

Universitätsklinikum Ulm
Abteilung für
Unfallchirurgie, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. L. Kinzl)

Aktivierung von Lymphozyten-Subpopulationen und
Immigrationsverhalten neutrophiler Granulozyten nach
experimentellem Thoraxtrauma der Ratte

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

Michael Alexander Kopetzky
geboren in Traunstein

Ulm 2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. U. Liener

2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Brückner

Tag der Promotion: 25.11.2005

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	III
1 Einleitung	1
1.1 Klinische Relevanz	1
1.2 Letalität	1
1.3 Immunologische Reaktionen.....	2
1.4 Neutrophile Granulozyten	3
1.5 Lymphozyten-Subpopulationen.....	4
1.6 Tiermodell	6
1.7 Fragestellungen	7
2 Material und Methoden	8
2.1 Tierversuch	8
2.1.1 Vorbereitungen	8
2.1.2 Blast injury (bilaterale Druckwellenverletzung des Thorax)	9
2.1.3 Blutentnahme.....	10
2.1.4 Aufarbeitung der Organe	11
2.2 FACS-Scan (fluorescence activated cell sorter scan)	12
2.2.1 Isolation der mononukleären Zellen (MNCs).....	12
2.2.2 Vorbereitung der MNCs zum FACS-Scan	14
2.2.3 Analyse und Auswertung der Proben	16
2.3 Anti-neutrophile-Elastase-Färbung	17
2.3.1 Versuchsvorbereitungen	17
2.3.2 Anti-Elastase-Färbung	19
2.3.3 Auswertung der Schnitte	21
3 Statistik	22
4 Ergebnisse	23
4.1 Allgemeine Versuchsdaten	23
4.1.1 Gewicht.....	23
4.1.2 Druckwelle	23
4.1.3 Makroskopie der Lunge.....	23
4.1.4 Letalität.....	24

4.2 Differential-Blutbild	24
4.2.1 BGA (Blutgasanalyse).....	24
4.2.2 Leukozyten (WBC)	25
4.2.3 Neutrophile Granulozyten (PMN).....	26
4.3 FACS - Scan	27
4.3.1 Zeitpunkt sechs Stunden nach Tx-Trauma	27
4.3.2 Zeitpunkt 24 Stunden nach Tx-Trauma.....	28
4.3.3 Zeitpunkt 48 Stunden nach Tx-Trauma.....	30
4.3.4 Zeitpunkt 72 Stunden nach Tx-Trauma.....	31
4.3.5 CD4+/CD8+ Ratio.....	32
4.4 Anti-neutrophile-Elastase	33
5 Diskussion.....	35
5.1 Validität des angewandten Tiermodells	35
5.2 Granulozyten.....	36
5.3 Leukozyten	40
5.4 T-Zellen	42
5.5 B-Zellen und natürliche Killerzellen.....	46
6 Zusammenfassung	47
7 Literatur	49
8 Danksagung	57
9 Lebenslauf.....	58

Abkürzungen

α -1-PI	α -1-Proteinase-Inhibitor
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
Ø	Durchschnitt
°C	Grad Celsius
Aqua bidest.	Zweimalig destilliertes Wasser
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BGA	Blutgasanalyse
CD	Cluster of differentiation
cm	Zentimeter
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Duldecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Essigsäurediamintetraessigsäure
FACS	Flourescence activated cell sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Floureszin-Isothiocyanat
g	Gravitationskraft; Gramm
GRO/CINC-1	Growth-related oncogene/cytokine-induced neutrophil chemo-attractant-1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hematoxylin-Eosin
hrs	Stunden
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G

IL	Interleukin
ISS	Injury severity score
KG	Körpergewicht
K	Kontrolle
MHC	Major histocompatibility complex
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MNC	Mononukleäre Zellen
MOV	Multiorganversagen
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat
O₂	Sauerstoff
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PG I₂	Prostaglandin I ₂
PGE₂	Prostaglandin E ₂
pH	pH-Wert
PMN	Polymorphonuclear neutrophils
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
ROS	Reactive oxygen species
R-PE	Phycoerythrin
s.c.	Subkutan
SD	Standardabweichung
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
Tx	Thorax
TxA₂	Thromboxan A ₂
WBC	White blood cells

1 Einleitung

1.1 Klinische Relevanz

In Deutschland verunfallen jährlich ca. fünf Millionen Menschen, wovon 25 000 ihren Verletzungen erliegen (57).

Von den polytraumatisierten Patienten ziehen sich 44 % neben Schädel- und Extremitätenverletzungen auch ein Thoraxtrauma zu (4). Untersuchungen zeigen, dass bei 51 % der polytraumatisierten Patienten mit einem "injury severity score" (ISS) ≥ 16 auch ein begleitendes Trauma des Thorax besteht (60). Bei ca. 19 000 schwer Mehrfachverletzten mit einem ISS ≥ 16 erleiden somit ungefähr 9 000 Personen pro Jahr in Deutschland ein solches Trauma, das in seiner Verletzungsschwere in ca. 80 % der Fälle als gravierend eingestuft werden muss (60).

1.2 Letalität

Bei einem Thoraxtrauma können grundsätzlich alle intrathorakal gelegenen Organe betroffen sein (28, 45, 64, 80, 94). Obwohl schwerwiegende kardiale Schädigungen oder Gefäßverletzungen, insbesondere die Aortenruptur, unmittelbar zum Tode führen können, werden Letalität und Morbidität des Thoraxtraumas in erster Linie durch die Lungenkontusion bestimmt (11, 87).

Prognostisch bestimmend für polytraumatisierte Patienten sind aber nicht nur die Anzahl der Einzelverletzungen, sondern in erster Linie deren Art und Lokalisation (71). Betrachtet man ausschließlich die Verletzung des Brustkorbes, so zeigt sich die stumpfe Verletzung („blunt chest trauma“) als deutlich schwerwiegender gegenüber der penetrierenden Thoraxverletzung (8). Neben der Tatsache, dass letztere in ungefähr 85 % der Fälle adäquat behandelt werden kann, tritt auch wesentlich seltener ein prognostisch entscheidendes Multiorganversagen nach ARDS („acute respiratory distress syn-

drom“) oder SIRS („systemic inflammatory response syndrome“) auf (8, 24, 84, 97). In Deutschland und Europa überwiegen jedoch die durch stumpfe Traumen hervorgerufenen Thoraxverletzungen (97).

Ein begleitendes Thoraxtrauma im Rahmen eines Polytraumas stellt einen prognostisch ungünstigen Faktor dar. Einer prospektiven Studie an schwer mehrfach verletzten Patienten zufolge, betrug die Letalität in der Gruppe der polytraumatisierten Patienten mit Thoraxtrauma 18% gegenüber 7% in der Gruppe der Patienten ohne begleitendem Thoraxtrauma (97).

Das stumpfe Thoraxtrauma mit schwerer Lungenkontusion, insbesondere als Begleitverletzung bei Polytraumatisierten, stellt somit neben dem Schädel-Hirn-Trauma eine für das Überleben der Patienten entscheidende „Schlüsselverletzung“ dar.

1.3 Immunologische Reaktionen

Immunologische Veränderungen spielen in der Pathogenese posttraumatischer Komplikationen bis hin zum Multiorganversagen (MOV) eine anerkannt entscheidende Rolle (35, 36, 84).

Dies gilt auch für die pulmonale Dysfunktion nach einer Lungenkontusion. So zeigen klinische Untersuchungen, dass Verletzungen von Lungengewebe zu spezifischen systemischen Reaktionen führen und demnach Auswirkungen auf den Gesamtorganismus haben (7, 32, 33).

Hierbei kann ein Anstieg der Arachidonsäuremetaboliten Thromboxan A₂ (TxA₂), Prostazyklin I₂ (PGI₂) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) nachgewiesen werden (32). Dies ist von Bedeutung, da Prostanoiden neben dem Besitz einer starken vasoregulativen Aktivität auch über einen T-Zell-modulierenden Mechanismus zu einer vermehrten Produktion immunsuppressiver Interleukine (IL-4, IL-10) führen. PGE₂ entfaltet auch eine ausgeprägte immunsuppressive Wirkung auf Makrophagen (91).

Weitere immunologische Veränderungen nach Lungenkontusion bestehen in der lokalen und systemischen Aktivierung des Gerinnungssystems sowie in Änderungen in der Zusammensetzung des Surfactants (72, 73).

Darüber hinaus konnten nach experimenteller Lungenkontusion sowohl im Plasma als auch in der bronchoalveolären Lavage (BAL) Gerinnungs- und Komplementaktivierungen sowie eingewanderte neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden (74).

