppen depletierter und nicht depletierter Mäuse, aber eine signifikante Reduktion bei depletierten Traumatieren im Vergleich zu nicht depletierten Traumatieren und depletierten Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu war die Konzentration von IL-12 (p70) in der Traumagruppe depletierter Mäuse, wenn auch nicht signifikant, gegenüber allen anderen Untersuchungsgruppen erhöht. Die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  war in der

Kontrollgruppe depletierter Tiere gegenüber nicht depletierten Kontrolltieren um 77% signifikant erniedrigt. Die Reduktion im Vergleich zu depletierten Traumatieren erreichte keine Signifikanz ( $p$ -Wert: 0,07).

**Tabelle 4. Zytokinkonzentrationen in den Kulturüberständen von Milzmakrophagen und Splenozyten.** C57BL/6-Mäuse wurden mit Clodronate-Liposomen (CL) bzw. PBS behandelt und 18 h später einem stumpfen Thoraxtrauma (TxT) oder dem Kontrolleingriff (Sham) ausgesetzt. Die Milzmakrophagen (SM) und Splenozyten (SPL) wurden 24 h nach dem Trauma isoliert, für 24 h kultiviert und die Konzentrationen der Zytokine in den Kulturüberständen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n=8-10$  Tiere pro Gruppe, One Way ANOVA, \*  $p<0,05$  vs. entsprechende Kontrolle, §  $p<0,05$  vs. Kontrolle PBS, #  $p<0,05$  vs. Thoraxtrauma PBS.

Konzentration in pg/ml	PBS		CL	
	Sham	TxT	Sham	TxT
<b>SM</b> <b>TNF</b>	354,2 $\pm$ 36,2	583,8 $\pm$ 120,9 *	25,4 $\pm$ 3,7 §	14,4 $\pm$ 2,5 #
	16,6 $\pm$ 1,6	14,9 $\pm$ 2,2	4,4 $\pm$ 0,8 §	4,5 $\pm$ 0,4 #
<b>SPL</b> <b>IL-2</b>	1087,4 $\pm$ 84,9	899,7 $\pm$ 51,9	457,2 $\pm$ 44,7 §	597,3 $\pm$ 124,4 #
	35,8 $\pm$ 2,5	37,1 $\pm$ 2,0	18,4 $\pm$ 2,1 §	22,6 $\pm$ 3,7 #
	15,4 $\pm$ 1,7	13,4 $\pm$ 0,8	13,1 $\pm$ 1,5	8,9 $\pm$ 1,1 * #
	3,2 $\pm$ 1,1	3,6 $\pm$ 1,2	3,2 $\pm$ 1,1	7,1 $\pm$ 1,5
	69,6 $\pm$ 10,9	59,3 $\pm$ 5,8	16,0 $\pm$ 1,6 §	46,1 $\pm$ 16,2

## 5. Diskussion

Ein stumpfes Thoraxtrauma führt zu zahlreichen inflammatorischen Veränderungen, die nicht nur pulmonal, sondern auch systemisch festgestellt werden können [48,72,121]. Dies äußert sich in der Lunge unter anderem durch eine erhöhte Anzahl an Alveolarmakrophagen (AMΦ) [146] und deren vermehrte Ausschüttung chemotaktisch wirksamer Zytokine, was wiederum eine gesteigerte Migration von Monozyten und neutrophilen Granulozyten in die Lunge zur Folge hat [123,144]. Dabei sind die Mechanismen und die Kinetik der Monozyteneinwanderung in die Lunge nicht hinreichend geklärt. Außerdem ist unklar, ob sich die vermehrt migrierenden Monozyten nach einer stumpfen Lungenkontusion als vorteilhaft oder nachteilig auf die Entzündungsreaktion erweisen.

### 5.1. Kinetik der pulmonalen Monozyten-Migration nach stumpfem Thoraxtrauma

Hauptziel dieser Arbeit war, die migratorischen Vorgänge zirkulierender Monozyten unter Berücksichtigung der Beteiligung verschiedener Monozyten-Subpopulationen nach einer stumpfen Lungenkontusion zu beschreiben.

Dafür wurde eine in der Literatur bekannte *in vivo*-Fluoreszenz-Markierung verschiedener Zellpopulationen verwendet. Durch die Applikation Fluoreszenzfarbstoff-gefärbter Liposomen konnten so neben Monozyten [32,82,156] auch Kupffer-Zellen [68] oder Dendritische Zellen [84] markiert werden. Dies machte einen anschließenden Nachweis der markierten Zellen in unterschiedlichen Geweben und damit auch Rückschlüsse auf eventuelle Wanderungsvorgänge möglich. Für Phagozyten wurde dabei die Aufnahme der Liposomen durch Endozytose beschrieben [114]. In dieser Arbeit wurde die Markierung der zirkulierenden Monozyten durch intravenöse Applikation von mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiD gefärbten, PBS-gefüllten Liposomen durchgeführt. Im Rahmen der Vorversuche konnte gezeigt werden, dass über 80% der Monozyten DiD-positiv waren. Diese Quote markierter Zellen wurde als ausreichend hoch erachtet, die Hauptversuche zur Verfolgung der Monozyten im hier verwendeten Mausmodell des stumpfen Thoraxtraumas durchzuführen. Ein direkter Vergleich der Rate fluoreszenzmarkierter Monozyten in vergleichbaren Studien war dabei durch ungenaue oder fehlende Angaben nicht möglich [32,156]. Lee et al. konnten in ihrer Studie ca. 40% DiD-positive Monozyten nachweisen, die allerdings nur der Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten-Subpopulation angehörten [82]. Man vermutete dabei, dass die Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten durch geringere Phagozytoseaktivität die Liposomen nicht aufnehmen. Im Gegensatz dazu beschrieben Tacke et al. eine Phagozytoseaktivität bereits bei noch nicht



ausgereiften Knochenmarksmonozyten [161], die hauptsächlich dem Ly-6C<sup>high</sup>-Phänotyp angehören [83]. Diese Phagozytose-Leistung scheint sich insgesamt mit zunehmendem Differenzierungsgrad der Monozyten-Subpopulationen zu steigern [118] und auch im hier durchgeführten Versuch wurden die Liposomen tendenziell vermehrt durch Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten aufgenommen. Trotzdem konnten auch in der im Vorversuch aufgetretenen, ausgeprägt DiD-positiven Zellpopulation Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten nachgewiesen werden. Außerdem umfasste der Prozentsatz markierter Zellen den Großteil aller Monozyten und die verbliebenen, nicht markierten Monozyten gehörten allen Subpopulationen an. Daher fand in dieser Arbeit keine selektive Aufnahme der Liposomen durch einzelne Monozyten-Subpopulationen statt.

Die Markierung der zirkulierenden Monozyten im Hauptversuch konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden, auch wenn im Vergleich zum Vorversuch ein etwas geringerer Anteil an Monozyten mit den DiD-Liposomen angefärbt wurde (2 h nach Trauma und 26 h nach Markierung ca. 70%). Dies kann z. B. durch den im Hauptversuch leicht unterschiedlichen Zellumsatz oder den späteren Untersuchungszeitpunkt erklärt werden. Die Markierung beschränkte sich dabei tatsächlich auf die Monozyten, denn sowohl Granulozyten als auch Lymphozyten waren unmarkiert. Da Lymphozyten nicht phagozytotisch aktiv sind, wurde eine Markierung mit den DiD-Liposomen nicht erwartet. Für Granulozyten mit bekannterweise hoher Phagozytoseaktivität war dies jedoch ungewöhnlich, aber dieser Effekt wurde bereits mehrfach beschrieben [129,139,176]. Da die Markierung der Monozyten vor der Thoraxtrauma- oder Kontrollbehandlung stattfand, wurden die DiD-Liposomen von den Monozyten beider Versuchsgruppen gleichermaßen aufgenommen und das Thoraxtrauma an sich hatte keinen weiteren Einfluss auf die Anzahl markierter Monozyten im Blut. Die kontinuierliche Abnahme des Anteils DiD-positiver Monozyten nach Kontrolleingriff oder Trauma kann dabei auf zwei verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Entweder wandern die in der Zirkulation nur kurz verweilenden Monozyten ins Gewebe ein und differenzieren sich [170], oder sie sterben durch apoptotische Prozesse [117]. Beide Vorgänge dienen dem normalen Umsatz an Monozyten im Blut und es scheint, dass in dieser Arbeit der Umsatz offenbar unabhängig von der Induktion eines Thoraxtraumas aufrechterhalten wurde. Dies wird auch dadurch untermauert, dass die Monozyten-Anteile im Blut traumatisierter Mäuse keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollgruppen aufwiesen. Allerdings ist ein Anstieg der zirkulierenden Monozytenzahlen zu einem späteren Zeitpunkt nicht auszuschließen. So kam es in Mausmodellen mit progressiver renaler Fibrose [91] oder systemischer *Listeria monocytogenes*-Infektion [156] erst nach 72 h zu deutlich erhöhten Monozyten-Zellzahlen in der Zirkulation.

Bei der Untersuchung des Knochenmarks konnten 2 h nach dem Trauma oder der Kontrollbehandlung erhöhte Anteile DiD-positiver Monozyten festgestellt werden. Auch hier wurden keine Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen gefunden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die zirkulierenden Monozyten sowohl unter physiologischen- als auch unter Traumabedingungen zwischen Blut und Knochenmark migrieren. Eine Rezirkulation von Monozyten ins Knochenmark konnte bereits von Varol et al. nachgewiesen werden, die GFP-exprimierende Monozyten in die Zirkulation unbehandelter Wildtyp-Mäuse gaben und diese 4 Tage (d) nach der Verabreichung im Knochenmark wieder finden konnten [179]. Allerdings fand in jener Studie die aktive Rückwanderung nur unter physiologischen Bedingungen („steady state“) statt [49], damit sich die Monozyten im Knochenmark weiter differenzieren oder den Monozyten-Pool aufrechterhalten können [178]. In der hier durchgeführten Arbeit wurde eine Rückwanderung DiD-markierter Monozyten ins Knochenmark aber nicht nur unter „steady state“-Bedingungen, sondern auch unter Traumabedingungen festgestellt. Da der Anteil an rezirkulierenden Monozyten zwischen den Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede aufwies, kann bezüglich der Monozyten des Knochenmarks ebenfalls ein geringer Einfluss des Thoraxtraumas vermutet werden. Dies wird wiederum dadurch unterstützt, dass sich die prozentualen Anteile an Knochenmarksmonozyten durch das Thoraxtrauma nicht veränderten und auch die mRNA-Expression der Oberflächenmoleküle CCR2, CX<sub>3</sub>CR1, CD62L, CD11b und des Zytokins TGF-β1 zwischen Kontroll- und Traumagruppen nicht unterschiedlich war. Das Thoraxtrauma scheint also den regulär stattfindenden Umsatz an Monozyten im Knochenmark nicht zu beeinflussen. Die geringere Anzahl markierter Knochenmarksmonozyten 24 h und 48 h nach Thoraxtrauma oder Kontrolleingriff sind einerseits auf die im Vollblut verminderte Anzahl DiD-positiver Monozyten zurückzuführen, wodurch weniger Monozyten ins Knochenmark rezirkulieren. Andererseits können die Monozyten nach entsprechenden Differenzierungsprozessen auch wieder vom Knochenmark ins Blut zurückwandern [178]. In der CD11b<sup>high</sup>-Population des Lungengewebes konnten ebenfalls DiD-positive Zellen gefunden werden. Da dieser Zellpopulation sowohl Granulozyten als auch Monozyten angehören, die Granulozyten aber die DiD-Liposomen bekanntermaßen nicht aufnehmen [129,139,176], ist davon auszugehen, dass die markierten Zellen ausschließlich Monozyten waren. Vermutlich stammten diese überwiegend aus dem vaskulären System, oder sie waren bereits ins Interstitium eingewandert und hatten sich dort noch nicht weiter differenziert. In den Kontrollgruppen nahmen die Anteile DiD-positiver Monozyten kontinuierlich über die Zeit ab, so dass diese Zellen ebenfalls regulären Umwandlungs- und Abbauprozessen zu unterliegen schienen. Interessanterweise wurden jedoch 2 h nach dem Thoraxtrauma signifikant weniger Monozyten festgestellt, als bei Mäusen der

Kontrollgruppe, obwohl am Ort des Traumas eher eine erhöhte Zellzahl erwartet wurde. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass frühzeitig nach dem Trauma eine Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)-vermittelte Anheftung der Monozyten ans Endothel erfolgte. So konnte die konstitutive ICAM-1-Expression 1-2 h nach TNF-Stimulation sowohl in einer humanen Lungenendothel-Zelllinie (HPAEC; human pulmonary arterial endothelial cells) [65], als auch in einer isolierten, perfundierten Mauslunge [181] hochreguliert werden. Auch im hier durchgeführten Versuch wurden früh nach dem Thoraxtrauma erhöhte TNF-Konzentrationen festgestellt, so dass eine vermehrte TNF-induzierte Expression von ICAM-1 im Endothel der kontusionierten Lunge möglich wäre. So kann über die tatsächliche Anzahl eingewanderter Monozyten früh nach dem Thoraxtrauma keine genaue Aussage getroffen werden. Bei der Untersuchung einer sterilen Entzündung durch intraperitoneale Verabreichung von FCS wurde festgestellt, dass die Entzündung zur Rekrutierung von Ly-6C<sup>high/int</sup>-Monozyten ins Peritoneum führt, obwohl sich die Zusammensetzung der Monozyten-Subpopulationen im Blut nicht änderte [156]. Es scheint also durchaus möglich, dass das Thoraxtrauma die Monozyten und deren Subpopulationen im Blut unbeeinflusst lässt, aber dennoch Monozyten aus dem Knochenmark in die Lunge zum inflammatorischen Fokus wandern. Anhand der vorliegenden Daten kann diese mögliche Einwanderung allerdings nicht nachgewiesen werden. Außerdem wäre es vorstellbar, dass der Anteil an DiD-positiven Monozyten 2 h nach dem Thoraxtrauma in der Traumagruppe ähnlich hoch ist, wie in der Kontrollgruppe. Durch die trauma-induzierte, gesteigerte endotheliale ICAM-1-Expression (und daraus resultierende Monozyten-Adhäsion) könnte die Monozyten-Zellzahl allerdings fälschlicherweise als vermindert eingeschätzt werden.

Bei der Untersuchung der interstitiellen Makrophagen (IM $\Phi$ ; mit niedrigerer CD11b-Expression (CD11b<sup>low</sup>) [66,77,79]) und AM $\Phi$  konnten 2 h nach dem Trauma noch keine DiD-markierten Zellen nachgewiesen werden. Somit waren die mit dem Blutstrom in die Lunge gelangten DiD-positiven Monozyten zu diesem Zeitpunkt entweder noch nicht ins Interstitium eingewandert, oder hatten sich nach der Einwanderung noch nicht zu IM $\Phi$  oder schließlich zu AM $\Phi$  differenziert. Zu späteren Zeitpunkten (24 h und 48 h) nach dem Thoraxtrauma wurden hingegen deutlich erhöhte Zellzahlen DiD-positiver IM $\Phi$  und AM $\Phi$  festgestellt. Dies legte nahe, dass sich im Zeitraum zwischen 2 h und 24 h die nach dem Trauma ins Interstitium eingewanderten Monozyten vermehrt zu IM $\Phi$  differenziert hatten, diese anschließend in die Alveole wanderten und dort zu AM $\Phi$  heranreiften. Interessanterweise hatten sich jedoch trotz vermehrter Differenzierung von IM $\Phi$  zu AM $\Phi$  die Gesamtzellzahlen an AM $\Phi$  erst 48 h nach dem Thoraxtrauma nennenswert gesteigert. Die 24 h nach dem Trauma vermehrt nachgerückten AM $\Phi$  schienen also einen ständig im Wandel befindlichen Zellpool aufzufüllen, bei dem die Apoptose- und Zuwachsrate an

AM $\Phi$  ungefähr im Gleichgewicht gewesen sein muss. Obwohl 48 h nach dem Trauma die Anteile DiD-positiver IM $\Phi$  zurückgingen, blieben die Anteile der AM $\Phi$  zu diesem Zeitpunkt erhöht. Dies könnte auf eine für AM $\Phi$  beschriebene, vermehrte Proliferationsrate hindeuten [79], die zu diesem Zeitpunkt, unter der Annahme einer geringeren Abbaurates, zu den tendenziell erhöhten AM $\Phi$ -Zahlen geführt haben könnte. Da der Fluoreszenz-Farbstoff DiD in der Zellmembran eingelagert wird (Herstellerangaben), bleibt die Markierung einer Zelle, wenngleich quantitativ vermindert ausgeprägt, auch nach der Teilung erhalten. Somit kann auch durch lokale Proliferation die Anzahl DiD-markierter Zellen gesteigert werden. Diese Daten stimmen mit einer Studie von Landsman und Jung überein, die IM $\Phi$  einerseits als Zwischenstufe in der Differenzierung von Monozyten zu AM $\Phi$  beschrieben und andererseits eine lokale Proliferation von IM $\Phi$  und AM $\Phi$  feststellen konnten [79]. Außerdem nahmen die Autoren an, dass die Fähigkeit zur Proliferation und somit zur lokalen „Selbst-Erneuerung“ ein für Makrophagen-Populationen allgemeingültiges Phänomen sei. Diese Art der „Selbst-Erneuerung“ könnte auch in dieser Studie eine wichtige Rolle spielen, zumal die Anzahl zirkulierender Monozyten durch das Thoraxtrauma nachweislich unbeeinflusst war.

Die Tatsache, dass in der Lunge die Umwandlung von DiD-markierten Monozyten in IM $\Phi$  und AM $\Phi$  bzw. deren lokale Proliferation bereits 24 h nach dem Trauma ihren Höhepunkt erreicht zu haben schien, zeigt auf, dass ein engmaschigeres Netz an Untersuchungszeitpunkten zwischen 2 h und 24 h nach dem Trauma von Vorteil für die Studie gewesen wäre. So bleibt z. B. der genaue Zeitpunkt der einsetzenden Proliferation unentdeckt und bietet Raum für weiterführende Untersuchungen. Auch die „Verdünnung“ der DiD-Markierung mit zunehmender Zellteilung stellt eine Limitation dieser Studie dar. Die Entwicklung eines einfach anzuwendenden Markers, der auch nach der Zellteilung mit Standardmethoden ohne Datenverlust gut messbar wäre, würde in Zukunft Untersuchungen zur Verfolgung und Differenzierung von Blutmonozyten vereinfachen.

Es ist inzwischen weithin anerkannt, dass sich Monozyten in Subpopulationen unterteilen lassen. Die Analyse dieser Subpopulationen während Infektions- und Inflammationsvorgängen findet immer mehr Beachtung [4,33,49,91,105,135]. Anhand der Expression verschiedener Oberflächenmarker wie CCR2, CX<sub>3</sub>CR1 oder Ly-6C werden sowohl zwei [49,105] als auch drei [91,156] Populationen unterschieden [154]. In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte die Unterteilung der Monozyten über die Expression von Ly-6C, die im Gegensatz zu den Expressionsmustern von CCR2 und CX<sub>3</sub>CR1 drei deutlich abgrenzbare Populationen mit hoher (Ly-6C<sup>high</sup>), mittlerer (Ly-6C<sup>int</sup>) und niedriger (Ly-6C<sup>low</sup>) Ly-6C-Expression zeigte. Dabei wurden bei der Analyse der DiD-positiven Monozyten im Blut und im Knochenmark zeitabhängige Veränderungen in der Zusammensetzung der Subpopulationen festgestellt, die allerdings zwischen Kontroll- und Traumagruppe nicht

unterschiedlich waren. Früh nach dem Trauma fand sich ein besonders hoher Anteil an DiD-positiven Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten im Knochenmark. Gleichzeitig war deren Anteil im Blut vergleichsweise gering. Da bereits nachgewiesen werden konnte, dass Monozyten aus dem Blut wieder zurück ins Knochenmark migrieren, wurde mit der vorliegenden Analyse der Subpopulationen festgestellt, dass diese Monozyten hauptsächlich der Ly-6C<sup>high</sup>-Population angehörten. Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen der Gruppe um Jung et al. bestätigt, die durch Transplantation fluoreszierender Monozyten dieses selektive Migrationsverhalten der Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten zeigen konnten [179,186]. Allerdings beschrieben die Autoren die Rückwanderung lediglich für Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten unter „steady state“-Bedingungen, da diese Zellen während inflammatorischer Vorgänge zu den Orten der Entzündung migrieren. Obwohl in der hier vorliegenden Arbeit der Großteil der Ly-6C<sup>int</sup>- und Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten im Blut zurückblieb, konnten früh nach dem Trauma Zellen beider Subpopulationen im Knochenmark gefunden werden. Dies könnte entweder bedeuten, dass auch Ly-6C<sup>int</sup>- und Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten zu einem geringen Teil das Vermögen zur Rezirkulation ins Knochenmark besitzen, oder aber die Einwanderung der Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten schon vor Applikation des Thoraxtraumas oder des Kontrolleingriffes stattgefunden hat, so dass sich diese im Knochenmark bereits zu den anderen Subpopulationen differenziert hatten. Über die Zeit fand im Knochenmark die Umwandlung von Ly-6C<sup>high</sup>- zu Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten statt [179], was die einerseits sinkenden Zellzahlen der Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten und andererseits die steigenden Zellzahlen der Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten 24 h und 48 h nach Trauma- oder Kontrolleingriff erklärt. Die neu differenzierten Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten migrierten nach und nach aus dem Knochenmark wieder in die Zirkulation und führten so zu den dort kontinuierlich ansteigenden Zellzahlen. Bemerkenswerterweise blieb die Menge der Ly-6C<sup>int</sup>-Monozyten im Knochenmark über alle Untersuchungszeitpunkte annähernd gleich. Diese Subpopulation könnte einen Zellpool darstellen, der für die schnelle Freisetzung der unter inflammatorischen Vorgängen vermehrt auftretenden Ly-6C<sup>int</sup>-Monozyten [156] verantwortlich ist. Außerdem wäre denkbar, dass dieser Zellpool genügend Zellen für die Umwandlung in Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten bereitstellt, die sich ihrerseits weiter in dendritische Zellen und Makrophagen differenzieren können [186]. Dass Ly-6C<sup>int</sup>-Monozyten mehr als nur eine Übergangsstufe zwischen Ly-6C<sup>high</sup>- und Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten darstellen, wurde von Qu et al. beschrieben [130]. So wurde festgestellt, dass die Ly-6C<sup>int</sup>-Monozyten neben CCR2 auch weitere Rezeptoren (CCR7 und CCR8) für verschiedene chemotaktisch wirksame Zytokine exprimieren. Damit können sie besonders flexibel auf die Rekrutierung in entzündetes Gewebe reagieren und in CCR2-defizienten Mäusen mit deutlich verminderten Ly-6C<sup>high</sup>-Monozytenzahlen deren Funktion übernehmen [130].

Ly-6C<sup>high</sup>- und Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten besitzen ein unterschiedliches Differenzierungspotential. Beide Subpopulationen können sich in dendritische Zellen umwandeln, aber nur Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten haben die Fähigkeit, zu AM $\Phi$  zu reifen [80]. Es kann also davon ausgegangen werden, dass auch in der hier durchgeführten Studie die AM $\Phi$  aus Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten hervorgegangen sind, die vorher den kompletten Reifungsprozess, der sich u. a. durch die kontinuierlich abfallende Ly-6C-Expression äußert, durchlaufen haben. Geissmann et al. stellten fest, dass hauptsächlich die Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten unter inflammatorischen Bedingungen zu den Orten der Entzündung wandern [49]. Bei dem Versuch, die DiD-positiven Monozyten der Lunge durchflusszytometrisch in Subpopulationen zu unterteilen, zeigte sich jedoch, dass dies durch fließende Übergänge zwischen eventuell vorhandenen Populationen objektiv nicht möglich war. Auch Tendenzen in Richtung einer Subpopulation waren nicht sicher feststellbar. Die Schlussfolgerung, dass nach dem Thoraxtrauma überwiegend Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten in die Lunge einwandern, konnte somit in der vorliegenden Arbeit nicht gezogen werden. Außerdem bleibt fraglich, warum trotz regulär stattfindender Umwandlungsprozesse der einzelnen Subpopulationen deren Zusammensetzung durch das Thoraxtrauma nicht verändert wurde. Denkbar wäre, dass das Thoraxtrauma im hier durchgeführten Versuch für die Beeinflussung der Monozyten nicht ausgeprägt genug war, obwohl die Tiere makroskopisch sichtbare Schädigungen des Lungengewebes (wie z. B. Einblutungen) aufwiesen. Außerdem wäre möglich, dass die Monozyten der Kontrolltiere durch einen Stimulus derart beeinflusst waren, dass sie bezüglich der Zusammensetzung der Subpopulationen vergleichbare Muster wie in traumatisierten Tieren zeigten. Ein solcher Stimulus könnte die Narkose mit Sevofluran sein. So kann Sevofluran u. a. die Leukozytenzahl im peripheren Blut [127], oder auch die Zusammensetzung der zirkulierenden Leukozyten [103] modulieren. Ein Einfluss auf die Monozyten-Subpopulationen wäre somit nicht auszuschließen. In zukünftigen Untersuchungen sollten daher eventuell die Stärke des Thoraxtraumas und die Narkose variiert werden, um deren Einfluss auf die Monozyten weiter charakterisieren zu können.

Für die Beurteilung der durch das Thoraxtrauma hervorgerufenen pulmonalen Inflammation wurden in der BAL-F Protein- und Zytokinkonzentrationen bestimmt.

Die Gesamtmengen an Protein zeigten sich dabei 2 h und 24 h nach einer Lungenkontusion signifikant erhöht und lassen so auf eine alveolokapilläre Schrankenstörung schließen. Vergleichbare Ergebnisse konnten bereits in Studien zur Rolle von neutrophilen Granulozyten und AM $\Phi$  während eines Thoraxtraumas bei C3H/HeN-Mäusen festgestellt werden [108,123], deren Proteinnengen in der BAL-F innerhalb der ersten 24 h nach dem Trauma deutlich erhöht waren. Allerdings wurden in beiden Studien Proteinkonzentrationen zu späteren Zeitpunkten nicht untersucht. Der in

der vorliegenden Arbeit gefundene Abfall der Proteinkonzentration 48 h nach dem Thoraxtrauma deutet auf ein verringertes proteinreiches Lungenödem mit vermehrter Regeneration der alveolokapillären Membranen und somit auf eine verringerte Schrankenstörung hin.

Die Konzentrationen der untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, und TNF waren 2 h nach dem Trauma signifikant erhöht und sanken innerhalb von 24 h (IL-6) oder 48 h (IL-1 $\beta$ , TNF) nach dem Trauma wieder auf Kontrollniveau ab. Durch das Thoraxtrauma wurde also die pulmonale Entzündung bereits früh durch vermehrte Generierung und Abgabe dieser Zytokine vorangetrieben. Dabei dienen vor allem IL-1 $\beta$  und TNF als Initiatoren der Entzündungsreaktion und fördern die vermehrte Rekrutierung von Leukozyten oder induzieren die Produktion weiterer Zytokine wie z. B. IL-6, dass seinerseits durch seine vielfältigen Effekte auch auf Lymphozyten den Übergang von der angeborenen zur erworbenen Immunität markiert [30,34,165]. IL-1 $\beta$  als ein in der akuten Phase der Inflammation freigesetztes Zytokin wurde in bisherigen Studien zum Thoraxtrauma nur bei der Ratte untersucht. Hier konnten erst langsam ansteigende IL-1 $\beta$ -Konzentrationen mit einem maximalen Anstieg 24 h nach dem Trauma gemessen werden [90,146]. Diese Diskrepanz betraf dabei nicht nur IL-1 $\beta$ , sondern auch andere Zytokine wie IL-6, MCP-1, Macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) oder CINC-1 [90,131,143]. Da die Freisetzung von Schlüssel-Mediatoren in der Ratte insgesamt später als in der Maus stattzufinden scheint, könnte dies eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Zeitpunkte maximaler IL-1 $\beta$ -Ausschüttung sein. Vergleichbare Ergebnisse zu den ebenfalls früh erhöhten TNF-Konzentrationen wurden in Mäusen mit Endotoxin- oder *Mycoplasma pulmonis*-induzierter Lungenentzündung gefunden [31,39]. In jenen Studien wurden 6 h nach intratrachealer Instillation des Endotoxins bzw. 4 h nach intranasaler Applikation der Mycoplasmen die höchsten Konzentrationen von TNF gemessen, die sich innerhalb von 48 h deutlich reduzierten. Faulkner et al. stellten dabei fest, dass abgegebene TNF-Konzentrationen in Abhängigkeit vom verwendeten Mausstamm variieren können. So wird zwischen 1 h und 3 d nach Infektion trotz ähnlicher Verlaufskurve bei C57BL/6-Mäusen deutlich weniger TNF freigesetzt, als bei C3H/HeN-Mäusen [39]. Die in dieser Arbeit beobachteten IL-6-Konzentrationen werden durch weitere Studien der durch Lungenkontusion hervorgerufenen ALI bei der Maus bestätigt. Dort konnten ebenfalls 2 h nach dem Trauma gesteigerte Konzentrationen von IL-6 nachgewiesen werden, die innerhalb von 24 h entweder stark gesunken [123], oder wieder auf physiologische Konzentrationen zurückgeführt waren [108,120]. Auch in einem murinen Modell mit LPS-induzierter pulmonaler Inflammation konnten früh (4 h) erhöhte IL-6-Konzentrationen in der BAL-F gemessen werden, die sich innerhalb von 24 h normalisierten [185]. Dass IL-6 ausschließlich einen früher Marker für inflammatorische

Vorgänge in der Lunge darstellt, wurde dadurch deutlich, dass trotz erhöhter TNF-Konzentrationen 24 h nach dem Trauma die Menge an IL-6 zu diesem Zeitpunkt wieder auf Normalniveau gesunken war. Dieser schnelle Abfall an IL-6 wurde ebenfalls in einer klinischen Studie zum Thoraxtrauma beobachtet [155]. Alle hier gemessenen proinflammatorischen Zytokine werden hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen produziert [30,36,50,182]. Unter der Annahme, dass trotz eventuell an endotheliales ICAM-1 gebundener Monozyten deren Anzahl die der Kontrolltiere nicht wesentlich überstieg, hatten entweder die Monozyten die Freisetzung von IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF wesentlich gesteigert, oder diese Zytokine wurden von anderen Zellen produziert. So können auch die residenten Lungenmakrophagen an der Freisetzung maßgeblich beteiligt sein. Im Fall von IL-6 kommen zusätzlich auch Zellen des Lungengewebes als Produzenten in Frage. So wurde z. B. von Alveolar Typ 2-Zellen vermehrt IL-6 nach einem Thoraxtrauma abgegeben [145] und Sharma et al. stellten bei einem durch Hypoxie und Reoxygenierung verursachten Ischämie/Reperfusionsschaden der Lunge bei Mäusen eine gesteigerte Produktion von IL-6 durch Lungenepithelzellen fest [150]. TNF und IL-1 $\beta$  sind außerdem potente Chemokine für neutrophile Granulozyten [13]. Die nachgewiesene Trauma-induzierte alveolokapilläre Schrankenstörung verstärkt möglicherweise die systemische Zytokinfreisetzung und kann dadurch zur vermehrten Rekrutierung von Granulozyten führen, was die erhöhten Granulozyten-Zellzahlen früh nach dem Trauma mit bedingen könnte.