1.4 Neutrophile Granulozyten

Die Lymphozyten, die Monozyten bzw. Makrophagen sowie die Granulozyten bilden die drei Untergruppen der Leukozyten (weiße Blutzellen = WBC = white blood cells), die auch als mononukleäre Zellen (MNC = mononuclear cells) bezeichnet werden. In der Familie der Granulozyten (PMN = polymorphonuclear neutrophils) machen die Neutrophilen neben den Basophilen und Eosinophilen den deutlich größten Anteil aus. Ihnen fällt insbesondere in der unspezifischen zellulären Immunabwehr eine wichtige Funktion zu, so z.B. in der Abwehr verschiedener Zustände wie Trauma, Hämorrhagie und Sepsis. Dabei stellen die neutrophilen Granulozyten die zentrale Zellpopulation in der Vermittlung des akuten Lungenschadens (acute lung injury) bei einer experimentellen Hämorrhagie und anschließender Sepsis dar (3). Mittels chemotaktischer Stimulation durch z.B. Interleukin-8 verlassen sie die Blutbahn, um im entzündlichen oder traumatisierten Gewebe zu degranulieren (77). Dabei werden Serin-Proteinasen wie Kollagenase, Gelatinase und in erster Linie die neutrophile Elastase freigesetzt (23, 30). Letztere besitzt auf Grund ihrer breiten Substratspezifität für viele verschiedene Proteine, darunter auch die im Lungengerüst vorhandenen Elastin und Fibronectin, eine massiv gewebsschädigende Wirkung (23, 54). In physiologischen Mengen freigesetzt, dient die Serin-Proteinase neutrophile Elastase der Regulation der lokalen Immunabwehr. Um einer Schädigung des eigenen Organismus durch neutrophile Elastase vorzubeugen, wird mit dem α_1 -Proteinase-Inhibitor ein endogener Hemmstoff der neutrophilen Elastase sezerniert (23).

Verschiedene Studien belegen einen deutlichen Anstieg der neutrophilen Granulozyten und der Elastase-Konzentration im Gewebe nach größeren chirurgischen Eingriffen, nach Sepsis sowie nach akuter Hypoxie (17, 18, 78, 82, 93). Insbesondere konnten aber die Anstiege der neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe nach schwerem Thoraxtrauma als mitverantwortlich für die prognostisch ungünstige Entwicklung eines ARDS („acute respiratory distress syndrome“) gemacht werden (22, 53, 54, 75, 77, 92). Darüber hinaus konnte bei traumatisierten Patienten, die ein ARDS entwickelten, eine erhöhte Elastase-Konzentration im Plasma nachgewiesen werden (30).

Somit stellen die neutrophilen Granulozyten eine zentrale Zellgruppe in der Reaktion auf ein Thoraxtrauma dar. Die Immigration der neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe wurde bisher nur anhand der dort gemessenen Elastase-Konzentration oder der Konzentration der chemotaktischen Mediatoren wie Interleukin-8 (IL-8) bestimmt. Unklar ist jedoch das Ausmaß der Migration der neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe, da ein direkter Nachweis der Zellen noch nicht erfolgt ist. Dieser sollte in der hier vorgestellten Untersuchung auch in Hinblick auf die Validierung des Tiermodells erfolgen.

1.5 Lymphozyten-Subpopulationen

Die Dysfunktion des spezifischen zellulären Immunsystems scheint von entscheidender Bedeutung für die hohe Letalität nach Lungenkontusion zu sein. Experimentelle Untersuchungen zeigen erhebliche Veränderungen der zell-vermittelten Immunabwehr nach Hämorrhagie mit anschließender Sepsis sowie nach schwerem Trauma, Verbrennungen oder ausgedehnten Operationen (1, 2, 5, 25, 65, 72, 83, 102). Neben einer generellen Depression der T-Zell-Funktion werden insbesondere Veränderungen im Verhältnis der CD4⁺ - zu den CD8⁺ Zellen beschrieben (5, 25, 101, 102).

Vergleichbare Untersuchungen beim Thoraxtrauma existieren bisher nicht. Eine genaue Untersuchung der T- und B-Zellen nach Thoraxtrauma erscheint jedoch im Hinblick auf die bereits bekannten Funktionsveränderungen dieser Zellen ebenfalls von Interesse.

Die T-Zellen sowie die B-Zellen stellen die zentralen Subpopulationen innerhalb der Lymphozyten dar. Während die T-Zellen ihre Immunkompetenz im Thymus erlangen, reifen die B-Zellen bis zur vollen Funktionsfähigkeit im Knochenmark heran. Darüber hinaus kommen ihnen unterschiedliche Aufgaben in der spezifischen zellulären und humoralen Immunabwehr zu.

Im Bereich der gesamten CD3⁺ T-Zellpopulation sind im Wesentlichen die CD4⁺ Zellen sowie die CD8⁺ Zellen zu unterscheiden. Zellen, die zusätzlich das CD4⁺ Oberflächenantigen exprimieren, fallen besondere Funktionen im Rahmen der zellulären Immunabwehr zu. Die regulierende Wirkung durch die direkte interzelluläre Kooperation über den „major histocompatibility complex class II“ (MHC-II-Molekül) sowie die Produktion und Induktion von Interleukinen rücken die CD4⁺ Zellen als sogenannte T-Helfer-Zellen in den Mittelpunkt der zellulären Immunabwehr. Über das MHC-II-Molekül kann die Verbindung zwischen antigenpräsentierenden Zellen und B-Lymphozyten (CD 45 RA⁺) vermittelt werden. Aus letztgenannten kommt es zu einer gezielten Freisetzung von antigenspezifischen Antikörpern, während die CD4⁺ Zelle selbst über die Produktion von IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 und IL-12 einerseits stimulierende Wirkung auf Makrophagen und eosinophile Granulozyten, aber auch immunsuppressive Wirkung entfalten kann (52, 62, 63).

Eine weitere wichtige Zelllinie innerhalb der T-Zellen stellen die zytotoxischen CD8⁺ Zellen dar. Teils von den CD4⁺ Zellen über Interleukine stimuliert, besitzen diese Zellen jedoch auch die Fähigkeit, über das MHC-I-Molekül direkt mit antigenpräsentierenden Zellen in Verbindung zu treten. Dadurch aktiviert, sind sie selbst in der Lage, eine Zielzelle durch Kontakt oder durch Freisetzung von Perforin zu lysieren, wie dies auch bei den natürlichen Killerzellen auftritt (NKR P1A⁺). Innerhalb der CD8⁺ Zellen existiert jedoch auch eine zweite Zelllinie, die „Suppressor-Zellen“, die über die Freisetzung von Interleukin-4 auch nichtzytolytische Effektormechanismen vermitteln können (52, 62, 63, 101).

Im Bereich der zellulären Immunantwort kommt es neben der jeweiligen Einzelfunktion der Zellen auch wesentlich auf ein ausgewogenes Zusammenwirken von CD4⁺ -

und CD8+ Zellen an. Als ein wichtiger Parameter für die zelluläre Immunlage wurde daher die CD4+/CD8+ Ratio eingeführt, die auch in dieser Arbeit bestimmt wurde.

In bisherigen Untersuchungen zu Veränderungen der Leukozyten-Subpopulationen zeigte sich als wichtigster Punkt eine einheitliche Reduktion der CD4+ T-Zellen nach Verbrennungen, Sepsis, Schädel-Hirn-Verletzungen, Polytrauma und auch nach operativ herbeigeführter Lungengewebsverletzung (31, 43, 56, 67, 81, 102). Gerade nach einer so bedeutsamen Verletzung wie der stumpfen Lungenkontusion fehlen aber genaue Ergebnisse zu den Auswirkungen auf die Leukozyten-Subpopulationen.

1.6 Tiermodell

Die experimentelle Untersuchung der Lungenkontusion an verschiedenen Spezies richtete ihr Augenmerk nach den beiden Weltkriegen zunächst auf durch Explosionswellen verursachte Verletzungen (13, 55). Da sich aus der Verwendung von explosiven Stoffen oder Feuerwaffen in zivilen Einrichtungen Probleme ergaben, wurden diese Modelle zur genaueren Erforschung der Pathogenese der Lungenkontusion nicht weiterverfolgt. Somit rückten direkte Schädigungsmechanismen zur Induktion einer Lungenverletzung in den Vordergrund. Die Traumatisierung des Gewebes erfolgte dabei durch direkten Schuss oder stumpf durch Quetschung einzelner Lungenlappen nach Thorakotomie bzw. durch auf den Thorax fallende Gewichte (15, 16, 29, 44, 69, 72, 96).

Daraus wurde in der Folge ein Großtiermodell am Schwein entwickelt und etabliert, das eine isolierte unilaterale Lungenkontusion durch Bolzenschuss auf eine am Thorax angelegte Metallplatte verursachte (41, 66, 74).