Weitere wichtige Chemokine im inflammatorischen Geschehen nach einem Thoraxtrauma sind MCP-1 und RANTES, die 2 h und 24 h nach Trauma in die BAL-F freigesetzt wurden. Da sowohl MCP-1 als auch RANTES chemotaktisch auf Monozyten wirken [27,140], wird in der kontusionierten Lunge der Stimulus zur zielgerichteten Wanderung zur Stelle der Entzündung bereits frühzeitig gesetzt und hält offensichtlich über längere Zeit an. Vergleichbare Ergebnisse wurden für MCP-1 auch in Mäusen mit durch hämorrhagischen Schock und Sepsis indirekt induzierter ALI beobachtet [119]. In jener Studie wurde die vermehrte Produktion von MCP-1 und anderen Chemokinen (KC, MIP-2) durch Fas-aktivierte Lungenepithelzellen vermittelt. Auch in einem Modell mit Druckwellen-induziertem Thoraxtrauma wurde die Aktivierung des Fas/FasL-Systems mit erhöhter Apoptose von Lungenepithelzellen und deren gesteigerte Freisetzung von MCP-1 nachgewiesen [145]. Da auch in der hier vorliegenden Arbeit durch das Thoraxtrauma eine Aktivierung des Fas/FasL-Systems mit vermehrter Apoptose der Alveolarepithelzellen wahrscheinlich ist, könnten für die Produktion von MCP-1 und RANTES eher die Epithelzellen der Lunge als die residenten Lungenmakrophagen in Frage kommen. Die erhöhten TNF-Konzentrationen, die ebenfalls Lungenepithelzellen zu



gesteigerter Abgabe von MCP-1 und RANTES stimulieren können [136], unterstützen diese Annahme.

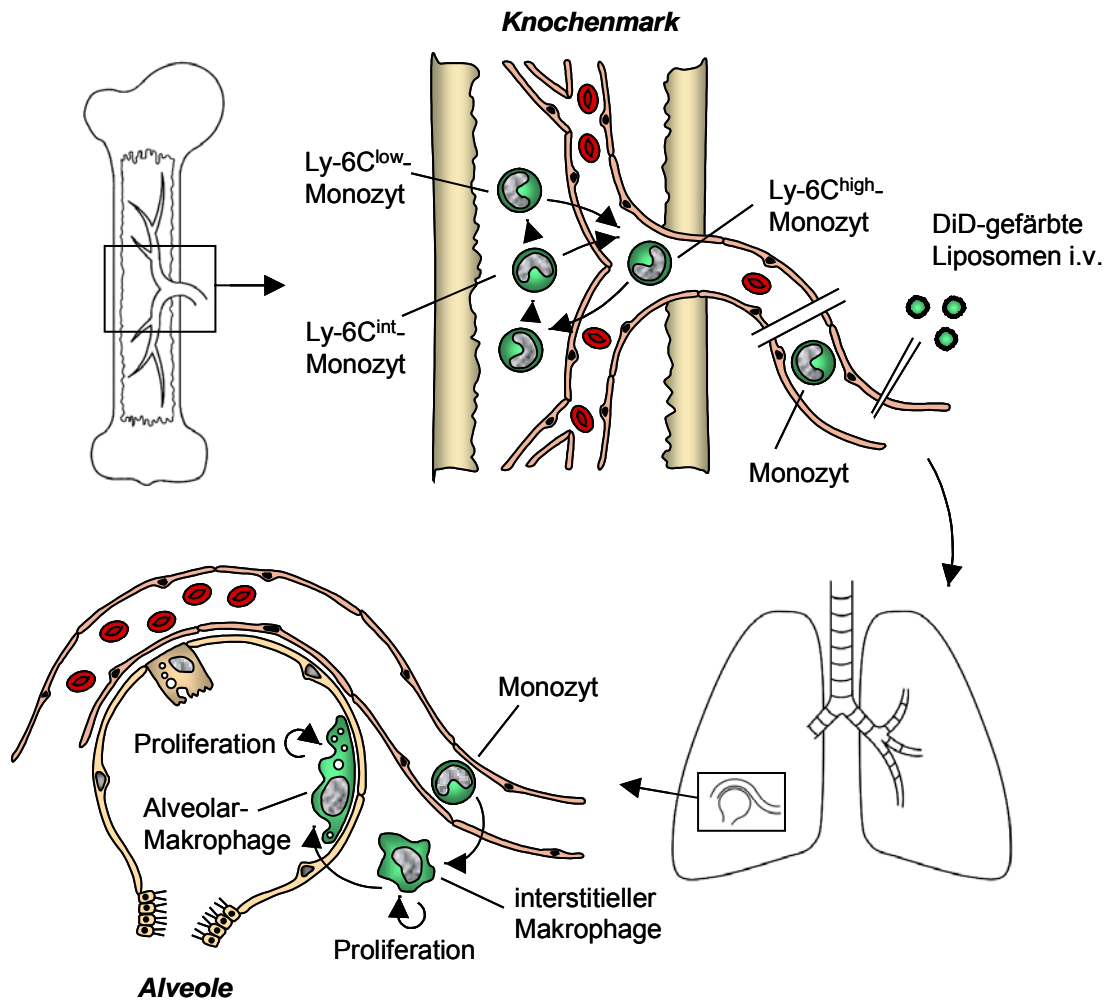
Parallel zu den pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen war die Konzentration des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 ebenfalls 2 h nach dem Trauma deutlich erhöht und sank innerhalb von 48 h wieder auf Normalniveau ab. Vergleichbare IL-10-Konzentrationen wurden in einem Modell mit Endotoxin-induzierter Lungenentzündung gemessen [31]. Dort stieg die Konzentration an IL-10 in der BAL-F zwischen 3 h und 12 h nach Endotoxin-Gabe signifikant an und sank zum 24 h-Zeitpunkt wieder deutlich ab. Ein ähnlicher Anstieg bis 12 h nach einem Thoraxtrauma wäre in der hier durchgeführten Studie zwar möglich, konnte vermutlich aufgrund der gewählten Untersuchungszeitpunkte aber nicht nachgewiesen werden. Die Konzentrationen des eher anti-inflammatorisch wirkenden TGF- $\beta$ 1 [88] zeigten einen vergleichbaren Verlauf wie IL-10. In Analysen zur Funktion von AM $\Phi$  nach einer Lungenkontusion konnten ebenfalls 2 h und 24 h nach Trauma signifikant erhöhte TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen festgestellt werden [108]. Für diesen Anstieg sind wahrscheinlich die residenten Lungenmakrophagen verantwortlich, die bei verstärkter Phagozytose apoptotischer Zellen die Produktion von TGF- $\beta$ 1 hochregulierten [38,98]. So korrelierten auch in der hier vorliegenden Arbeit die TGF- $\beta$ 1-Spiegel in der BAL-F mit der Anzahl an Zelltrümmern (Daten nicht gezeigt). Funktionell können sowohl IL-10 als auch TGF- $\beta$ 1 pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  oder TNF inhibieren [31,42,168]. Der hier innerhalb von 48 h beobachtete Abfall der IL-1 $\beta$ - und TNF-Konzentrationen könnte also durch die frühe Ausschüttung von IL-10 und TGF- $\beta$ 1 verursacht worden sein.

Die Konzentrationen an abgegebenem GM-CSF reihten sich in die Profile der anderen untersuchten Zytokine ein und zeigten sich 2 h und 24 h nach dem Trauma deutlich erhöht. Ein vergleichbarer früher Anstieg konnte auch auf mRNA-Ebene in Lungen mit durch Bleomycin induzierter Fibrose bei der Ratte festgestellt werden. Hier stieg die mRNA-Expression von GM-CSF bis 12 h nach Bleomycin-Instillation an und sank nach 24 h wieder auf Normalwerte ab [2]. Interessanterweise war dabei GM-CSF in der Lage, in AM $\Phi$  die Expression von TGF- $\beta$ 1 zu induzieren. Dies unterstützt die Annahme, dass für die hier gemessenen Konzentrationen an TGF- $\beta$ 1 die residenten Lungenmakrophagen verantwortlich sind. Ob GM-CSF durch seine immunmodulatorischen Funktionen die inflammatorische Reaktion vorantreibt oder abmildert, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Allerdings wurde in humanen Neutrophilen und Monozyten eine erhöhte Expression von CD11b bei Stimulation durch GM-CSF festgestellt [55], was schließlich zu einer vermehrten Zelladhäsion und -migration führte. Darüber hinaus wanderten in GM-CSF-depletierten- oder GM-CSF-defizienten Mäusen mit jeweils LPS-induzierter ALI weniger Neutrophile in die Lunge ein, wodurch die pulmonale Entzündung insgesamt

weniger ausgeprägt verlief [21,128]. Dies spricht eher für eine pro-inflammatorische Reaktion durch erhöhte GM-CSF-Konzentrationen in der Lunge.

Die Ergebnisse der Mediatoranalyse in der BAL-F zeigten, dass die frühe Immunantwort in der Lunge durch die gleichzeitige Freisetzung von sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Zytokinen geprägt war, die sich gegenseitig in einem engen Zeitfenster regulierten. In einer klinischen Studie zu schweren stumpfen Traumata wurde durch genetische Analysen der zirkulierenden Leukozyten festgestellt, dass auch diese simultan pro- und anti-inflammatorische Gene hochregulieren können [184]. Allerdings ist ungewöhnlich, dass in der hier vorliegenden Arbeit die Zytokinprofile in der BAL-F meist 24 h nach dem Trauma bereits reduziert waren, die Anzahl umgewandelter IM $\Phi$  und AM $\Phi$  aber erst zu diesem Zeitpunkt deutlich erhöht war. Dies kann bedeuten, dass direkt nach dem Thoraxtrauma das Lungengewebe stark an der Freisetzung der Mediatoren beteiligt war. Gleichzeitig könnten die residenten Lungenmakrophagen ihre Zytokinexpression deutlich erhöht haben. Da bekannt ist, dass IM $\Phi$  im Vergleich zu AM $\Phi$  vermehrt immunregulatorische Mediatoren wie IL-1, IL-6 und IL-10 ausschütten [43,59], trugen vermutlich insbesondere diese Zellen zu den erhöhten Zytokinkonzentrationen bei. Abhängig vom umgebenden Milieu können Makrophagen in entzündetem Gewebe verschiedene Phänotypen annehmen [52,66]. Neben einem aktivierten Typ, der vermehrt pro-inflammatorische Zytokine abgibt, können durch erhöhte Konzentrationen von IL-10 und TGF- $\beta$ 1 Makrophagen entstehen, die für die oft zeitlich versetzten regenerativen Vorgänge verantwortlich sind [54]. Die auch 24 h nach Trauma noch immer erhöhten IL-10 und TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen und die anschließend schnell sinkenden Zytokinkonzentrationen bis 48 h nach dem Trauma lassen die Differenzierung in einen solchen regenerativen Phänotyp vermuten.

Die gewonnenen Erkenntnisse sind in Abbildung 14 noch einmal zusammengefasst und zeigen, dass im hier verwendeten Modell des stumpfen Thoraxtraumas der C57BL/6-Maus Monozyten durch intravenöse Verabreichung von DiD-gefärbten Liposomen markiert und somit in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden konnten. Sie migrierten früh nach Applikation des Thoraxtraumas oder der Kontrollbehandlung hauptsächlich als Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten aktiv vom Blut ins Knochenmark, um sich zu Ly-6C<sup>int</sup>- und Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten zu differenzieren. Von dort wanderten sie offensichtlich wieder in die Zirkulation zurück. Gleichzeitig wurden sie mit dem Blutstrom zur Lunge transportiert und wanderten ins Interstitium ein, um zu IM $\Phi$  und AM $\Phi$  zu reifen, die ihrerseits durch die Möglichkeit lokaler Proliferation selbstregulierend in die inflammatorischen Reaktionen nach dem Thoraxtrauma eingreifen können. Warum die sonst unter inflammatorischen Bedingungen mehrfach beschriebene Aktivierung der Blut- und Knochenmarksmonozyten [4,105,167] ausblieb, bleibt jedoch unklar.



**Abb. 14. Wanderung der Monozyten nach Markierung mit DiD-Liposomen.** Monozyten wurden intravenös mit DiD-gefärbten Liposomen markiert und wandern unter Kontroll- und Traumabedingungen ins Knochenmark und die Lunge. Im Knochenmark erfolgt die Differenzierung in weitere Monozyten-Subpopulationen und die Rezirkulation ins Blut. In der Lunge wandern die Monozyten ins Interstitium und differenzieren sich im Rahmen des regulär stattfindenden Zellsatzes zu interstitiellen Makrophagen und Alveolarmakrophagen. Diese reagieren auf ein Thoraxtrauma mit lokaler Proliferation.

## 5.2. Auswirkungen der Monozyten-Migration auf die posttraumatische Entzündungsantwort

In dieser Arbeit sollte festgestellt werden, welche Bedeutung eine vermehrte Einwanderung von Monozyten in die Lunge nach einem stumpfen Thoraxtrauma hat und ob Monozyten somit die pulmonale Entzündungsreaktion verstärken oder abschwächen können. Durch die Untersuchung der DiD-markierten Monozyten konnten keine eindeutigen Aussagen über eine tatsächlich vermehrte Monozyteneinwanderung in die Lunge früh nach dem Trauma getroffen werden (siehe oben). Da allerdings 24 h nach der Lungenkontusion eine erhöhte Anzahl DiD-markierter IM $\Phi$  festgestellt wurde, ist davon auszugehen, dass Blutmonozyten ins Interstitium migriert sind und sich dort vermehrt zu Makrophagen differenziert haben. Eine Depletion der zirkulierenden Monozyten würde somit den „Nachschub“ an Zellen, der für die Aufrechterhaltung der Zell-Homöostase in der Lunge wichtig ist, verhindern und gleichzeitig die Menge an proliferationsfähigen Makrophagen reduzieren. Durch eine Depletion der Monozyten des Blutes können daher Aussagen über deren Einfluss auf die posttraumatische Entzündungsantwort nach einem Thoraxtrauma erwartet werden.

Die verwendete Methode der Zell-Depletion durch Applikation von Clodronate-Liposomen wurde ursprünglich für Milzmakrophagen entwickelt [171] und schließlich auch auf weitere Makrophagen-Populationen angewandt [164,175]. Da das Prinzip der Methode auf der Phagozytose der Liposomen beruht, können allerdings auch andere mononukleäre Phagozyten (wie Monozyten) mit Clodronate-Liposomen depletiert werden [176,183]. Dies wurde im hier durchgeführten Vorversuch bestätigt, denn die Depletionsrate der Monozyten lag 18 h nach intravenöser Verabreichung der Clodronate-Liposomen bei über 84%. Vergleichbare Ergebnisse mit meist nicht eindeutig benannten, aber doch relativ hohen Depletionsraten konnten auch in Studien zur Rolle von Monozyten bei systemisch auftretenden bakteriellen oder parasitären Infektionen 18 h nach der Depletion erzielt werden [32,110,156]. Hingegen konnten Zhang-Hoover et al. in ihrer Studie zur pulmonalen Fibrose die Monozyten nicht depletieren und vermuteten als Grund eine zu geringe Phagozytoseaktivität [189]. Allerdings wurde die Menge an Monozyten erst 48 h nach Applikation der Clodronate-Liposomen durchflusszytometrisch bestimmt, so dass eine Repopulation mit Monozyten in dieser Zeit möglich war.

So wurde auch im hier durchgeführten Hauptversuch eine deutlich geringere Depletionsrate gemessen (ca. 55% bei Kontrolltieren und 60% bei Traumatieren), die wahrscheinlich auf den späteren Zeitpunkt der Bestimmung der Monozyten-Depletion zurückzuführen ist. Im Vorversuch wurde das Blut der Versuchstiere 18 h nach der Verabreichung der Clodronate-Liposomen auf depletierte Monozyten untersucht. Im Hauptversuch erfolgte zu diesem Zeitpunkt die Applikation des Thoraxtraumas oder der

Kontrollbehandlung. Da die Feststellung des Anteils depletierter Monozyten 24 h nach dem Trauma oder dem Kontrolleingriff (d. h. 42 h nach Verabreichung der Clodronate-Liposomen) stattfand, konnte der Monozyten-Pool im Blut partiell wieder aufgefüllt werden. Diese Monozyten gehörten hauptsächlich der Ly-6C<sup>high</sup>-Subpopulation an, was auf ausgewanderte Monozyten aus dem Knochenmark schließen lässt. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Sunderkötter et al., die 48 h nach intravenöser Monozyten-Depletion ebenfalls fast ausschließlich Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten im Blut feststellten [156]. Da die Depletionsrate 42 h nach der Clodronate-Liposomen-Gabe noch immer bei über 50% lag, kann davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Applikation des Thoraxtraumas ein hinreichender Teil der Monozyten depletiert war. Im Gegensatz dazu wurden die Lymphozyten und Granulozyten des Blutes nicht depletiert, da sie, wie bereits beschrieben, die Liposomen nicht aufnehmen [129,176]. In nicht depletierten Tieren konnte durch das Thoraxtrauma keine Veränderung in der Monozyten-Zellzahl im Blut im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Studie zur Kinetik der Monozyten-Migration, bei der ebenfalls 24 h nach dem Trauma keine gesteigerte Anzahl an Monozyten im Blut nachgewiesen wurde. Die fehlende Monozytose zu diesem Untersuchungszeitpunkt scheint also eher ein grundsätzliches Phänomen zu sein. So konnte während einer systemischen *Listeria monocytogenes*-Infektion bei C57BL/6-Mäusen sogar eine Monozytopenie bis 48 h nach der Infektion beobachtet werden, die erst weitere 24 h später wieder anstieg [156]. Da auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen C57BL/6-Mäuse verwendet wurden, ist eine Mausstamm-spezifische zögerliche Reaktion der Monozyten auf ein Trauma oder eine Infektion durchaus denkbar. In anderen Mausstämmen, die sich bereits in der Zusammensetzung der Leukozyten-Populationen unterscheiden [138], sind unterschiedliche Ergebnisse nicht auszuschließen. Speziesunterschiede bezüglich der Trauma-induzierten Modulation der Monozytenanzahl sollten daher Gegenstand zukünftiger Studien sein. So stellen sowohl der Mausstamm als auch der gewählte Untersuchungszeitpunkt nach dem Trauma Limitationen dieser Studie dar. Da zu einem zusätzlichen früheren Untersuchungszeitpunkt eine erhöhte Monozyten-Depletionsrate wahrscheinlich ist, hätten die Auswirkungen der Depletion im Vergleich zum späteren Zeitpunkt detaillierter untersucht werden können.

Der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil an Granulozyten im Blut war in nicht depletierten Versuchstieren, wie auch in der vorangegangenen Studie festgestellt wurde, zum gewählten Zeitpunkt nach dem Trauma nicht mehr erhöht. Die Monozyten-Depletion führte jedoch in traumatisierten Tieren zu signifikant gesteigerten Granulozytenzahlen. Diese sind wahrscheinlich nicht durch eine Verschiebung in der Zusammensetzung der Leukozyten im Blut durch die Monozyten-Depletion entstanden, da die depletierten

Kontrolltiere keine erhöhte Anzahl an Granulozyten im Vergleich zu nicht depletierten Tieren aufwiesen. Somit kann darauf geschlossen werden, dass durch das Thoraxtrauma eine verstärkte Rekrutierung von Granulozyten aus dem Knochenmark stattgefunden hat. Gestiegene Anzahlen zirkulierender Granulozyten wurden bereits allein durch die intravenöse Applikation von Clodronate-Liposomen zur Depletion von Makrophagen in Milz und Leber beobachtet [73]. Durch eine anschließende Induktion einer sterilen Peritonitis stieg die Granulozytenzahl im Blut noch weiter an. Da davon auszugehen ist, dass in jener Studie durch die Art der Liposomen-Verabreichung auch die Monozyten depletiert wurden, könnte das einen Hinweis auf die hier gemessenen, höheren Anteile an Granulozyten im Blut geben. Ein Einfluss der Liposomen-Applikation auf die Granulozyten an sich kann durch die nicht gesteigerte Anzahl in depletierten Kontrolltieren jedoch weitgehend ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu erhöhten Granulozytenzahlen wird häufiger deren geringfügige Erniedrigung nach Makrophagen-Depletion beschrieben, die mit geringeren Konzentrationen der sonst von Makrophagen abgegebenen und auf Granulozyten chemotaktisch wirkenden Zytokine (wie z. B. MIP-2 oder KC) in Verbindung gebracht werden [74,101]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde allerdings eine signifikant erhöhte KC-Konzentration im Plasma depletierter traumatisierter Tiere festgestellt, die so für die gesteigerten Granulozyten-Anteile verantwortlich sein könnte. Da durch die Depletion der zirkulierenden Monozyten diese für die Produktion von KC nicht mehr in Frage kommen, wird durch das Thoraxtrauma vermutlich eine gesteigerte KC-Expression in Endothelzellen [3,113] oder den Granulozyten selbst [47] induziert. Welche der beiden Zellpopulationen tatsächlich für die erhöhten KC-Konzentrationen verantwortlich ist, wäre ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

Die Analyse des Knochenmarks ergab, dass auch dort die Clodronate-Liposomen zu einer geringen, aber dennoch signifikanten Depletion der Monozyten führten. Darüber hinaus blieb die Zellzahl der Knochenmarksmonozyten durch das Thoraxtrauma unbeeinflusst, was mit den Daten der Studie zur Monozyten-Migration übereinstimmt. Die verbliebenen Knochenmarksmonozyten depletierter Tiere zeigten außerdem eine signifikant höhere L-Selektin (CD62L)-Expression als die entsprechenden Kontrolltiere, die allein schon durch das Thoraxtrauma L-Selektin hochregulierten. Das Adhäsionsmolekül L-Selektin ist für das „Rollen“ von Leukozyten am Endothel zur Vorbereitung der Transmigration ins Gewebe verantwortlich [163] und wird im Knochenmark hauptsächlich von Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten exprimiert [32,49]. Das Thoraxtrauma scheint also bereits per se zu einer erhöhten Bereitschaft zur Migration zu führen. Durch die Depletion der Monozyten müssen zur Substitution des Monozyten-Pools wieder vermehrt Zellen ins Blut rekrutiert werden. Daher wurde vermutlich sowohl in der Kontroll- als auch in der Traumagruppe depletierter Tiere das L-Selektin auf

Knochenmarksmonozyten vermehrt exprimiert. Ein zusätzliches Thoraxtrauma konnte sich somit auf die ohnehin schon sehr hohen Expressionsraten im Knochenmark in diesem Fall nicht weiter auswirken, da die Expression durch die Depletion scheinbar schon maximal aktiviert war. Diese unter Depletion erhöhten L-Selektin-Werte beschränkten sich dabei nicht nur auf die Monozyten des Knochenmarks, sondern konnten auch auf den schon wieder aus dem Knochenmark ins Blut gewanderten Monozyten sowie auf der CD11b<sup>high</sup>-Population in der Lunge festgestellt werden. Im Blut unterstützt das die Ergebnisse bezüglich der Monozyten-Subpopulationen, die besonders hohe Anteile an Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten mit hoher L-Selektin-Expression nach der Depletion aufwiesen [156]. Im Lungengewebe enthielt die CD11b<sup>high</sup>-Population allerdings Monozyten und Granulozyten, die beide L-Selektin in hohen Konzentrationen exprimieren [86,93]. Daher kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, welche der beiden Zellpopulationen L-Selektin tatsächlich hochregulierte. Allerdings können unter inflammatorischen Bedingungen oder durch chemotaktische Stimulation Granulozyten durch Metalloproteinasen L-Selektin von der Zelloberfläche abspalten [25,35,87]. Es ist also durchaus möglich, dass die erhöhten L-Selektin-Werte der CD11b<sup>high</sup>-Population des Lungenhomogenisates nur auf die Monozyten zurückzuführen sind. Die Untersuchung von L-Selektin auf Monozyten und Granulozyten nach einem Thoraxtrauma wäre daher ebenfalls ein Ansatzpunkt für weiterführende Studien und könnte durch eine veränderte durchflusszytometrische Auswertung der Zellen des Lungengewebes mit Darstellung der Monozyten als Einzelpopulation analysiert werden. Mit der Analyse der CD11b<sup>low</sup>-Population des Lungenhomogenisates (IMΦ) wurde deutlich, dass während der Differenzierung von Monozyten in Makrophagen die Expression von L-Selektin insgesamt herunterreguliert wird [58,96]. So waren nur zwischen 5% und 9% der interstitiellen Makrophagen L-Selektin-positiv. Dies unterstreicht die Rolle von L-Selektin auch als Marker für den Differenzierungsgrad von Monozyten.

Die AMΦ-Zellzahl war in nicht depletierten Tieren mit Thoraxtrauma deutlich erhöht. Es wurden also entweder vermehrt IMΦ in den Alveolarraum rekrutiert, oder es kam zu einer gesteigerten Proliferation der AMΦ selbst [79]. Dieser Effekt wurde in Studien zum Thoraxtrauma bisher hauptsächlich bei der Ratte beschrieben. Dort stiegen die Zellzahlen der AMΦ 24 h nach dem Trauma langsam an und erhöhten sich bis 48 h [146,144,143] oder sogar 72 h [145]. In einer Studie mit C3H/HeN-Mäusen wurden ebenfalls 24 h nach einem Thoraxtrauma mehr AMΦ festgestellt (Dr. Ulrike Niesler, persönliche Kommunikation). Dies steht allerdings im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier durchgeführten Studie zur Kinetik der Monozyten-Migration, bei der 24 h nach dem Trauma zwar leicht erhöhte, aber nicht signifikant gesteigerte AMΦ-Zellzahlen gemessen wurden. Warum das Thoraxtrauma trotz gleicher Rahmenbedingungen in der

Versuchsdurchführung in dieser Hinsicht nicht zu identischen Ergebnissen führte, bleibt jedoch offen. Eine mögliche Erklärung liefern die Ergebnisse der Proteinkonzentrationen in der BAL-F. Vergleicht man diese in beiden hier durchgeführten Studien, so war die Proteinkonzentration in der Studie zur Monozyten-Migration 24 h nach dem Trauma geringer als die der PBS-behandelten Tiere in dieser Studie. Es ist also möglich, dass das Thoraxtrauma im vorangegangenen Versuch tatsächlich nicht so stark ausgeprägt war und somit auch die Trauma-induzierten inflammatorischen Vorgänge geringfügiger ausfielen (z. B. der Anstieg der AM $\Phi$ -Zellzahlen). Bemerkenswerterweise wurde durch die Depletion der zirkulierenden Monozyten die Anzahl an AM $\Phi$  signifikant gesteigert. Das bedeutet, dass die intravenös verabreichten Clodronate-Liposomen die AM $\Phi$  primär nicht depletierten [15] und dass es trotz verringerten Nachschubs an Monozyten, die hauptsächlich der undifferenzierten Ly-6C<sup>high</sup>-Subpopulation angehörten, zu erhöhten AM $\Phi$ -Zellzahlen in der Lunge kam. Dies betraf sowohl die Kontroll- als auch die Traumatiere, wobei durch das Thoraxtrauma die AM $\Phi$ -Zellzahl noch einmal gesteigert wurde. Es ist also wahrscheinlich, dass vermehrt IM $\Phi$  in den Alveolarraum rekrutiert wurden. Dass diese Rekrutierung bereits bei Kontrolltieren ohne Thoraxtrauma auftrat, lässt auf einen deutlichen Einfluss der Depletion an sich, mit den damit verbundenen Veränderungen in der Zell-Homöostase und der Zytokinkonzentrationen schließen. Auch wenn beschrieben wurde, dass durch Clodronate-Liposomen apoptotisch gewordene Makrophagen keine erhöhten Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine abgeben [173], könnten doch die nicht depletierten zirkulierenden Zellpopulationen oder bereits aus dem Knochenmark ins Blut nachgewanderte Monozyten auf die veränderten Bedingungen reagieren und indirekt andere Zellpopulationen beeinflussen. Ein solch indirekter Einfluss wurde von Nakamura et al. beschrieben [106]. Allerdings wurden in jener Studie die AM $\Phi$  durch intratracheale Gabe der Clodronate-Liposomen depletiert und die Depletion führte nachfolgend zu einer erhöhten Leukozytenzahl. Obwohl diese Studie also in genau entgegengesetzter Form, wie die hier beschriebene, durchgeführt wurde, konnte ein vergleichbares Ergebnis bezüglich der beiden untersuchten Kompartimente „Zirkulation“ und „Alveole“ beobachtet werden. Diese sind zwar durch die Art der Liposomen-Applikation relativ unabhängig voneinander, scheinen aber trotzdem indirekt durch die Depletion beeinflussbar zu sein.