Den im Großtiermodell vorhandenen idealen physiologischen Untersuchungs- und Behandlungsmöglichkeiten stehen jedoch auch Nachteile gegenüber. Immunologische Veränderungen können nur eingeschränkt analysiert werden, da zum einen geringere immunologische Kenntnisse über diese Tiere vorliegen als über z.B. Nagetiere und zum

anderen weniger etablierte und kommerziell erhältliche Methoden existieren. Hinzu kommen ein erheblich höherer finanzieller und logistischer Aufwand sowie Probleme bei längeren Beobachtungen, die aus einer durch das direkte Trauma ausgelösten versorgungsbedürftigen Begleitverletzung der Thoraxwand resultieren. Um die genannten Nachteile zu umgehen, versuchte man bereits seit Jahren adäquate Kleintiermodelle zu etablieren (9, 12, 13, 14, 82).

Jaffin et al. entwickelten ein solches Modell an der Ratte mit der Zielsetzung, Explosionsverletzungen an verschiedenen Organen zu untersuchen (50). Hierbei diente eine in einen Zylinder eingespannte Membran zur Erzeugung einer Druckwelle. Andere Arbeitsgruppen charakterisierten mit diesem Modell bereits die bei Explosionstraumen entstehenden kardiopulmonalen Veränderungen (39, 47).

Dieses Tiermodell ermöglicht auch die Auslösung eines isolierten Thoraxtraumas und wurde daher auf Grund seiner Vorteile in unserem Labor etabliert, in Vorversuchen charakterisiert sowie mit dem Ziel verwendet, die immunologischen Veränderungen nach einer Lungenkontusion weiter zu untersuchen.

1.7 Fragestellungen

Die hier vorgestellten Untersuchungen sollen folgende Fragen beantworten:

1. Führt ein experimentelles Thoraxtrauma zu einer Invasion neutrophiler Granulozyten in die Lunge und welche Kinetik haben die Veränderungen?
2. Beeinflusst ein experimentelles Thoraxtrauma die Gesamtzahl der im Blut zirkulierenden Leukozyten?
3. Ergeben sich durch ein experimentelles Thoraxtrauma Veränderungen in der Zusammensetzung der Leukozyten, insbesondere im Hinblick auf die Subpopulationen der T-Zellen, B-Zellen und natürlichen Killerzellen?

2 Material und Methoden

Der folgende Tierversuch wurde nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Tübingen unter Einhaltung aller Vorgaben durchgeführt (Versuchsnummer 678).

Verwendet wurden männliche Wistar Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany). Zehn Tage vor Versuchsbeginn wurden die Tiere im Tierhaltungsbereich entsprechend den „standard operating procedures“ akklimatisiert. Freier Zugang zu Wasser und Nahrung war jederzeit möglich.

2.1 Tierversuch

Im Versuch wurden thoraxtraumatisierte Tiere mit Kontrolltieren (= Sham-Tiere) verglichen, welche identischen Manipulationen, nicht aber der Thoraxverletzung (Druckwelle) ausgesetzt waren. Zur Durchführung des Versuchs wurden 64 Tiere in vier Thoraxtrauma-Gruppen (6-, 24-, 48- u. 72 Stunden Tx) und vier entsprechende Kontrollgruppen (6-, 24-, 48- u. 72 Stunden K) zu je 8 Tieren (n=8) randomisiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten sechs, 24, 48, 72 Stunden nach Trauma bzw. „Scheintrauma“ erfolgte die Tötung der Tiere durch Blut- und Organentnahme.

2.1.1 Vorbereitungen

Jeweils vor Versuchsbeginn wurde das Gewicht der Tiere bestimmt.

Nach Prämedikation mit 0,005 mg/100 g Körpergewicht (KG) Atropin wurde die Narkoseeinleitung mit Äther durchgeführt. Die Narkoseführung erfolgte mit einem Gemisch aus 100 % medizinischem O₂ (Westfalen AG, Münster, Germany) und 3,5 % Sevoflurane-Narkosegas (Fa. Abbott GmbH, Wiesbaden, Germany), das die nicht intubierten Tiere mittels Spülmaske spontan atmeten. Der O₂ Flow betrug 2,0 l/min. Als Narkosegerät wurde ein Vapor (Fa. Drägerwerk AG, Lübeck, Germany) verwendet.

Nach Umlagerung der Tiere auf den Rücken und Fixierung der Extremitäten mit Leukosilk-Klebeband auf der Kunststoff-Unterlage wurde der gesamte Thorax- und Abdomenbereich bis auf die Haut freigeschoren. Es folgte die Anzeichnung des Processus xyphoideus zur präzisen Einstellung des Druckwellengenerators über dem Thorax. Darüber hinaus wurde jedes Tier mit einer entsprechenden Nummer versehen und erhielt zur Kennzeichnung eine rote Schwanzmarkierung für die Zugehörigkeit zu einer Tx-Gruppe oder eine blaue Markierung für eine Kontrollgruppe.

2.1.2 Blast injury (bilaterale Druckwellenverletzung des Thorax)

Der verwendete Druckwellengenerator wurde in Anlehnung an das von Jaffin et al. beschriebene Modell erstellt (49) (siehe Abb 1).

Der untere Zylinderteil des Druckwellengenerators wurde anhand des angezeichneten Xyphoids über Thorax und Lunge zentriert. Der Abstand zwischen der Unterkante des zweiteiligen Zylinders und dem Processus xyphoideus der Ratte betrug bei allen Tieren 2,0 cm. Die beiden Zylinderhälften waren durch eine zwischen sie eingespannte, 190 µm dicke Mylar® Polyesterfolie (Fa. Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg, Germany) getrennt. In die obere Zylinderhälfte, die als Druckreservoir diente, erfolgte der über ein Ventil steuerbare Einlass von Druckluft. Bei Erreichen der Berstspannung löste das Zerreißen der Folie eine Druckwelle aus, die durch den zum Versuchstier hin offenen unteren Zylinderteil auf den Thorax des Tieres fokussiert auftraf. Mit Hilfe einer Omega PX 603 Messsonde (Fa. Newport Omega, Deckenpfronn, Germany), die rechtwinklig zur austretenden Druckwelle in die untere Zylinderhälfte eingebracht war, konnte mit der PC-Software Daisy-Lab 5.5 (Fa. Datalog GmbH, Mönchengladbach, Germany) die Stärke des nur wenige Millisekunden dauernden Druckwellenstroms gemessen werden.

Die Kontrolltiere wurden identischen Manipulationen ausgesetzt, jedoch ohne Induktion des Thoraxtraumas („Scheinverletzung“).

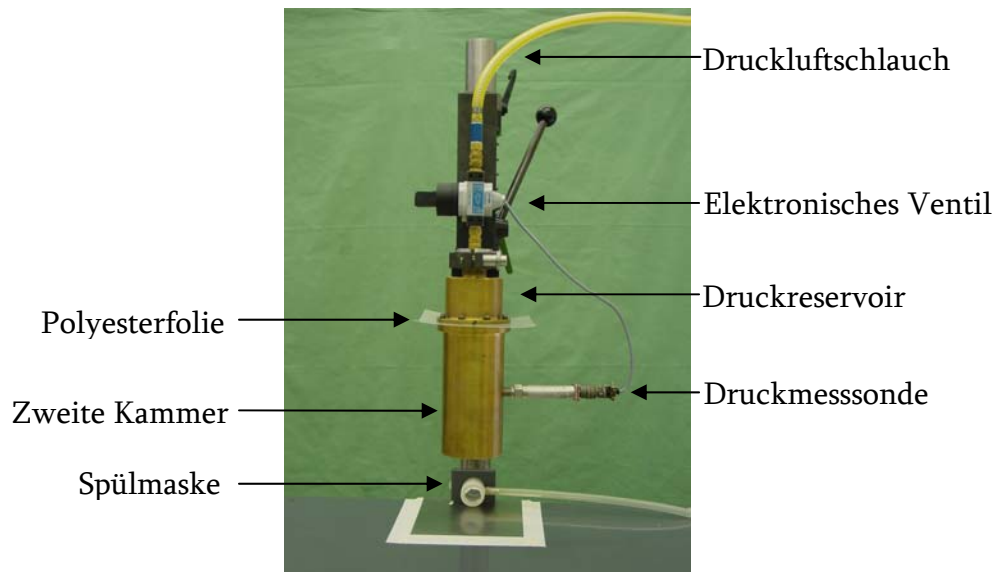


Abbildung 1: **Druckwellengenerator:** Aufbau des Druckwellengenerators mit zugehöriger Narkoseeinrichtung für das Versuchstier.

2.1.3 Blutentnahme

Direkt nach Trauma bzw. Scheinverletzung wurde die Narkose beendet, die Dauer der Apnoe-Phase bei den Tx-Tieren bestimmt und alle Tiere mit 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG Buprenorphin/Temgesic® (Fa. Boehringer, Mannheim, Germany) analgesiert. Die Tiere wurden in ihren Käfig zurückgesetzt und ihr Zustand überwacht und dokumentiert. Alle sechs Stunden erhielten weiterhin alle Tiere 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG Buprenorphin s.c..