Für die Beurteilung, ob sich die Monozyten-Depletion positiv oder negativ auf die inflammatorischen Vorgänge nach dem Thoraxtrauma auswirkt, wurden die Proteinkonzentrationen in der BAL-F sowie die Konzentrationen verschiedener Entzündungsmarker und chemotaktisch wirksamer Zytokine lokal und systemisch analysiert.



Die in der BAL-F nachgewiesenen Gesamtmengen an Protein waren in nicht depletierten Versuchstieren nach dem Thoraxtrauma deutlich erhöht, als Zeichen einer zu diesem Untersuchungszeitpunkt noch immer bestehenden alveolokapillären Schrankenstörung. Dies wurde bereits in der Studie zur Kinetik der Monozyten-Migration festgestellt und wird von den dort erwähnten weiteren Studien zu diesem Thema untermauert [108,123]. Mit der Depletion der zirkulierenden Monozyten war die Proteinkonzentration in traumatisierten Tieren zwar noch immer im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht, jedoch zeigte sie sich signifikant niedriger als in Traumatieren nicht depletierter Versuchstiere. Durch die Monozyten-Depletion konnte die Stärke der pulmonalen Schrankenstörung also deutlich gemindert werden, was grundsätzlich eine positive Auswirkung auf den Heilungsverlauf erwarten lässt. Die Depletion von neutrophilen Granulozyten in einem Maus-Modell mit LPS-induzierter Lungenentzündung führte ebenfalls zur Reduktion der Proteinkonzentrationen in der BAL-F [69]. Eine direkte Depletion der AM $\Phi$  scheint hingegen die Menge an Protein in der BAL-F nicht zu verringern [108] oder, im Gegenteil, sogar zu erhöhen [1,162].

Die Konzentrationen von IL-6 waren in der BAL-F 24 h nach dem Thoraxtrauma in keiner der beiden Untersuchungsgruppen erhöht, was die Beschreibungen von IL-6 als frühen Marker für inflammatorische Vorgänge unterstützt [120,155]. Interessanterweise konnten hingegen im Plasma Monozyten-depletierter Tiere mit Thoraxtrauma deutlich gestiegene IL-6-Konzentrationen auch 24 h nach Trauma gemessen werden. Solche hohen Konzentrationen zu einem relativ späten Zeitpunkt wurden in keiner der bisherigen Studien zum Thoraxtrauma bei der Maus festgestellt. Dort war IL-6 im Plasma nur innerhalb der ersten Stunden nach dem Trauma erhöht und fiel bis 24 h nach der Lungenkontusion wieder auf normale Konzentrationen ab [71,108,120]. Durch die im Vorfeld depletierten Monozyten müssen also in der Zirkulation veränderte Bedingungen entstanden sein, die in Kombination mit dem Thoraxtrauma zur gesteigerten Abgabe von IL-6 geführt haben. Neben Endothelzellen [126] können auch neutrophile Granulozyten unter entzündlichen Bedingungen Produzenten von IL-6 sein [18,115]. Daher ist es wahrscheinlich, dass die im Blut depletierter Traumatiere vermehrt aufgetretenen Granulozyten für die erhöhten IL-6-Konzentrationen mit verantwortlich sind. Außerdem wurde beschrieben, dass IL-6 während akuter Entzündungen am Übergang zwischen früher Granulozyten-Rekrutierung und der darauf folgenden Rekrutierung von Monozyten maßgeblich beteiligt ist [70]. Es liegt daher nahe, dass die erhöhten IL-6-Konzentrationen auf diesen Übergang hinweisen. Auch die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Plasma unterstützen die These veränderter Bedingungen durch die Depletion der Monozyten. So konnten bereits in der Kontrollgruppe depletierter Tiere erhöhte IL-1 $\beta$ -Konzentrationen gemessen werden. Da IL-1 $\beta$  hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen freigesetzt wird [30],

sind die bereits aus dem Knochenmark ins Blut nachgewanderten Monozyten die wahrscheinlichste Quelle. Die Abgabe von IL-1 $\beta$  wird u. a. durch Zytokine wie TNF gesteigert [30]. Allerdings konnten im Plasma depletierter Versuchstiere keine Änderungen der TNF-Konzentrationen festgestellt werden, so dass die Induktion der IL-1 $\beta$ -Freisetzung ungeklärt bleibt. Überraschend war jedoch, dass durch das Thoraxtrauma die Ausschüttung von IL-1 $\beta$  auf das Niveau nicht depletierter Versuchstiere gesunken war. Dies könnte durch eine Hemmung der Caspase 1 hervorgerufen worden sein, die durch Spaltung das inaktive IL-1 $\beta$  in seine aktive Form überführt [94]. Da durch Caspase 1 auch Apoptose und Pyroptose (eine nicht-apoptotische Form des programmierten Zelltodes) in Zellen induziert werden kann [99], könnte somit die Hemmung der Caspase 1 zu einer verlängerten Lebensdauer der neu in die Zirkulation migrierten Monozyten führen. Gleichzeitig führen geringe IL-1 $\beta$ -Konzentrationen zu einer reduzierten pro-inflammatorischen Reaktion [29].

Die Ausschüttung von TGF- $\beta$ 1 war in Versuchstieren mit Thoraxtrauma ohne Depletion sowohl in der BAL-F als auch im Lungengewebe erhöht. Bezüglich der BAL-F deckt sich das mit den Ergebnissen zur Kinetik der Monozyten-Migration und einer Studie von Niesler et al. [108]. Mit der Monozyten-Depletion wurde in Traumatieren jedoch weniger TGF- $\beta$ 1 freigesetzt, was darauf hindeutet, dass die erhöhte Anzahl an AM $\Phi$  weniger TGF- $\beta$ 1 generierte. Da TGF- $\beta$ 1 eine Beteiligung an der Entstehung von Lungenödemen zugeschrieben wird [125], könnten geringere Konzentrationen die Prognose nach einem Thoraxtrauma verbessern. Gleichzeitig ist TGF- $\beta$ 1 aber auch ein für die Proliferation und Differenzierung von Makrophagen wichtiges Zytokin [85], so dass die geringeren Konzentrationen in depletierten Traumatieren eine Reduktion der lokalen Proliferation der AM $\Phi$  vermuten lassen. Dies unterstützt die Annahme, dass die erhöhten AM $\Phi$ -Zellzahlen durch eine vermehrte Rekrutierung von IM $\Phi$  entstanden sind. Diese Vermutung wird außerdem durch die in depletierten Traumatieren erhöhten Fractalkine-Konzentrationen untermauert. Fractalkine wird u. a. von Makrophagen produziert [78] und wirkt chemotaktisch auf Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten und Gewebsmakrophagen [97,188]. Da allerdings nach der Depletion ein allgemeiner Mangel an Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten herrschte, wurden über Fractalkine möglicherweise ausschließlich die IM $\Phi$  in die Alveole rekrutiert. Es scheint also, dass die AM $\Phi$  depletierter Tiere durch das Thoraxtrauma ein spezifisch auf die Chemotaxis von Monozyten und Makrophagen ausgerichtetes Profil entwickelten. Die Rekrutierung von Granulozyten in den Alveolarraum war offenbar unabhängig von der Depletion, denn trotz erhöhter KC-Konzentrationen in der BAL-F, konnten keine Unterschiede zwischen depletierten und nicht depletierten Traumatieren festgestellt werden. Diese Unabhängigkeit ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass KC

weniger von AM $\Phi$ , als vielmehr von Lungenepithelzellen abgegeben wird [12] und diese, zumindest hinsichtlich der Abgabe von KC, scheinbar nicht beeinflusst wurden.

Im Lungengewebe depletierter Traumatiere war nahezu kein TGF- $\beta$ 1 mehr nachweisbar. Diese massiv verminderten TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen werden vermutlich durch eine Kombination aus geringeren Zellzahlen von IM $\Phi$  (die vermehrt in die Alveolen rekrutiert wurden) und deren verminderter TGF- $\beta$ 1-Ausschüttung entstanden sein. Es scheint also, dass die IM $\Phi$  nach der Depletion durch das Thoraxtrauma in ähnlicher Weise wie die AM $\Phi$  beeinflusst wurden, so dass auch diese Zellen einer möglichen TGF- $\beta$ 1-vermittelten Ödembildung [125] mit Verschlechterung des Zustandes entgegenwirken können. Gleichzeitig wurde, vergleichbar mit der BAL-F, auch im Lungengewebe durch die Depletion die Ausschüttung Monozyten-rekrutierender Zytokine, in diesem Fall MCP-1, erhöht. Dass die MCP-1-Konzentration allerdings bereits in Kontrolltieren auf das Niveau traumatisierter, nicht depletierter Versuchstiere gestiegen war, macht die durch die Depletion verursachte Störung des regulären zellulären Umsatzes der Lunge deutlich. Der reduzierte Nachschub an Monozyten sollte also durch eine erhöhte Ausschüttung von MCP-1 wieder kompensiert werden. Mit dem Thoraxtrauma wurden die MCP-1-Konzentrationen sogar noch weiter erhöht, denn durch die Auswanderung der IM $\Phi$  in den Alveolarraum fehlten dem Lungengewebe diese Zellen zusätzlich. So sind für die Freisetzung von MCP-1 aufgrund der geringen IM $\Phi$ -Anzahl wahrscheinlich die Lungenepithelzellen verantwortlich [145]. Diese können offenbar selektiv die Chemotaxis bestimmter Zellpopulationen beeinflussen, denn obwohl durch erhöhte MCP-1-Konzentrationen scheinbar mehr Monozyten in die Lunge rekrutiert werden sollten, war die Ausschüttung von KC für die Rekrutierung von Granulozyten durch die Depletion unverändert. Aber auch von Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten wird eine gesteigerte Ausschüttung von MCP-1 beschrieben [147], so dass die im Gefäßsystem der Lunge vorhandenen Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten zu den gestiegenen MCP-1-Konzentrationen beigetragen haben könnten. Somit wären die Monozyten in der Lage, selbstregulierend in die Rekrutierung weiterer Monozyten in die Lunge einzugreifen. Nach der Depletion war die MCP-1-vermittelte Rekrutierung von Monozyten auch im Plasma erhöht, was auf das Bestreben der schnellen Substitution des Monozyten-Pools im Blut hindeutet. Allerdings führte das Thoraxtrauma hier nicht zu einer weiteren Steigerung der MCP-1-Konzentrationen, so dass vermutet werden kann, dass die Monozyten-Rekrutierung in depletierten Tieren hauptsächlich auf den Ort des Traumas gerichtet ist. Vergleichbare Ergebnisse wurden in Mäusen mit einem Ischämie/Reperfusionsschaden der Niere gefunden [40]. Dort führte die intravenöse Verabreichung der Clodronate-Liposomen ebenfalls zu erhöhten MCP-1-Konzentrationen in der Zirkulation.

Der Einfluss eines stumpfen Thoraxtraumas auf die Zellen der Milz wurde bezüglich der Zytokinfreisetzung bisher überwiegend als suppressiv beschrieben [71,121]. So konnten in Milzmakrophagen und Splenozyten 24 h nach dem Trauma reduzierte Konzentrationen von TNF, IL-10, IL-12 oder INF- $\gamma$  gemessen werden [71,121]. Dies steht im Gegensatz zu den hier vor allem in Milzmakrophagen nicht depletierter Versuchstiere festgestellten Zytokinkonzentrationen, die durch das Trauma deutlich erhöht (TNF, IL-12) oder im Vergleich zur Kontrolle unverändert waren (IL-10). Die Splenozyten nicht depletierter Mäuse zeigten durch das Trauma insgesamt keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Freisetzung von Zytokinen. Da in den früheren Studien allerdings C3H/HeN-Mäuse verwendet wurden, könnte das die Ursache für die kontroversen Ergebnisse sein. So wurden z. B. in der BAL-F *Mycoplasma pulmonis*-infizierter C57BL/6- und C3H/HeN-Mäuse deutliche Unterschiede in der Zytokinfreisetzung festgestellt [39]. Eine andere Möglichkeit wäre, dass in der hier vorliegenden Arbeit die Versuchstiere vor der Applikation des Thoraxtraumas oder der Kontrollbehandlung PBS injiziert bekamen. Die Tiere früherer Studien waren hingegen zum Zeitpunkt der Trauma-Applikation nicht vorbehandelt. Durch die Verabreichung des PBS in Kombination mit dem Trauma könnten die Milzmakrophagen aktiviert und zu höherer Ausschüttung von Zytokinen angeregt worden sein. Bei der Bestimmung der von depletierten Versuchstieren abgegebenen Zytokinkonzentrationen wurde deutlich, dass die Clodronate-Liposomen grundsätzlich die Funktion von Milzmakrophagen und Splenozyten stark beeinflussen. Vor allem die Konzentrationen der von Milzmakrophagen abgegebenen Mediatoren waren sowohl in der Trauma- als auch in der Kontrollgruppe deutlich reduziert. Dies kann auf die intravenöse Applikation der Clodronate-Liposomen zurückgeführt werden, die also nicht nur zur Depletion der Monozyten des Blutes führte, sondern auch zur Depletion der Milzmakrophagen [139,172]. Die messbaren, aber geringen Zytokinkonzentrationen werden dabei vermutlich von den wenigen nicht depletierten Milzmakrophagen aus der weißen Pulpa der Milz stammen, von der van Rooijen et al. beschrieben haben, dass diese im Gegensatz zu den Makrophagen der Marginalzone und der roten Pulpa weniger effektiv depletiert werden [171]. Die Autoren beschrieben außerdem eine Repopulation der Milz mit Gewebemakrophagen frühestens 4 d nach der Depletion, so dass zum hier untersuchten Zeitpunkt (42 h nach der Depletion) noch keine neuen Makrophagen in der Milz zu erwarten waren. Auch die Splenozyten wurden durch die Clodronate-Liposomen in ihrer Zytokinausschüttung beeinflusst. Die Freisetzung von IL-2 und IL-4 war dabei allein durch die Depletion supprimiert und durch das Thoraxtrauma nicht weiter verändert. Da IL-2 von Typ-1 T-Helferzellen und IL-4 von Typ-2 T-Helferzellen generiert werden [104], deutet dies auf eine grundsätzliche Beeinträchtigung beider T-Helferzell-Typen hin. Interessanterweise konnten aber in depletierten Traumatieren tendenziell höhere IL-12-

Konzentrationen in den Kulturüberständen gemessen werden. Da bekannt ist, dass IL-12 ein wichtiger Induktor für die Produktion von IFN- $\gamma$  ist [57], könnte das die sonst durch die Depletion reduzierten, aber durch das Thoraxtrauma wieder erhöhten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen erklären. Gleichzeitig wird die IL-12-Produktion durch IL-10 gehemmt [6]. In Traumatieren ist jedoch die IL-10-Konzentration deutlich verringert, so dass die hemmende Funktion auf IL-12 vermindert ist und dessen Konzentrationen somit ansteigen können. Zusammenfassend wird die insgesamt eher supprimierende Wirkung der Monozyten-Depletion auf die Zytokinausschüttung der Splenozyten also durch das Thoraxtrauma teilweise wieder aufgehoben. In einer Studie zur Rolle der Makrophagen in T-Zell-vermitteltem Diabetes konnte nachgewiesen werden, dass sich durch die Makrophagen-Depletion T-Zellen nicht mehr in den zytotoxischen Typ differenzieren, der sonst für die Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas verantwortlich ist [67]. Es wurde also auch dort eine Beeinträchtigung der T-Zellen durch die Depletion hervorgerufen, die sich allerdings nur in Typ-1 T-Helferzellen hemmend auswirkte. So waren die Konzentrationen von IFN- $\gamma$  sowie die mRNA-Expression von IL-12 signifikant reduziert, wohingegen die Immunreaktion der Typ-2 T-Helferzellen gesteigert wurde. Eine zusätzliche Verabreichung von IL-12 führte zur Aufhebung des protektiven Effektes der Makrophagen-Depletion, was auch die in der hier vorliegenden Studie beobachtete teilweise Reduktion der supprimierenden Wirkung der Monozyten-Depletion durch die höheren IL-12-Konzentrationen in Traumatieren erklären kann.