Entsprechend der Gruppenzugehörigkeit folgte die Tötung der Tiere durch Entbluten zu den jeweiligen Zeitpunkten sechs, 24, 48 und 72 Stunden nach Druckwellenverletzung bzw. Scheintrauma. Narkoseeinleitung und -führung geschahen analog der Vorbereitung zur Traumatisierung. Nach Thorakotomie und Laparotomie in tiefer Allgemeinnarkose erfolgte die Darstellung des Operationsfeldes sowie die Präparation und Punktion der Aorta abdominalis, nachdem diese distal abgeklemmt worden war. Zur Punktion wurde eine Insythe Braunüle 0,7 x 19 mm (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany) verwendet. Die Blutentnahmen wurden in der nachstehend aufgeführten Reihenfolge vollzogen:

2.1.3.1 Blutgasanalyse (BGA)

Eine mit Konusfüllung Heparin vorbereitete 1 ml-Spritze (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) wurde mit 0,5 ml Blut gefüllt und der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) der Probe mit dem IL-BG3 Analyzer (Instrumentation Laboratory, Kirchheim, Germany) bestimmt.

2.1.3.2 EDTA-Vollblut

Das Restblut aus der Aorta abdominalis wurde in eine 9 ml EDTA-Monovette (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Germany) gezogen, wovon 1 ml zur Differential-Blutbild-Bestimmung verwendet wurde. Diese erfolgte am Gerät Cell-Dyn 3500 (Fa. Abbott GmbH, Wiesbaden, Germany) im speziell eingestellten Programm "speciment type Ratte".

Das EDTA-Blut wurde nach Umkippen in ein 15 ml Falcon Röhrchen (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) 10 min bei 1062 g und 4°C zentrifugiert, der Plasma-Überstand in Portionen von 500 µl aufgeteilt und bei -80°C tiefgefroren. Aus dem Blutkuchen erfolgte, wie in Punkt 2.2.1 beschrieben, die Isolation der mononukleären Zellen.

2.1.4 Aufarbeitung der Organe

Im Anschluss an die Tötung der Versuchstiere wurden die intrathorakal gelegenen Organe sowie die Thoraxwand makroskopisch auf Verletzungen untersucht. Um die Schwere der Lungenkontusion zu beurteilen, wurde das Ausmaß der Einblutung in jeden Lungenlappen dokumentiert. Anschließend wurde der rechte Oberlappen unter Zuhilfenahme einer Präparierschere und einer anatomischen Pinzette entnommen und in 4%iger Formalin-Lösung fixiert.

Diese wurde hergestellt, indem 108,1 ml Formalin 37 % (Fa. J.T. Baker, Griesheim, Germany) filtriert und anschließend mit 891,9 ml PBS (Phosphate buffered saline) (Fa. Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Germany) auf einen Liter aufgefüllt wurden.

Die in Formalin befindlichen Organstücke wurden nach 24 Stunden in 100%iges Isopropanol umgesetzt.

Zur Aufarbeitung wurden die Organe in Paraffinblöcke gegossen und diese am Mikrotom in einer Dicke von 3 μm geschnitten. Die Organpräparate wurden Hematoxylin-Eosin (HE) gefärbt und im Anschluss daran zur Anti-neutrophilen-Elastase-Färbung (siehe Punkt 2.3) verwendet.

2.2 FACS-Scan (fluorescence activated cell sorter scan)

Dieses auf der Durchflusszytometrie basierende Verfahren ermöglicht es, durch den Einsatz spezifischer Antikörper gegen die CD-Oberflächenantigene (CD = cluster of differentiation) die verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen und deren prozentualen Anteil an der Gesamtheit der mononukleären Zellen (MNCs) zu bestimmen.

2.2.1 Isolation der mononukleären Zellen (MNCs)

Die MNCs wurden im Anschluss an die Entnahme des EDTA-Vollblutes isoliert. Die ersten Arbeitsschritte mit der Abtrennung des Plasmas wurden bereits in Punkt 2.1.3.2 dargestellt. Die MNC-Isolation erfolgte mittels Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation.

2.2.1.1 Abtrennen der Erythrozyten

Zunächst wurden zwei Leuko Sep-Röhrchen (Fa. Greiner, Frickenhausen, Germany) bereitgestellt und hierin jeweils 3 ml der Nyco-Prep-Lösung (Fa. Greiner, Frickenhausen, Germany) auf den Filter pipettiert. Die beiden Röhrchen wurden für eine Minute bei 1062 g und 25°C zentrifugiert, sodass die Nyco-Prep-Lösung vollständig unter den Filter gelangte.

Der Blutkuchen (ca. 3-4 ml) im 15 ml Falcon Röhrchen wurde so weit mit raumtemperiertem PBS aufgefüllt, bis sich insgesamt 8 ml (Blutkuchen + PBS) in dem Röhrchen befanden. Anschließend wurden Blutkuchen und PBS vorsichtig zu einer homogenen Lösung vermischt.

Davon wurden jeweils 4 ml in jedes der beiden vorbereiteten Nyco-Prep-Röhrchen auf den Filter pipettiert (Gesamtinhalt jedes Nyco-Prep-Röhrchens damit 7 ml). In diesem

Zustand wurden beide Röhrchen für 30 min bei 1400 g und 21°C zentrifugiert. Alle roten Blutzellen senkten sich unter den Filter ab und es entstand ein einige Millimeter dicker, schwimmender MNC-Ring ca. einen halben Zentimeter über dem Filter. Der Überstand über dem MNC-Ring wurde abgezogen und verworfen. Der MNC-Ring sowie der Restüberstand zwischen Ring und Filter wurden aus beiden Nyco-Prep-Röhrchen in ein gemeinsames 15 ml Falcon-Röhrchen umgekippt. Die Nyco-Prep-Röhrchen mit den unter dem Filter abgetrennten Erythrozyten wurden ebenfalls verworfen.

2.2.1.2 Waschen der MNCs

Das Falcon-Röhrchen mit beiden MNC-Ringen und den Restüberständen wurde mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 8 ml aufgefüllt. Um die MNCs zu reinigen, wurden diese zweimal gewaschen. Das Falcon-Röhrchen wurde hierzu 15 min bei 455 g und 4°C zentrifugiert, sodass sich die mononukleären Zellen in Form eines Pellets am Boden des Röhrchens absetzten. Der Überstand wurde entfernt und verworfen.

2.2.1.3 Konservierung der MNCs

Die Konservierung der MNCs erfolgte in zwei Cryo tube vials 1,8 ml SI (Fa. Nunc, Wiesbaden, Germany), in denen sie in jeweils 500 µl einer Mischung aus fötalem Kälberserum (FCS) (Fa. Biochrom AG, Berlin, Germany) und DMSO (Dimethylsulfoxid) (Fa. Sigma Alderich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) in Lösung aufgenommen wurden.

Das FCS wurde dabei zunächst im Wasserbad bei 56°C für eine Stunde hitzeinaktiviert. Zur Erstellung der Mischung kamen 100 ml FCS zu 11,11 ml DMSO, wurden in 1000 µl-Aliquote aufgeteilt und bei -80°C aufbewahrt.

Alle Cryo tube vials mit den MNCs wurden bis zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2 Vorbereitung der MNCs zum FACS-Scan

2.2.2.1 Aufnahme der Zellen in DMEM-Medium

Zur Erstellung des Mediums wurden 50 ml FCS in eine 500 ml Flasche DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) (Fa. Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Germany) pipettiert und von dieser Lösung 10 ml in einem 15 ml Falcon-Röhrchen bereitgestellt. Darin wurde die MNC-Probe eines Tieres in Lösung aufgenommen und zur Abtrennung der Zellen bei 450 g und Raumtemperatur für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

2.2.2.2 Waschen der MNCs und Aufnahme in den FACS-Flow

Es erfolgte ein zweimaliges Waschen der MNCs in zuvor erwärmtem PBS. Davon wurden 5 ml aufgenommen und die darin suspendierten MNCs im Falcon-Röhrchen für 10 min bei 450 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand über dem verbleibenden Pellet wurde abgezogen und verworfen. Es erfolgte die Aufnahme der MNCs in 1 ml FACS-Flow (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany).

2.2.2.3 Überprüfung der Vitalität

Vor der FACS-Analyse erfolgte die Überprüfung der Vitalität der MNCs. Hierzu wurde eine 20 µl-Probe mit dem Zellgift Trypan blue (Fa. Sigma Alderich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) versetzt und die vitalen, nicht farbtragenden Zellen bei 40facher Vergrößerung unter dem Universal-Mikroskop „Axioskop“ (Fa. Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany) ausgezählt. Zum anschließenden FACS-Scan wurden nur Proben verwendet, die eine Vitalität der MNCs von mehr als 80 % aufwiesen.

2.2.2.4 Zugabe der spezifischen FACS-Antikörper

Zur Identifikation der Zellpopulationen wurden folgende Antikörper der Firma BD PharMingen (Heidelberg, Germany) verwendet (siehe Tab. 1):

Tabelle 1

Eingesetzte FACS-Antikörper der Firma BD PharMingen (Heidelberg, Germany)

Antikörper	Spezifität	Best.-Nr.
FITC-conjugated mouse IgG ₁ , monoclonal immunoglobulin isotype standard, 0,25 mg	Unbekannt (Negativkontrolle)	550616
R-PE-conjugated mouse IgG _{2a} , monoclonal immunoglobulin isotype standard, 0,1 mg	Unbekannt (Negativkontrolle)	03025A
FITC-conjugated mouse anti-rat CD3 monoclonal antibody, 0,1 mg	T-Zellen	22014A
R-PE-conjugated mouse anti-rat CD4 monoclonal antibody, 0,2 mg	MHC-II assoziierte T-Zellen = T-Helfer-Zellen	22025B
FITC-conjugated mouse anti-rat CD4 monoclonal antibody, 0,5 mg	MHC-II assoziierte T-Zellen = T-Helfer-Zellen	554837
R-PE-conjugated mouse anti-rat CD8a monoclonal antibody, 0,1 mg	MHC-I assoziierte T-Zellen = T-Suppressor-/zytotoxische Killerzellen	22075A
FITC-conjugated mouse anti-rat CD45RA monoclonal antibody, 0,5 mg	B-Zellen	554883
FITC-conjugated mouse anti-rat CD71 monoclonal antibody, 0,5 mg	Transferrin-Rezeptor auf proliferierenden Zellen	22194D
R-PE-conjugated mouse anti-rat NKR-P1A monoclonal antibody, 0,2 mg	natürliche Killerzellen	22645B

CD = Cluster of differentiation

IgG = Immunglobulin G

FACS = fluorescence activated cell sorter

MHC = Major histocompatibility complex

FITC = Floureszin-Isothiocyanat

R-PE = R-Phycoerythrin

Nach der Überprüfung der Zellvitalität wurden fünf 5 ml Polystyrene round bottom tubes (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany), auch als FACS-Röhrchen bezeichnet, bereitgestellt und die 1 ml MNC-Suspension im Falcon-Röhrchen zu je 200 µl auf diese verteilt. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe der spezifischen FACS-Antikörper auf die FACS-Röhrchen (siehe Tab. 2).

Tabelle 2

Verteilung der FACS-Antikörper

Nummer des FACS-Röhrchens	Kombination der FACS-Antikörper
1	Isotype, d.h. IgG ₁ (FITC) und IgG _{2a} (PE)
2	CD3 (FITC)/CD4 (PE)
3	CD4 (FITC)/CD8 (PE)
4	CD45RA (FITC)
5	CD71 (FITC)/NKR P1A (PE)

CD = Cluster of differentiation

IgG = Immunglobulin G

FACS = fluorescenc activated cell sorter

R-PE = R-Phycoerythrin

FITC = Floureszin-Isothiocyant

Nach der Zugabe der Antikörper wurden alle Röhrchen für 1 min bei 450 g und Raumtemperatur zentrifugiert und lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Nach Zugabe von 3 ml des FACS-Flow in jedes der fünf Röhrchen und gutem Schütteln erfolgte eine zweite Zentrifugation für 5 min bei 450 g und 4°C. Danach wurden aus allen Röhrchen 2 ml abgezogen und verworfen. Alle Röhrchen wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

2.2.3 Analyse und Auswertung der Proben

Die vorbereiteten Proben wurden mit Hilfe des Gerätes „FACScan“ (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany, Serien-Nr. 83197) analysiert. Zur Anwendung kam die Software „Cell Quest“ (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany).

2.3 Anti-neutrophile-Elastase-Färbung

2.3.1 Versuchsvorbereitungen

2.3.1.1 PBS (Angaben für 1 Liter)

Die PBS-Lösung (pH 7,45) wurde unter Verwendung der aufgeführten Reagenzien erstellt:

- 1,6 g NaH_2PO_4 Natriumdihydrogenphosphat (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Germany)
- 6,9 g Na_2HPO_4 Dinatriumhydrogenphosphat (Fa. J.T. Baker, Griesheim, Germany)
- 9,0 g NaCl Sodium chloride (Fa. J.T. Baker, Griesheim, Germany)

2.3.1.2 H_2O_2 in Methanol

Zu 247 ml Methanol (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Germany) wurden 3 ml Hydrogen Peroxide 30 % (Fa. J.T. Baker, Griesheim, Germany) pipettiert und diese Lösung in eine Glaswanne gefüllt.

2.3.1.3 Alkoholreihe

Es wurden drei Objektträger-Glaswannen mit jeweils 200 ml Xylol (Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) gefüllt. Vier weitere Wannen wurden mit 200 ml 50-, 70- und 80%igem Isopropanol in PBS bzw. 100%igem Isopropanol befüllt. Eine letzte Wanne enthielt 200 ml Aqua dest. (destilliertes Wasser) (siehe Tab. 3).

Tabelle 3

Alkoholreihe (1-9) zur Entparaffinierung der Gewebsschnitte

Nummer der Glaswanne	Inhalt
1	„Xylol 1“
2	„Xylol 2“
3	„Xylol 3“
4	H ₂ O ₂ in Methanol
5	100%iges Isopropanol
6	80%iges Isopropanol in PBS
7	70%iges Isopropanol in PBS
8	50%iges Isopropanol in PBS
9	Aqua dest.

Aqua dest. = destilliertes Wasser
H₂O₂ = Wasserstoffperoxid

PBS = Phosphate buffered saline

2.3.1.4 0,1%ige Pronase E-Lösung

1 mg Pronase E von Streptomyces griseus (Fa. Molecular Sigma Biology, Taufkirchen, Germany) wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und dazu 1 ml PBS pipettiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

2.3.1.5 30%ige Hämalaun-Lösung

60 ml Hämalaun (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Germany) wurden mit 140 ml Aqua dest. aufgefüllt und in eine Objektträger-Wanne gegeben.

2.3.1.6 Diaminobenzidin (DAB)-Stammlösung

250 mg Diaminobenzidin (DAB) (Fa. Molecular Sigma Biology, Taufkirchen, Germany) wurden in 40 ml PBS gelöst. Diese DAB-Stammlösung wurde in 2 ml Portionen aufgeteilt, welche lichtgeschützt bei -20°C gelagert wurden.

2.3.1.7 Normalserum, Verdünnung 1:50

In ein 1,5 ml Safe-Lock Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf, Köln, Germany) wurden 980 µl PBS pipettiert und dazu 20 µl Normalserum rabbit (Fa. Dako, Dänemark) gegeben. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.3.1.8 Rabbit anti-sheep HRP-Lösung, Verdünnung 1:200

Zu 995 µl PBS wurden 5 µl der biotinfreien anti-sheep immunoglobulin HRP-Lösung (Fa. Dako, Dänemark) in ein 1,5 ml Safe-Lock Reaktionsgefäß pipettiert. Das Gefäß wurde bei 4°C gelagert.

2.3.1.9 Anti-neutrophile-Elastase-Lösung, Verdünnung 1:100

Für fünf Schnitte wurden 495 µl PBS und 5 µl der Anti-neutrophile-Elastase-Lösung (Fa. Cederlane; Bezug über Fa. Biozol, Eching, Germany) in ein 1,5 ml Safe-Lock Reaktionsgefäß pipettiert. Die Lagerung erfolgte auf Eis.

2.3.2 Anti-Elastase-Färbung

Zunächst wurden die Gewebsschnitte in einen Glasträger gesetzt. Von jedem Tier wurde jeweils ein zweiter Schnitt als Negativkontrolle mitgeführt.

2.3.2.1 Entparaffinierung, Waschen und Andauung

Nach Entparaffinierung in der in 2.3.1.3 dargestellten Alkohol-Reihe erfolgte ein dreimal 10minütiges Waschen der Schnitte in einer mit PBS gefüllten Wanne. Diese wurde dazu auf den Schüttler KS 250 basic (IKA Labortechnik, Lonsee-Ettlenschieß, Germany) gestellt.

Um eine gute Bindung des Primärantikörpers Anti-neutrophile-Elastase zu erreichen, wurde die vorbereitete 0,1%ige Pronase E-Lösung zur Andauung des Gewebes auf die Schnitte pipettiert. Die Andauung erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer, danach wurden die Schnitte erneut in PBS gereinigt.

2.3.2.2 Zugabe des Normalserums, Verdünnung 1:50

Auf alle Gewebsschnitte wurden nach Entnahme aus dem PBS jeweils 100 µl des Normalserums in der Verdünnung 1:50 pipettiert, um ein geeignetes Milieu für die Zugabe des Anti-neutrophile-Elastase-Antikörpers zu schaffen. Die anschließende Inkubationszeit in der feuchten Kammer betrug 20 min.