### 5.3. Schlussfolgerung

Die Markierung zirkulierender Monozyten mit Fluoreszenzfarbstoff-gefärbten Liposomen ermöglichte es, deren Wanderungsvorgänge weitgehend nachzuvollziehen. Die Monozyten wanderten demnach unabhängig vom Thoraxtrauma als Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten ins Knochenmark zurück, um sich dort zu Ly-6C<sup>int</sup>- und Ly-6C<sup>low</sup>-Monozyten-Subpopulationen umzuwandeln, die ihrerseits wieder in die Zirkulation zurückkehren. Gleichzeitig wurden sie mit dem Blutstrom zur Lunge transportiert und trugen dort zur Aufrechterhaltung der Zell-Homöostase bei. Eine vermehrte Einwanderung von Monozyten und die Beteiligung einzelner Subpopulationen durch das Trauma konnte allerdings nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Jedoch waren IM $\Phi$  und AM $\Phi$  zu lokaler Proliferation befähigt, die der Substitution des Makrophagen-Pools in der Alveole dienen. Trotz der posttraumatisch deutlich erhöhten Zytokinkonzentrationen in der BAL-F blieben die Monozyten des Blutes und des Knochenmarks durch das Thoraxtrauma unbeeinflusst. Dies wurde auch nach der Depletion zirkulierender Monozyten festgestellt, denn obwohl die Monozyten-Zellzahlen insgesamt deutlich reduziert werden konnten,

wurden durch das Thoraxtrauma keine Veränderungen in der Zusammensetzung der Subpopulationen und der Expression von L-Selektin auf den Monozyten nachgewiesen. In der Lunge wurden nach dem Trauma speziell auf die Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen ausgerichtete Chemokinmuster freigesetzt. In der Zirkulation wurden dagegen vermehrt auf Granulozyten chemotaktisch wirkende Zytokine gemessen. Die inflammatorische Reaktion in der Lunge wurde nach einem Thoraxtrauma durch die Monozyten-Depletion tendenziell reduziert. Systemisch war dieser Effekt allerdings nicht eindeutig ausgeprägt.

Die hier gewonnenen Ergebnisse machen deutlich, dass Monozyten zwar eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen nach einem stumpfen Thoraxtrauma einnehmen, aber trotz allem, gerade im Hinblick auf zukünftige therapeutische Möglichkeiten, weitere Untersuchungen nötig sind.

## 6. Zusammenfassung

Das stumpfe Thoraxtrauma ist eine bei Unfällen häufig auftretende Verletzung, die vor allem bei Patienten mit Mehrfachverletzungen zu einer Verschlechterung der Prognose führt. Dabei führt das Thoraxtrauma nicht nur zu einer Einschränkung der respiratorischen Funktion der Lunge, sondern aktiviert auch das Immunsystem, so dass es lokal und systemisch zu einer inflammatorischen Reaktion mit erhöhter Ausschüttung von Zytokinen kommt. Gleichzeitig werden chemotaktisch Granulozyten aber auch Monozyten aus der Zirkulation in die Lunge rekrutiert. Da die Rolle der Monozyten im Entzündungsgeschehen nach einem stumpfen Thoraxtrauma bisher nicht vollständig untersucht wurde, sollte die zeitliche Kinetik der Monozyten-Migration und die Beteiligung verschiedener Monozyten-Subpopulationen analysiert werden. Außerdem wurde untersucht, ob die vermehrt in die Lunge einwandernden Monozyten die Entzündungsreaktion negativ beeinflussen.

Zur Untersuchung der Monozyten-Migration wurden die zirkulierenden Monozyten von C57BL/6-Mäusen mit Fluoreszenzfarbstoff (DiD)-gefärbten Liposomen markiert. Nach 24 h wurde ein stumpfes Thoraxtrauma durch eine auf den Thorax ausgerichtete Druckwelle induziert, oder die Kontrollbehandlung (gleiche Manipulationen, ohne Druckschädigung) durchgeführt. Nach weiteren 2 h, 24 h und 48 h wurde der Anteil markierter Monozyten in Blut, Knochenmark und Lunge sowie die Differenzierung von Monozyten in interstitielle Makrophagen (IM $\Phi$ ) und Alveolarmakrophagen (AM $\Phi$ ) analysiert. Die Einteilung der Monozyten in Subpopulationen erfolgte anhand der Lymphocyte antigen 6C (Ly-6C)-Expression und die Beurteilung der inflammatorischen Reaktionen in der Lunge durch Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BAL-F). Für die Untersuchungen zum Beitrag der Monozyten an der posttraumatischen Entzündungsreaktion wurden die zirkulierenden Monozyten durch intravenöse Verabreichung von Clodronate-Liposomen depletiert und 18 h später das Thoraxtrauma oder die Kontrollbehandlung appliziert. Nach weiteren 24 h wurden die Auswirkungen der Depletion auf Monozyten im Blut, Knochenmark und Lungengewebe durchflusszytometrisch analysiert sowie die lokale und systemische Zytokinfreisetzung bestimmt.

Mit DiD-Liposomen markierte Monozyten konnten zu allen Untersuchungszeitpunkten in Blut, Knochenmark und Lunge nachgewiesen werden, wobei deren Anteil, mit Ausnahme der Traumatiere in der Lunge, die früh nach dem Trauma im Vergleich zur Kontrolle reduzierte Monozyten-Anteile zeigten, durch ein Thoraxtrauma nicht verändert wurde. 24 h und 48 h nach Trauma waren die Anteile DiD-positiver IM $\Phi$  und AM $\Phi$  erhöht. Die Zusammensetzung der 3 Monozyten-Subpopulationen veränderte sich in Blut und Knochenmark über die Zeit, aber nicht durch das Thoraxtrauma. In der Lunge konnten keine Subpopulationen unterschieden werden. Die Protein- und Zytokinkonzentrationen

waren früh nach dem Trauma erhöht und fielen bis 48 h wieder auf Kontrollniveau ab. Das bedeutet, dass unter physiologischen Bedingungen die Monozyten zwischen Blut, Knochenmark und der Lunge migrierten. Im Knochenmark differenzierten sie sich zu „reiferen“ Monozyten-Subpopulationen und in der Lunge über das Zwischenstadium der IM $\Phi$  zu AM $\Phi$ . Sie dienten damit der Aufrechterhaltung der Zell-Homöostase und diese wurde offenbar bezüglich der zirkulierenden Monozyten durch das Thoraxtrauma nicht beeinflusst. Die in der Lunge früh reduzierten Monozyten-Anteile ließen keine Schlüsse auf eine verstärkte Einwanderung in die Lunge zu. Die ortsständigen Lungenmakrophagen konnten durch lokale Proliferation unabhängig von den Monozyten auf das Trauma reagieren. Die Zytokinkonzentrationen in der BAL-F deuten auf eine früh nach dem Thoraxtrauma stark regulierte Immunantwort hin, in der sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine gleichzeitig hochreguliert wurden. Das schnelle Abklingen der Entzündungsreaktion lässt die verstärkte Differenzierung eines regenerativen Makrophagen-Phänotyps vermuten.

Durch die Clodronate-Liposomen wurden die zirkulierenden Monozyten und Milzmakrophagen effektiv depletiert. Im Blut depletierter Tiere befanden sich hauptsächlich Monozyten mit hoher Ly-6C-Expression und durch ein Thoraxtrauma stiegen die Granulozyten-Zellzahlen signifikant an. Die Monozyten in Blut und Knochenmark sowie die Zusammensetzung der Subpopulationen waren durch das Thoraxtrauma nahezu unbeeinflusst. In der Lunge depletierter Traumatiere wurden geringere Proteinkonzentration und gesunkene Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)-Konzentrationen gemessen. Lokal (BAL, Lunge) und systemisch (Plasma) kam es zu erhöhten Konzentrationen chemotaktisch wirksamer Zytokine. Die Zytokinfreisetzung von Splenozyten depletierter Kontrolltiere war gehemmt, durch ein Thoraxtrauma stiegen die Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine allerdings wieder an. Die Monozyten-Depletion führte also zu einer gemilderten inflammatorischen Reaktion in der Lunge (verringerte Schrankenstörung, gesunkene Konzentrationen des ödembildungsfördernden TGF- $\beta$ 1), in die durch das Thoraxtrauma selektiv verstärkt Monozyten ins Interstitium und interstitiellen Makrophagen in die Alveole rekrutiert wurden. In der Zirkulation war durch die Depletion die Rekrutierung von Monozyten, unabhängig vom Thoraxtrauma, ebenfalls erhöht und resultierte in einer Auswanderung von Ly-6C<sup>high</sup>-Monozyten aus dem Knochenmark. Gleichzeitig wurden durch ein Thoraxtrauma mehr Granulozyten ins Blut rekrutiert, die scheinbar den Wendepunkt zu einer gesteigerten Monozyten-Migration förderten. Die in Splenozyten hervorgerufene Hemmung der Zytokinfreisetzung wurde durch das Trauma zu Gunsten einer pro-inflammatorischen Reaktion verschoben, so dass weder in der Milz noch im Plasma eine deutlich positive Wirkung der Monozyten-Depletion festgestellt werden konnte.



## 7. Literaturverzeichnis

1. Altmann C, Andres-Hernando A, McMahan RH, Ahuja N, He Z, Rivard CJ, Edelstein CL, Barthel L, Janssen WJ, Faubel S: Macrophages mediate lung inflammation in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F421-F432 (2012)
2. Andreutti D GGNP: Early granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression by alveolar inflammatory cells during bleomycin-induced rat lung fibrosis. *Lab Invest* 78: 1493-1502 (1998)
3. Armstrong DA, Major JA, Chudyk A, Hamilton TA: Neutrophil chemoattractant genes KC and MIP-2 are expressed in different cell populations at sites of surgical injury. *J Leukoc Biol* 75: 641-648 (2004)
4. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van RN, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B: Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204: 1057-1069 (2007)
5. Ashcroft GS: Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes and infection* 1: 1275-1282 (1999)
6. Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G: Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol* 160: 5936-5944 (1998)
7. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F: Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317: 666-670 (2007)
8. 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)
9. Bashyam H: Th1/Th2 cross-regulation and the discovery of IL-10. *J Exp Med* 204: 237-237 (2007)
10. Baumann H, Gauldie J: The acute phase response. *Immunol Today* 15: 74-80 (1994)
11. Beck-Schimmer B, Schwendener R, Pasch T, Reyes L, Booy C, Schimmer RC: Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. *Respir Res* 6: 61-74 (2005)
12. Bem RA, Farnand AW, Wong V, Koski A, Rosenfeld ME, van Rooijen N, Frevert CW, Martin TR, Matute-Bello G: Depletion of resident alveolar macrophages does not prevent Fas-mediated lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L314-L325 (2008)
13. Bhatia M, Zemans RL, Jeyaseelan S: Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46: 566-572 (2012)
14. Bozic CR, Kolakowski LF, Jr., Gerard NP, Garcia-Rodriguez C, von Uexkull-Guldenband C, Conklyn MJ, Breslow R, Showell HJ, Gerard C: Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC. *J Immunol* 154: 6048-6057 (1995)

15. Buiting AM, van RN: Liposome mediated depletion of macrophages: an approach for fundamental studies. *J Drug Target* 2: 357-362 (1994)
16. Buttke TM, Sandstrom PA: Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15: 7-10 (1994)
17. Byrne A, Reen DJ: Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol* 168: 1968-1977 (2002)
18. Cassatella MA: The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 16: 21-26 (1995)
19. Chanteux H, Guisset AC, Pilette C, Sibille Y: LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKinases- and Sp1-dependent mechanisms. *Respir Res* 8: 71- (2007)
20. Chawda MN, Hildebrand F, Pape HC, Giannoudis PV: Predicting outcome after multiple trauma: which scoring system? *Injury* 35: 347-358 (2004)
21. Choi JC, Jung JW, Kwak HW, Song JH, Jeon EJ, Shin JW, Park IW, Choi BW, Kim JY: Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) augments acute lung injury via its neutrophil priming effects. *J Korean Med Sci* 23: 288-295 (2008)
22. Claassen E: Post-formation fluorescent labelling of liposomal membranes. In vivo detection, localisation and kinetics. *J Immunol Methods* 147: 231-240 (1992)
23. Cohn S, DuBose J: Pulmonary Contusion: An Update on Recent Advances in Clinical Management. *World Journal of Surgery* 34: 1959-1970 (2010)
24. Colditz IG, Schneider MA, Pruenster M, Rot A: Chemokines at large: in-vivo mechanisms of their transport, presentation and clearance. *Thromb Haemost* 97: 688-693 (2007)
25. Dadfar E, Lundahl J, Fernvik E, Nopp A, Hylander B, Jacobson SH: Leukocyte CD11b and CD62l expression in response to interstitial inflammation in CAPD patients. *Perit Dial Int* 24: 28-36 (2004)
26. Dale DC, Boxer L, Liles WC: The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112: 935-945 (2008)
27. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 29: 313-326 (2009)
28. Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie: Trauma Register DGU - Jahresbericht 2013. 1-29 (2013)
29. Dinarello CA: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87: 2095-2147 (1996)
30. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW: Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov* 11: 633-652 (2012)
31. Dokka S, Malanga CJ, Shi X, Chen F, Castranova V, Rojanasakul Y: Inhibition of endotoxin-induced lung inflammation by interleukin-10 gene transfer in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L872-L877 (2000)