2.3.2.3 Zugabe des Primärantikörpers Anti-neutrophile-Elastase, Verdünnung 1:100

Nach einem weiteren Waschen in PBS wurden jeweils 100 µl der Anti-neutrophile-Elastase-Lösung in der Verdünnung 1:100 zupipettiert. Den Primärantikörper erhielten nur die als Positivkontrolle gekennzeichneten Schnitte. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C.

2.3.2.4 Waschen der Schnitte in PBS

Die Schnitte wurden aus der feuchten Kammer genommen und analog zum ersten Tag der Färbung in einer mit PBS gefüllten Glaswanne gewaschen.

2.3.2.5 Zugabe des Sekundärantikörpers „anti-sheep HRP“, Verdünnung 1:200

Auf alle Gewebsschnitte folgte die Zugabe von jeweils 100 µl der anti-sheep HRP-Lösung in der Verdünnung 1:200. Um eine gute Bindung an den Primärantikörper zu gewährleisten, wurden die Schnitte für 15 min bei Raumtemperatur in die feuchte Kammer zurückgestellt. Anschließend wurden sie in PBS gereinigt.

2.3.2.6 Anwendung der Diaminobenzidin (DAB)-Gebrauchslösung

Zu 196 ml PBS erfolgte die Zugabe von 28 µl des 30%igen H₂O₂. Im abgedunkelten Raum wurden zwei DAB-Stammlösungsaliquote (4 ml) zugegeben und der Inhalt durchmischt. Die DAB-Gebrauchslösung wurde anschließend in eine vor Licht geschützte Glaswanne umgefüllt. Die gewaschenen Schnitte wurden darin für 15 min auf den Schüttler gestellt.

2.3.2.7 Spülen, Färben und Eindeckeln der Schnitte

Nach Beendigung der Färbezeit in der DAB-Gebrauchslösung wurden die Schnitte in einem mit Aqua bidest. (zweimalig destilliertes Wasser) gefüllten Träger, der sich auf dem Schüttler befand, für 10 min abgespült.

Anschließend erfolgte die Färbung für 10 Sekunden in der 30%igen Hämalaun-Lösung. Nach kurzer Reinigung in Leitungswasser durchliefen die Schnitte eine weitere Alkoholreihe (siehe Tab. 4) und wurden abschließend mit erhitztem Entellan eingedeckelt.

Tabelle 4

Alkoholreihe (1-6) zur Vorbereitung des Eindeckelns

Nummer der Glaswanne	Inhalt
1	50%iges Isopropanol in PBS
2	70%iges Isopropanol in PBS
3	100%iges Isopropanol in PBS
4	„Xylol 4“
5	„Xylol 5“
6	„Xylol 6“

PBS = Phosphate buffered saline

2.3.3 Auswertung der Schnitte

Alle angefertigten Schnitte wurden nach ihrer Färbung unter dem Universal-Mikroskop „Axioskop“ von einer Person ausgewertet, der das Versuchsprotokoll nicht bekannt war. Bei 40facher Vergrößerung wurden pro Schnitt jeweils 40 Gesichtsfelder betrachtet und die anti-Elastase-positiven (braun angefärbten) Zellen mit charakteristischer neutrophiler Zellkernmorphologie ausgezählt und addiert.

3 Statistik

Die Gruppengrößen wurden nach statistischer Beratung durch die Abteilung für Biometrie und Medizinische Dokumentation der Universität Ulm mit acht Tieren pro Gruppe festgelegt.

Die Auswertung wurde computergestützt mit dem Statistikprogramm Sigmastat™ 2.0 (SPSS Inc. Chicago/ USA) durchgeführt.

In allen Grafiken sind jeweils der Mittelwert plus/minus eine Standardabweichung dargestellt.

Die statistische Analyse erfolgte mittels t-test, da bei den Versuchsreihen zu jedem Zeitpunkt je eine Kontrollgruppe bzw. Traumagruppe ausgewertet wurde. Das Signifikanzniveau wurde $\alpha = 5 \%$ gewählt.

Insgesamt handelt es sich um eine explorative Studie. Das bedeutet, dass der statistische Test zur Erzeugung von Hypothesen dient. Eine generelle Adjustierung für multiples Testen erfolgte nicht.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeine Versuchsdaten

4.1.1 Gewicht

Das durchschnittliche Gewicht der Versuchstiere betrug 310 ± 48 g.

4.1.2 Druckwelle

Die Stärke der Druckwelle lag durchschnittlich bei $1,19 \pm 0,22$ bar.

4.1.3 Makroskopie der Lunge

Nach der Thorakotomie erfolgte die Beurteilung des Einblutungsmaßes in die Lunge. Bei allen traumatisierten Tieren zeigte sich eine bilaterale Einblutung in alle Lungenlappen (siehe Abb. 2).

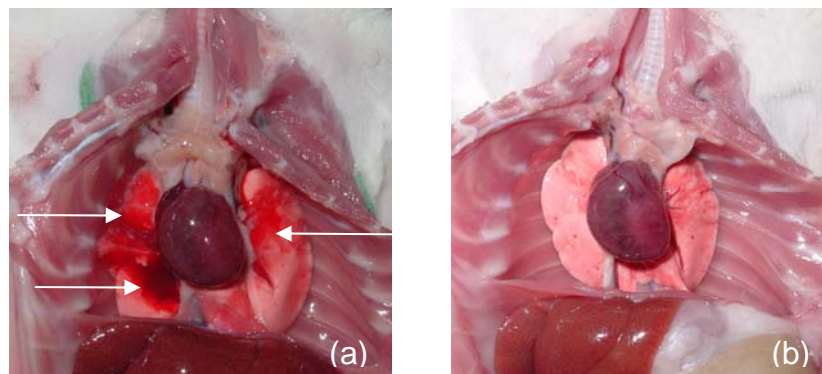


Abbildung 2a/b: **Makroskopie der Lungen:** Makroskopische Ansicht der Lungen eines traumatisierten Tieres (a) sowie eines Kontrolltieres (b). Als Folge der Druckwellenverletzung bestehen bilateral deutlich sichtbare kontusionierte Areale (Pfeile).

4.1.4 Letalität

Durch die Druckwelle wurden sechs Versuchstiere getötet. Makroskopisch erkennbare Todesursache war in allen Fällen eine Ruptur der Vena cava superior.

4.2 Differential-Blutbild

4.2.1 BGA (Blutgasanalyse)

Tiere, die dem Thoraxtrauma ausgesetzt waren, zeigten in allen vier Gruppen einen Rückgang des Sauerstoff-Partialdruckes (pO_2). Dieser war sechs Stunden nach Traumatisierung am ausgeprägtesten nachweisbar. Der pO_2 betrug dabei $\bar{\varnothing} 245 \pm 43$ mmHg in der Tx-Gruppe im Vergleich zu $\bar{\varnothing} 319 \pm 32$ mmHg in der Kontrollgruppe. Insgesamt konnte man bis zum Zeitpunkt von 72 Stunden eine lang andauernde Hypoxie bei allen Tieren der Tx-Gruppen beobachten.

Die Kontrolltiere wiesen einen in etwa konstanten Wert des pO_2 zu allen Zeitpunkten auf (siehe Abb. 3).

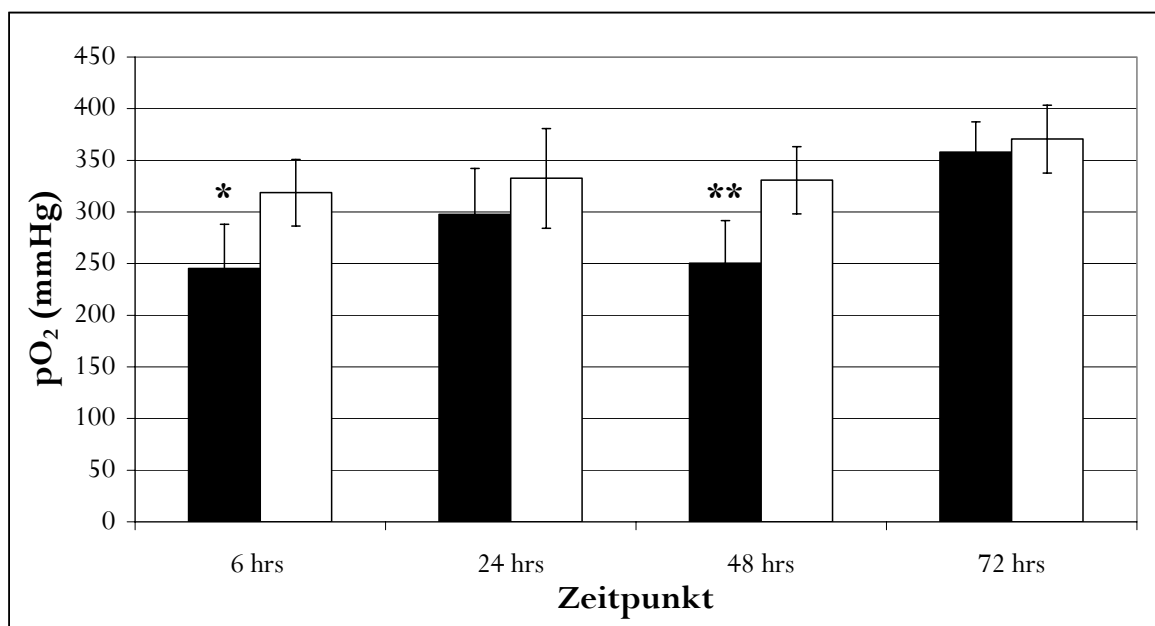


Abbildung 3 **Sauerstoff-Partialdruck (pO_2):** Sauerstoff-Partialdruck in Tx- und Kontrolltieren (MW \pm SD) zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die Hypoxie besteht bis zu 72 Stunden nach Tx-Trauma. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

- Mittelwert Tx
- Mittelwert Kontrolle

4.2.2 Leukozyten (WBC)

Sechs Stunden posttrauma bestand eine leichte Erhöhung der Leukozytenzahl auf $\bar{7} 130 \pm 1 410/\mu\text{l}$ gegenüber dem Kontrollwert von $\bar{6} 900 \pm 1 460/\mu\text{l}$.