32. Drevets DA, Dillon MJ, Schawang JS, van RN, Ehrchen J, Sunderkotter C, Leenen PJ: The Ly-6Chigh monocyte subpopulation transports *Listeria monocytogenes* into the brain during systemic infection of mice. *J Immunol* 172: 4418-4424 (2004)
33. Drevets DA, Schawang JE, Mandava VK, Dillon MJ, Leenen PJ: Severe *Listeria monocytogenes* infection induces development of monocytes with distinct phenotypic and functional features. *J Immunol* 185: 2432-2441 (2010)
34. Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, Schlesinger RB: Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations. *Toxicol Sci* 55: 24-35 (2000)
35. Enders G, Brooks W, von JN, Lehn N, Bayerdorffer E, Hatz R: Expression of adhesion molecules on human granulocytes after stimulation with *Helicobacter pylori* membrane proteins: comparison with membrane proteins from other bacteria. *Infect Immun* 63: 2473-2477 (1995)
36. Everson MP, Chandler DB: Changes in distribution, morphology, and tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion of alveolar macrophage subpopulations during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 140: 503-512 (1992)
37. Eyal FG, Hamm CR, Parker JC: Reduction in alveolar macrophages attenuates acute ventilator induced lung injury in rats. *Intensive Care Med* 33: 1212-1218 (2007)
38. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM: Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, and PAF. *J Clin Invest* 101: 890-898 (1998)
39. Faulkner CB, Simecka JW, Davidson MK, Davis JK, Schoeb TR, Lindsey JR, Everson MP: Gene expression and production of tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1, interleukin 6, and gamma interferon in C3H/HeN and C57BL/6N mice in acute *Mycoplasma pulmonis* disease. *Infect Immun* 63: 4084-4090 (1995)
40. Ferenbach DA, Sheldrake TA, Dhaliwal K, Kipari TM, Marson LP, Kluth DC, Hughes J: Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Int* 82: 928-933 (2012)
41. Fernandez IE, Eickelberg O: The impact of TGF- $\beta$  on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc* 9: 111-116 (2012)
42. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147: 3815-3822 (1991)
43. Franke-Ullmann G, Pfortner C, Walter P, Steinmüller C, Lohmann-Matthes ML, Kobzik L: Characterization of murine lung interstitial macrophages in comparison with alveolar macrophages in vitro. *J Immunol* 157: 3097-3104 (1996)
44. Frevert CW, Huang S, Danaee H, Paulauskis JD, Kobzik L: Functional characterization of the rat chemokine KC and its importance in neutrophil recruitment in a rat model of pulmonary inflammation. *J Immunol* 154: 335-344 (1995)
45. Gaffen SL, Liu KD: Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 28: 109-123 (2004)

46. Gaillard M, Herve C, Mandin L, Raynaud P: Mortality prognostic factors in chest injury. *J Trauma* 30: 93-96 (1990)
47. Garcia-Ramallo E, Marques T, Prats N, Beleta J, Kunkel SL, Godessart N: Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *J Immunol* 169: 6467-6473 (2002)
48. Gebhard F, Kelbel MW, Strecker W, Kinzl L, Brückner UB: Chest trauma and its impact on the release of vasoactive mediators. *Shock* 7: 313-317 (1997)
49. Geissmann F, Jung S, Littman DR: Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* 19: 71-82 (2003)
50. Gelinas L, Falkenham A, Oxner A, Sopol M, Legare JF: Highly purified human peripheral blood monocytes produce IL-6 but not TNFalpha in response to angiotensin II. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 12: 295-303 (2011)
51. Giamarellos-Bourboulis EJ, Routsis C, Plachouras D, Markaki V, Raftogiannis M, Zervakis D, Koussoulas V, Orfanos S, Kotanidou A, Armaganidis A, Roussos C, Giamarellou H: Early apoptosis of blood monocytes in the septic host: is it a mechanism of protection in the event of septic shock? *Crit Care* 10: R76- (2006)
52. Giorgio S: Macrophages: plastic solutions to environmental heterogeneity. *Inflamm Res* 62: 835-843 (2013)
53. Gordon S: The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1: S9-17 (2007)
54. Gordon S, Taylor PR: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-964 (2005)
55. Griffin JD, Spertini O, Ernst TJ, Belvin MP, Levine HB, Kanakura Y, Tedder TF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J Immunol* 145: 576-584 (1990)
56. Hamilton JA, Anderson GP: GM-CSF Biology. *Growth Factors* 22: 225-231 (2004)
57. Hamza T, Barnett JB, Li B: Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int J Mol Sci* 11: 789-806 (2010)
58. Haugen TS, Skjonsberg OH, Nakstad B, Lyberg T: Modulation of adhesion molecule profiles on alveolar macrophages and blood leukocytes. *Respiration* 66: 528-537 (1999)
59. Hoppstädter J, Diesel B, Zarbock R, Breinig T, Monz D, Koch M, Meyerhans A, Gortner L, Lehr CM, Huwer H, Kiemer A: Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. *Respir Res* 11: 124- (2010)
60. Hoth JJ, Martin RS, Yoza BK, Wells JD, Meredith JW, McCall CE: Pulmonary contusion primes systemic innate immunity responses. *J Trauma* 67: 14-21 (2009)
61. Hoth JJ, Wells JD, Hiltbold EM, McCall CE, Yoza BK: Mechanism of neutrophil recruitment to the lung after pulmonary contusion. *Shock* 35: 604-609 (2011)

62. Huang FF, Barnes PF, Feng Y, Donis R, Chroneos ZC, Idell S, Allen T, Perez DR, Whitsett JA, Dunussi-Joannopoulos K, Shams H: GM-CSF in the lung protects against lethal influenza infection. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 259-268 (2011)
63. Huynh ML, Fadok VA, Henson PM: Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 109: 41-50 (2002)
64. 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)
65. Javid K, Rahman A, Anwar KN, Frey RS, Minshall RD, Malik AB: Tumor necrosis factor-alpha induces early-onset endothelial adhesivity by protein kinase C-zeta-dependent activation of intercellular adhesion molecule-1. *Circ Res* 92: 1089-1097 (2003)
66. Johnston LK, Rims CR, Gill SE, McGuire JK, Manicone AM: Pulmonary macrophage subpopulations in the induction and resolution of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47: 417-426 (2012)
67. Jun HS, Yoon CS, Zbytnik L, van RN, Yoon JW: The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 189: 347-358 (1999)
68. Kamps JA, Morselt HW, Swart PJ, Meijer DK, Scherphof GL: Massive targeting of liposomes, surface-modified with anionized albumins, to hepatic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11681-11685 (1997)
69. Kantrow SP, Shen Z, Jagneaux T, Zhang P, Nelson S: Neutrophil-mediated lung permeability and host defense proteins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L738-L745 (2009)
70. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C: IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 24: 25-29 (2003)
71. Knöferl MW, Liener UC, Perl M, Brückner UB, Kinzl L, Gebhard F: Blunt chest trauma induces delayed splenic immunosuppression. *Shock* 22: 51-56 (2004)
72. Knöferl MW, Liener UC, Seitz DH, Perl M, Brückner UB, Kinzl L, Gebhard F: Cardiopulmonary, histological, and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. *Shock* 19: 519-525 (2003)
73. Knudsen E, Benestad HB, Seierstad T, Iversen PO: Macrophages in spleen and liver direct the migration pattern of rat neutrophils during inflammation. *Eur J Haematol* 73: 109-122 (2004)
74. Knudsen E, Iversen PO, van RN, Benestad HB: Macrophage-dependent regulation of neutrophil mobilization and chemotaxis during development of sterile peritonitis in the rat. *Eur J Haematol* 69: 284-296 (2002)
75. Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, Strieter RM: Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 90: 772-779 (1992)

76. Kubota Y, Iwasaki Y, Harada H, Yokomura I, Ueda M, Hashimoto S, Nakagawa M: Role of alveolar macrophages in *Candida*-induced acute lung injury. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 1258-1262 (2001)
77. Lagasse E, Weissman IL: Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J Immunol Methods* 197: 139-150 (1996)
78. Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, Lira SA, Weissman IL, Weber C, Jung S: CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 113: 963-972 (2009)
79. Landsman L, Jung S: Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 179: 3488-3494 (2007)
80. Landsman L, Varol C, Jung S: Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol* 178: 2000-2007 (2007)
81. Larson RS, Springer TA: Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 114: 181-217 (1990)
82. Lee PY, Li Y, Kumagai Y, Xu Y, Weinstein JS, Kellner ES, Nacionales DC, Butfiloski EJ, van RN, Akira S, Sobel ES, Satoh M, Reeves WH: Type I interferon modulates monocyte recruitment and maturation in chronic inflammation. *Am J Pathol* 175: 2023-2033 (2009)
83. Leenen PJ, Melis M, Slieker WA, Van EW: Murine macrophage precursor characterization. II. Monoclonal antibodies against macrophage precursor antigens. *Eur J Immunol* 20: 27-34 (1990)
84. Leenen PJ, Radosevic K, Voerman JS, Salomon B, van RN, Klatzmann D, Van EW: Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J Immunol* 160: 2166-2173 (1998)
85. Letterio JJ, Roberts AB: Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 16: 137-161 (1998)
86. Lewinsohn DM, Bargatze RF, Butcher EC: Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes. *J Immunol* 138: 4313-4321 (1987)
87. Ley K, Gaehtgens P, Fennie C, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD: Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* 77: 2553-2555 (1991)
88. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA: Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24: 99-146 (2006)
89. Liener UC, Knöferl MW, Sträter J, Barth TF, Pauser EM, Nüssler AK, Kinzl L, Brückner UB, Gebhard F: Induction of apoptosis following blunt chest trauma. *Shock* 20: 511-516 (2003)
90. Liener UC, Perl M, Huber-Lang MS, Seitz DH, Brückner UB, Gebhard F, Knöferl MW: Is the function of alveolar macrophages altered following blunt chest trauma? *Langenbecks Arch Surg* 396: 251-259 (2010)

91. Lin SL, Castano AP, Nowlin BT, Lupper ML, Jr., Duffield JS: Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *J Immunol* 183: 6733-6743 (2009)
92. MacLean JA, Xia W, Pinto CE, Zhao L, Liu HW, Kradin RL: Sequestration of inhaled particulate antigens by lung phagocytes. A mechanism for the effective inhibition of pulmonary cell-mediated immunity. *Am J Pathol* 148: 657-666 (1996)
93. Mann BS, Chung KF: Blood neutrophil activation markers in severe asthma: lack of inhibition by prednisolone therapy. *Respir Res* 7: 59- (2006)
94. Martinon F, Burns K, Tschopp J: The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10: 417-426 (2002)
95. Matsushima K, Terashima Y, Toda E, Shand F, Ueha S: Review article: Chemokines in inflammatory and immune diseases. *Inflammation and Regeneration* 31: 11-22 (2011)
96. Maus U, Herold S, Muth H, Maus R, Ermert L, Ermert M, Weissmann N, Rosseau S, Seeger W, Grimminger F, Lohmeyer J: Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L58-L68 (2001)
97. McComb JG, Ranganathan M, Liu XH, Pilewski JM, Ray P, Watkins SC, Choi AM, Lee JS: CX3CL1 up-regulation is associated with recruitment of CX3CR1+ mononuclear phagocytes and T lymphocytes in the lungs during cigarette smoke-induced emphysema. *Am J Pathol* 173: 949-961 (2008)
98. McDonald PP, Fadok VA, Bratton D, Henson PM: Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol* 163: 6164-6172 (1999)
99. McIlwain DR, Berger T, Mak TW: Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a008656- (2013)
100. Miller PR, Croce MA, Bee TK, Qaisi WG, Smith CP, Collins GL, Fabian TC: ARDS after pulmonary contusion: accurate measurement of contusion volume identifies high-risk patients. *J Trauma* 51: 223-228 (2001)
101. Misawa R, Kawagishi C, Watanabe N, Kobayashi Y: Infiltration of neutrophils following injection of apoptotic cells into the peritoneal cavity. *Apoptosis* 6: 411-417 (2001)
102. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765 (2001)
103. Morisaki H, Aoyama Y, Shimada M, Ochiai R, Takeda J: Leucocyte distribution during sevoflurane anaesthesia. *Br J Anaesth* 80: 502-503 (1998)
104. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-2357 (1986)
105. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ: The healing myocardium sequentially mobilizes

- two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204: 3037-3047 (2007)
106. Nakamura T, Abu-Dahab R, Menger MD, Schafer U, Vollmar B, Wada H, Lehr CM, Schafers HJ: Depletion of alveolar macrophages by clodronate-liposomes aggravates ischemia-reperfusion injury of the lung. *J Heart Lung Transplant* 24: 38-45 (2005)
  107. Nast-Kolb D, Aufmkolk M, Rucholtz S, Obertacke U, Waydhas C: Multiple organ failure still a major cause of morbidity but not mortality in blunt multiple trauma. *J Trauma* 51: 835-841 (2001)
  108. Niesler U, Palmer A, Fröba JS, Braumüller ST, Zhou S, Gebhard F, Knöferl MW, Seitz DH: Role of alveolar macrophages in the regulation of local and systemic inflammation after lung contusion. *J Trauma Acute Care Surg* 76: 386-393 (2014)
  109. Noel JG, Osterburg A, Wang Q, Guo X, Byrum D, Schwemberger S, Goetzman H, Caldwell CC, Ogle CK: Thermal injury elevates the inflammatory monocyte subpopulation in multiple compartments. *Shock* 28: 684-693 (2007)
  110. O'Dea KP, Wilson MR, Dokpesi JO, Wakabayashi K, Tatton L, van RN, Takata M: Mobilization and margination of bone marrow Gr-1high monocytes during subclinical endotoxemia predisposes the lungs toward acute injury. *J Immunol* 182: 1155-1166 (2009)
  111. Obertacke U, Redl H, Schlag G, Schmit-Neuerburg KP: Lokale und systemische Reaktionen nach Lungenkontsion. *Hefte zu Der Unfallchirurg* 240: (1994)
  112. Ocalan K, Solak O, Esme H, Sirmali M, Dilek H, Oz G, Vurmaz A, Karaman A: Efficacy of budesonide and interleukin-10 in an experimental rat model with isolated bilateral pulmonary contusion created by blunt thoracic trauma. *Eur J Cardiothorac Surg* 43: 163-167 (2013)
  113. Ohmori Y, Hamilton TA: IFN-gamma selectively inhibits lipopolysaccharide-inducible JE/monocyte chemoattractant protein-1 and KC/GRO/melanoma growth-stimulating activity gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 153: 2204-2212 (1994)
  114. Pagano RE, Weinstein JN: Interactions of liposomes with mammalian cells. *Annu Rev Biophys Bioeng* 7: 435-468 (1978)
  115. Palma C, Cassone A, Serbousek D, Pearson CA, Djeu JY: Lactoferrin release and interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor production by human polymorphonuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: relationship to growth inhibition of *Candida albicans*. *Infect Immun* 60: 4604-4611 (1992)
  116. Paludan SR: Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand J Immunol* 48: 459-468 (1998)
  117. Parihar A, Eubank TD, Doseff AI: Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *J Innate Immun* 2: 204-215 (2010)
  118. Peng Y, Latchman Y, Elkon KB: Ly6C(low) monocytes differentiate into dendritic cells and cross-tolerize T cells through PDL-1. *J Immunol* 182: 2777-2785 (2009)