Zum Zeitpunkt von 24 Stunden fiel die Zahl in der Tx-Gruppe dagegen deutlich auf im Mittel 4 550 Leukozyten/ μl ab. Die Leukozytopenie erreichte hier ihre stärkste Ausprägung.

Auch nach 48 und 72 Stunden blieb die Leukozytopenie bestehen, die Anzahl der Leukozyten näherte sich dabei in etwa wieder den Kontrollwerten.

In allen Kontrollgruppen zeigten sich im zeitlichen Verlauf keine wesentlichen Unterschiede (siehe Abb. 4).

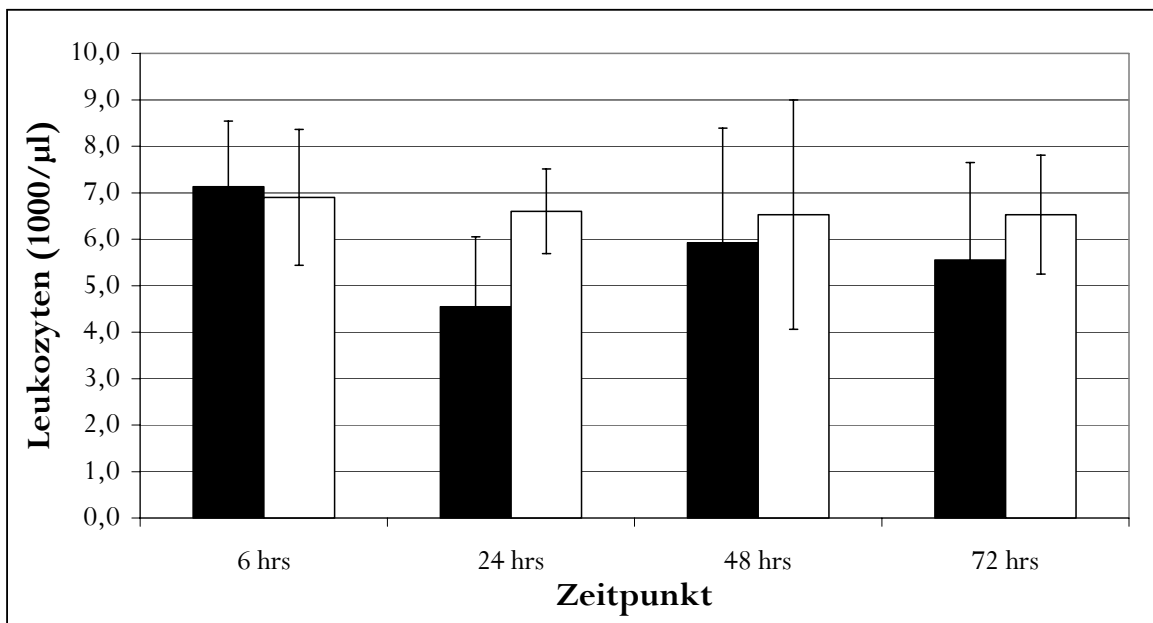


Abbildung 4 **Leukozyten (WBC):** Leukozytenzahlen (MW \pm SD) zu den jeweiligen Zeitpunkten. Nach sechs Stunden zeigte sich eine leichte Erhöhung der Leukozytenzahl, zu allen späteren Zeitpunkten eine Leukozytopenie in allen Tx-Gruppen.

■ Mittelwert Tx

□ Mittelwert Kontrolle

4.2.3 Neutrophile Granulozyten (PMN)

Zum Zeitpunkt sechs Stunden nach Thoraxtrauma konnte eine signifikante Granulozytose ($p < 0,05$) beobachtet werden. Dabei überstieg der Anteil der neutrophilen Granulozyten an den Gesamtleukozyten (WBC) mit $\bar{O} 33,7 \pm 7,8 \%$ deutlich den entsprechenden Wert von $\bar{O} 21,7 \pm 3,8 \%$ der Kontrolle.

In den 24 hrs Gruppen zeigte sich eine umgekehrte Entwicklung mit einer Reduktion des Granulozytenanteils in der Traumagruppe auf $\bar{O} 20,0 \pm 7,2 \%$ im Vergleich zu $\bar{O} 25,1 \pm 4,5 \%$ in der 24 hrs Kontrollgruppe (Granulozytopenie).

Bis zum letzten bestimmten Zeitpunkt von 72 Stunden erreichten die Werte der Thorax- und Kontrollgruppen wieder ein ähnliches Niveau (siehe Abb. 5).

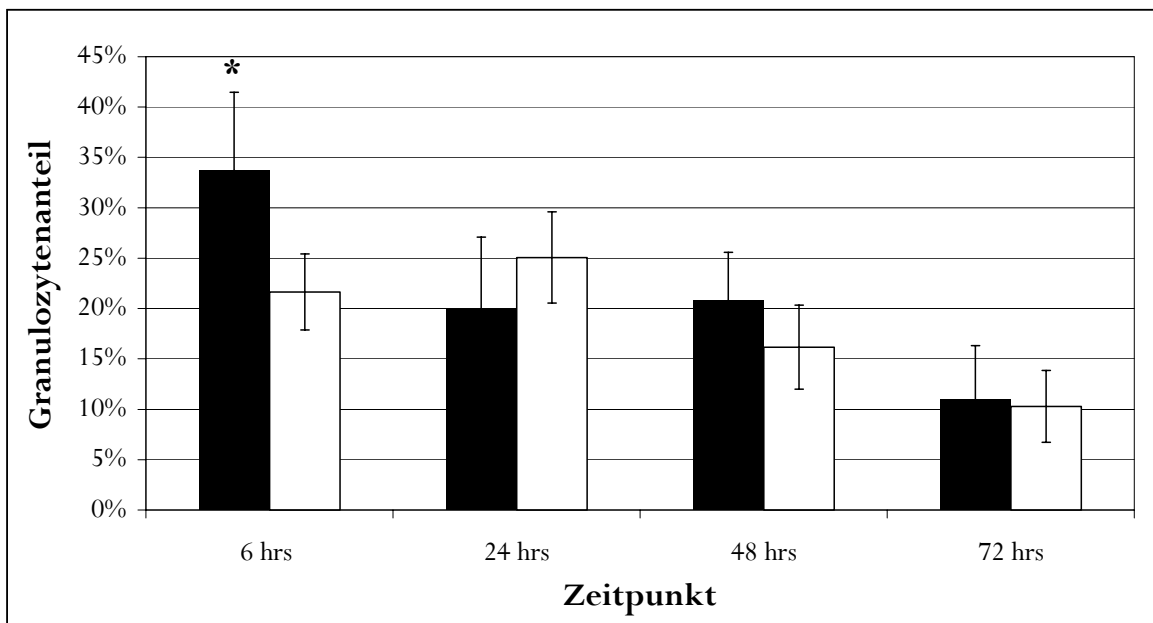


Abbildung 5 **Granulozytenanteil (PMN) an den Leukozyten (WBC):** Prozentuale Anteile (MW \pm SD) der neutrophilen Granulozyten (PMN) an den Leukozyten (WBC) zu den jeweiligen Zeitpunkten. Sechs Stunden nach Tx-Trauma bestand eine deutliche Granulozytose (* $p < 0,05$), nach 24 Stunden eine Granulozytopenie.

- Mittelwert Tx
- Mittelwert Kontrolle

4.3 FACS - Scan

4.3.1 Zeitpunkt sechs Stunden nach Tx-Trauma

Zum Zeitpunkt sechs Stunden nach experimentellem Thoraxtrauma zeigte sich in der T-Lymphozyten-Population (CD3+) mit einem Anteil von $\bar{\varnothing} 50,3 \pm 3,5 \%$ an den Gesamtleukozyten (WBC) eine Reduktion gegenüber der Kontrolle mit $\bar{\varnothing} 57,5 \pm 14,9 \%$.