119. Perl M, Chung CS, Perl U, Lomas-Neira J, de PM, Cioffi WG, Ayala A: Fas-induced pulmonary apoptosis and inflammation during indirect acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 591-601 (2007)
120. Perl M, Gebhard F, Braumüller S, Tauchmann B, Brückner UB, Kinzl L, Knöferl MW: The pulmonary and hepatic immune microenvironment and its contribution to the early systemic inflammation following blunt chest trauma. *Crit Care Med* 34: 1152-1159 (2006)
121. Perl M, Gebhard F, Brückner UB, Ayala A, Braumüller S, Büttner C, Kinzl L, Knöferl MW: Pulmonary contusion causes impairment of macrophage and lymphocyte immune functions and increases mortality associated with a subsequent septic challenge. *Crit Care Med* 33: 1351-1358 (2005)
122. Perl M, Gebhard F, Knöferl MW, Bachem M, Gross HJ, Kinzl L, Strecker W: The pattern of preformed cytokines in tissues frequently affected by blunt trauma. *Shock* 19: 299-304 (2003)
123. Perl M, Kieninger M, Huber-Lang MS, Gross HJ, Bachem MG, Braumüller S, Gebhard F, Ayala A, Knöferl MW: Divergent effects of activated neutrophils on inflammation, kupffer cell/splenocyte activation, and lung injury following blunt chest trauma. *Shock* 37: 210-218 (2012)
124. Perros F, Dorfmueller P, Souza R, Durand-Gasselini I, Godot V, Capel F, Adnot S, Eddahibi S, Mazmanian M, Fadel E, Herve P, Simonneau G, Emilie D, Humbert M: Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal* 29: 937-943 (2007)
125. Pittet JF, Griffiths MJD, Geiser T, Kaminski N, Dalton SL, Huang X, Brown LA, Gotwals PJ, Kotliansky VE, Matthay MA, Sheppard D: TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest* 107: 1537-1544 (2001)
126. Podor TJ, Jirik FR, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M: Human endothelial cells produce IL-6. Lack of responses to exogenous IL-6. *Ann N Y Acad Sci* 557: 374-385 (1989)
127. Puig NR, Ferrero P, Bay ML, Hidalgo G, Valenti J, Amerio N, Elena G: Effects of sevoflurane general anesthesia: immunological studies in mice. *Int Immunopharmacol* 2: 95-104 (2002)
128. Puljic R, Benediktus E, Plater-Zyberk C, Baeuerle PA, Szelenyi S, Brune K, Pahl A: Lipopolysaccharide-induced lung inflammation is inhibited by neutralization of GM-CSF. *Eur J Pharmacol* 557: 230-235 (2007)
129. Qian Q, Jutila MA, van RN, Cutler JE: Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. *J Immunol* 152: 5000-5008 (1994)
130. Qu C, Edwards EW, Tacke F, Angeli V, Llodra J, Sanchez-Schmitz G, Garin A, Haque NS, Peters W, van RN, Sanchez-Torres C, Bromberg J, Charo IF, Jung S, Lira SA, Randolph GJ: Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J Exp Med* 200: 1231-1241 (2004)
131. Raghavendran K, Davidson BA, Woytash JA, Helinski JD, Marschke CJ, Manderscheid PA, Notter RH, Knight PR: The evolution of isolated bilateral lung

- contusion from blunt chest trauma in rats: cellular and cytokine responses. *Shock* 24: 132-138 (2005)
132. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS: Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 307: 2526-2533 (2012)
133. Recknagel S, Bindl R, Kurz J, Wehner T, Ehrnthaller C, Knoferl MW, Gebhard F, Huber-Lang M, Claes L, Ignatius A: Experimental blunt chest trauma impairs fracture healing in rats. *J Orthop Res* (2010)
134. Reed JL, Brewah YA, Delaney T, Welliver T, Burwell T, Benjamin E, Kuta E, Kozhich A, McKinney L, Suzich J, Kiener PA, Avendano L, Velozo L, Humbles A, Welliver RC, Sr., Coyle AJ: Macrophage impairment underlies airway occlusion in primary respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis* 198: 1783-1793 (2008)
135. Robben PM, LaRegina M, Kuziel WA, Sibley LD: Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J Exp Med* 201: 1761-1769 (2005)
136. Rosseau S, Selhorst J, Wiechmann K, Leissner K, Maus U, Mayer K, Grimminger F, Seeger W, Lohmeyer J: Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *J Immunol* 164: 427-435 (2000)
137. Rosseau S, Hammerl P, Maus U, Walmrath HD, Schütte H, Grimminger F, Seeger W, Lohmeyer J: Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L25-L35 (2000)
138. Russel E, Neufeld E, Higgins C: Comparison of normal blood picture of young adults from 18 inbred strains of mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 78: 761-766 (1952)
139. Samsom JN, Annema A, Groeneveld PH, van Rooijen N., Langermans JA, van Furth R.: Elimination of resident macrophages from the livers and spleens of immune mice impairs acquired resistance against a secondary *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 65: 986-993 (1997)
140. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV: Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347: 669-671 (1990)
141. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA: Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75: 163-189 (2004)
142. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St GB: The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 176: 1091-1098 (1992)
143. Seitz DH, Fröba JS, Niesler U, Palmer A, Veltkamp HA, Braumüller ST, Wagner F, Wagner K, Bäcker S, Wachter U, Calzia E, Radermacher P, Huber-Lang MS, Zhou S, Gebhard F, Knöferl MW: Inhaled hydrogen sulfide induces suspended animation, but does not alter the inflammatory response after blunt chest trauma. *Shock* 37: 197-204 (2012)

144. Seitz DH, Niesler U, Palmer A, Sulger M, Braumüller ST, Perl M, Gebhard F, Knöferl MW: Blunt chest trauma induces mediator-dependent monocyte migration to the lung. *Crit Care Med* 38: 1852-1859 (2010)
145. Seitz DH, Palmer A, Niesler U, Braumüller ST, Bauknecht S, Gebhard F, Knöferl MW: Altered expression of Fas receptor on alveolar macrophages and inflammatory effects of soluble Fas ligand following blunt chest trauma. *Shock* 35: 610-617 (2011)
146. Seitz DH, Perl M, Mangold S, Neddermann A, Braumüller ST, Zhou S, Bachem MG, Huber-Lang MS, Knöferl MW: Pulmonary contusion induces alveolar type 2 epithelial cell apoptosis: role of alveolar macrophages and neutrophils. *Shock* 30: 537-544 (2008)
147. Seo SU, Kwon HJ, Ko HJ, Byun YH, Seong BL, Uematsu S, Akira S, Kweon MN: Type I interferon signaling regulates Ly6C(hi) monocytes and neutrophils during acute viral pneumonia in mice. *PLoS Pathog* 7: e1001304- (2011)
148. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG: Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26: 421-452 (2008)
149. Serbina NV, Pamer EG: Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7: 311-317 (2006)
150. Sharma AK, Fernandez LG, Awad AS, Kron IL, Laubach VE: Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF- $\alpha$  during pulmonary ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L105-L113 (2007)
151. Shi C, Pamer EG: Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11: 762-774 (2011)
152. Silva-Barcellos NM, Frezard F, Caligiorne S, Santos RA: Long-lasting cardiovascular effects of liposome-entrapped angiotensin-(1-7) at the rostral ventrolateral medulla. *Hypertension* 38: 1266-1271 (2001)
153. Statistisches Bundesamt Wiesbaden: Gesundheit - Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12, Reihe 4: 1-50 (2012)
154. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM: Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol* 82: 244-252 (2007)
155. Strecker W, Gebhard F, Rager J, Steinbach G, Ring C, Perl M, Kinzl L, Beck A: Interleukin-6 (IL-6) - an early marker of chest trauma. *Eur J Trauma* 28: 75-84 (2002)
156. Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ: Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172: 4410-4417 (2004)
157. Suresh MV, Yu B, Machado-Aranda D, Bender MD, Ochoa-Frongia L, Helinski JD, Davidson BA, Knight PR, Hogaboam CM, Moore BB, Raghavendran K: Role of Macrophage Chemoattractant Protein-1 in Acute Inflammation after Lung Contusion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46: 797-806 (2012)
158. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR,

- Libby P, Weissleder R, Pittet MJ: Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325: 612-616 (2009)
159. Swirski FK, Pittet MJ, Kircher MF, Aikawa E, Jaffer FA, Libby P, Weissleder R: Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10340-10345 (2006)
160. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van RN, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ: Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 117: 185-194 (2007)
161. Tacke F, Ginhoux F, Jakubzick C, van Rooijen N, Merad M, Randolph GJ: Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J Exp Med* 203: 583-597 (2006)
162. Tate MD, Pickett DL, van RN, Brooks AG, Reading PC: Critical role of airway macrophages in modulating disease severity during influenza virus infection of mice. *J Virol* 84: 7569-7580 (2010)
163. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P: The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9: 866-873 (1995)
164. Thepen T, van Rooijen N, Kraal G: Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. *J Exp Med* 170: 499-509 (1989)
165. Tosato G, Jones KD: Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. *Blood* 75: 1305-1310 (1990)
166. Trupka A, Nast-Kolb D, Schweiberer L: [Thoracic trauma]. *Unfallchirurg* 101: 244-258 (1998)
167. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF: Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 117: 902-909 (2007)
168. Turner M, Chantry D, Katsikis P, Berger A, Brennan FM, Feldmann M: Induction of the interleukin 1 receptor antagonist protein by transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* 21: 1635-1639 (1991)
169. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch J, Humphrey J, Spector W, Langevoort H: The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 46: 845-852 (1972)
170. van Furth R, Cohn ZA: The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128: 415-435 (1968)
171. van Rooijen N, Kors N, Kraal G: Macrophage subset repopulation in the spleen: differential kinetics after liposome-mediated elimination. *J Leukoc Biol* 45: 97-104 (1989)
172. van Rooijen N, Kors N, vd Ende M, Dijkstra C: Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res* 260: 215-222 (1990)

173. van Rooijen N, Sanders A: Elimination, blocking, and activation of macrophages: three of a kind? *J Leukoc Biol* 62: 702-709 (1997)
174. van Rooijen N, van Nieuwmegen R: Fluorochrome staining of multilamellar liposomes. *Stain Technol* 53: 307-310 (1978)
175. van Rooijen N, Bakker J, Sanders A: Transient suppression of macrophage functions by liposome-encapsulated drugs. *Trends Biotechnol* 15: 178-185 (1997)
176. van Rooijen N, Sanders A: Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174: 83-93 (1994)
177. van Rooijen N, Sanders A, van den Berg TK: Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J Immunol Methods* 193: 93-99 (1996)
178. Varol C, Yona S, Jung S: Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes. *Immunol Cell Biol* 87: 30-38 (2009)
179. Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R, Kalchenko V, Geissmann F, Jung S: Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 204: 171-180 (2007)
180. Visser T, Hietbrink F, Groeneveld KM, Koenderman L, Leenen LP: Isolated blunt chest injury leads to transient activation of circulating neutrophils. *Eur J Trauma Emerg Surg* 37: 177-184 (2011)
181. Vogel SM, Orrington-Myers J, Broman M, Malik AB: De novo ICAM-1 synthesis in the mouse lung: model of assessment of protein expression in lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L496-L501 (2006)
182. Wallis RS, Amir-Tahmasseb M, Ellner JJ: Induction of interleukin 1 and tumor necrosis factor by mycobacterial proteins: the monocyte western blot. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3348-3352 (1990)
183. Wilson MR, O'Dea KP, Zhang D, Shearman AD, van RN, Takata M: Role of lung-marginated monocytes in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 914-922 (2009)
184. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, Hayden DL, Hennessy L, Moore EE, Minei JP, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Brownstein BH, Mason PH, Baker HV, Finnerty CC, Jeschke MG, Lopez MC, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Arnoldo B, Xu W, Zhang Y, Calvano SE, McDonald-Smith GP, Schoenfeld DA, Storey JD, Cobb JP, Warren HS, Moldawer LL, Herndon DN, Lowry SF, Maier RV, Davis RW, Tompkins RG: A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med* 208: 2581-2590 (2011)
185. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK: IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 101: 311-320 (1998)
186. Yona S, Jung S: Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* 17: 53-59 (2010)
187. Zaslona Z, Wilhelm J, Cakarova L, Marsh LM, Seeger W, Lohmeyer J, von Wulffen W: Transcriptome profiling of primary murine monocytes, lung macrophages and

lung dendritic cells reveals a distinct expression of genes involved in cell trafficking. *Respir Res* 10: 2- (2009)

188. Zhang J, Patel JM: Role of the CX3CL1-CX3CR1 axis in chronic inflammatory lung diseases. *Int J Clin Exp Med* 3: 233-244 (2010)
189. Zhang-Hoover J, Sutton A, van RN, Stein-Streilein J: A critical role for alveolar macrophages in elicitation of pulmonary immune fibrosis. *Immunology* 101: 501-511 (2000)
190. Ziegler-Heitbrock HW: Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol* 67: 603-606 (2000)

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Zeit meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Prof. Dr. Florian Gebhard danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung für Unfall-, Hand-, Plastische- und Wiederherstellungschirurgie der Universitätsklinik Ulm promovieren zu dürfen.

Prof. Dr. Markus Knöferl und Prof. Dr. Markus Huber-Lang gilt mein besonderer Dank für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit. Sie waren stets Ansprechpartner für alle auftretenden Fragen und unterstützten die Entwicklung eigener Ideen.

PD Dr. Daniel Seitz danke ich für die begleitende, kompetente fachliche Betreuung und für die Begutachtung dieser Arbeit.

Meinen Mitdotorandinnen Annette Palmer und Ulrike Niesler möchte ich dafür danken, dass sie immer ein offenes Ohr für auftretende Probleme hatten und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Sonja Braumüller und Anne Rittlinger danke ich für die technische Unterstützung und die Hilfe in allen anderen tausend kleinen Dingen, die während der Anfertigung einer solchen Arbeit anfallen.

Vielen Dank auch an Barbara und Ralf Reutter, Stefanie Denk, Christoph Hohmann, Bettina Klohs, Anke Schultze, Philipp Kellermann und alle anderen Mitglieder des Traumalabor-Teams der Universitätsklinik Ulm für das tolle Arbeitsklima.

Und schließlich danke an meine Eltern für die Hilfe und den moralischen Beistand, sowie an meine kleine Familie, die mir die größte Stütze war.

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.