In der Subpopulation der T-Helfer-Zellen (CD4+) ergab sich in der Tx-Gruppe ein Wert von $\bar{\varnothing} 40,8 \pm 0,4 \%$, während die Kontrolle einen Anteil von $\bar{\varnothing} 44,4 \pm 7,8 \%$ erreichte.

Der Anteil der zytotoxischen Killer- und Suppressorzellen (CD8+) war mit $\bar{\varnothing} 6,9 \pm 2,2 \%$ deutlich vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe ($\bar{\varnothing} 12,3 \pm 7,4 \%$).

Die B-Lymphozyten-Population (CD45RA+) zeigte sich den T-Zellen gegenüber gegenteilig verändert. Hier überschritt der Anteil der Tx-Gruppe mit $\bar{\varnothing} 6,1 \pm 2,7 \%$ an den WBC den Kontrollwert von $\bar{\varnothing} 3,4 \pm 0,4 \%$.

Die Anteile der aktivierten T-Zellen (CD71+) sowie der natürlichen Killerzellen (NKR P1A+) an den WBC lagen jeweils leicht unter den Werten in den zugehörigen Sechsstunden-Kontrollgruppen (siehe Abb. 6).

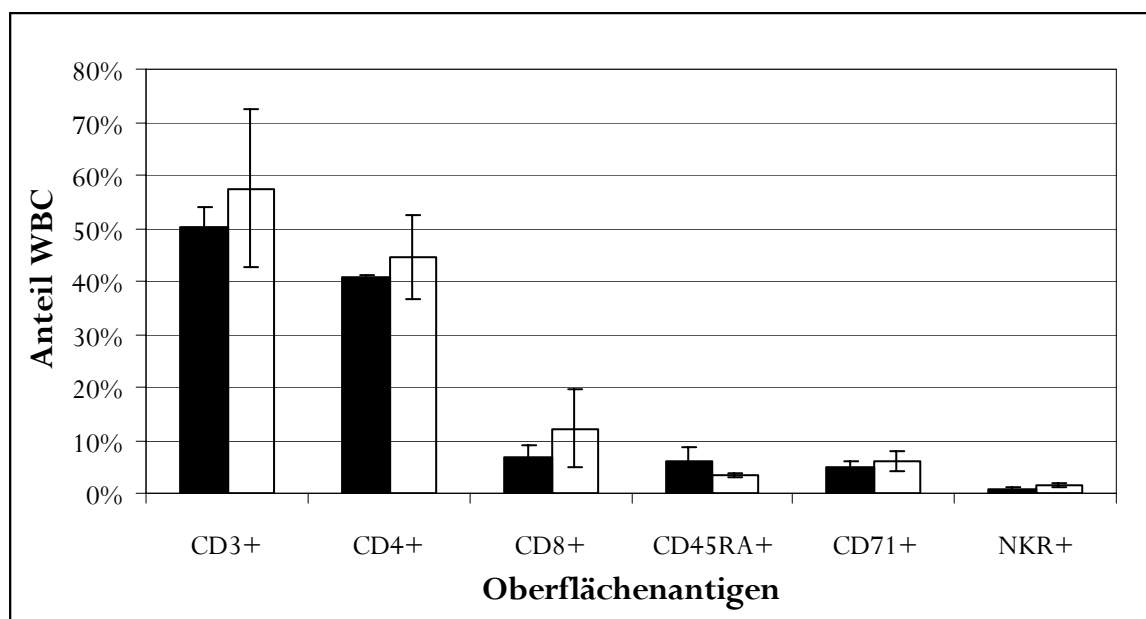


Abbildung 6 **FACS Scan 6 hrs:** CD-Antigen exprimierende T- und B-Zellpopulationen. Angegeben sind die prozentualen Anteile an den Leukozyten = WBC (MW \pm SD). Deutlich zeigte sich eine Reduktion innerhalb der CD3+, CD4+ sowie der CD8+ Subpopulationen nach Trauma.

■ Mittelwert Thoraxtrauma

□ Mittelwert Kontrolle

4.3.2 Zeitpunkt 24 Stunden nach Tx-Trauma

Auffallend war zu diesem Zeitpunkt eine Fortsetzung des Trends von 6 hrs nach Trauma mit einer deutlichen Reduktion der gesamten T-Lymphozyten-Population (CD3+). Der Anteil lag mit $\bar{x} 41,6 \pm 5,7$ % signifikant ($p < 0,01$) unter dem Anteil der Kontrollgruppe ($\bar{x} 58,9 \pm 6,8$ %). Die T-Zell-Reduktion erreichte zu diesem Zeitpunkt das Maximum verglichen mit dem Wert der Kontrolle.

Im Gegensatz dazu näherten sich die Anteile der Tx- ($\bar{x} 34,9 \pm 6,5$ %) und der Kontrollgruppe ($\bar{x} 34,1 \pm 12,8$ %) in der CD4+ Subpopulation der T-Helferzellen bereits wieder an, es ergab sich kein Unterschied mehr.

Der Wert der Killer-/Suppressorzellen (CD8+) sank dagegen stärker ab und bewegte sich mit einem Anteil von $\bar{x} 3,1 \pm 1,7$ % signifikant ($p < 0,01$) unter dem der Kontrolle ($\bar{x} 19,0 \pm 5,8$ %).

In der CD45RA+ B-Lymphozyten-Population zeigte sich keine Abweichung der Werte, die Anteile der Tx- und der Kontrollgruppe lagen bei fast identischen Werten.

Der Anteil der Subpopulation der aktivierten T-Zellen (CD71+) an den WBC veränderte sich gegenüber dem Zeitpunkt von sechs Stunden dahingehend, dass der Wert der Tx-Gruppe (\bar{x} 6,7 ± 5,1 %) nun über dem der Kontrolle (\bar{x} 3,0 ± 1,5 %) lag.

Gleiche Verhältnisse bestanden bei den natürlichen Killerzellen (NKR P1A+) (siehe Abb. 7).

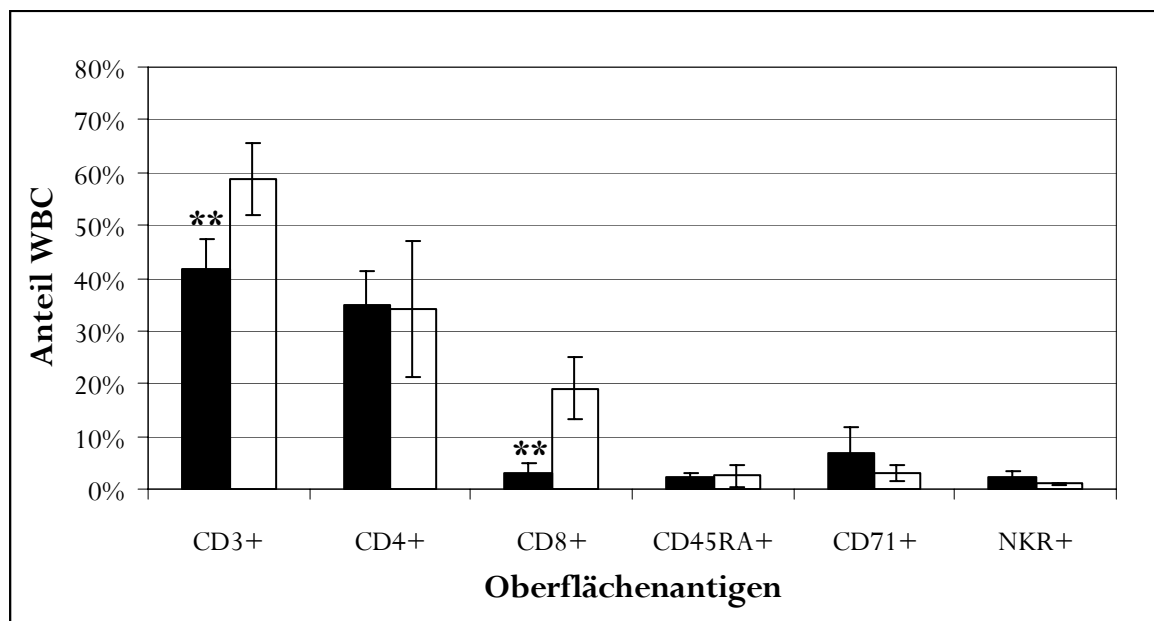


Abbildung 7 **FACS Scan 24 hrs:** Prozentuale Anteile (MW ± SD) der T- und B-Lymphozyten-Populationen an den Leukozyten = WBC. Die T-Zell-Reduktion (CD3+) erreichte ebenso wie die Depression innerhalb der CD8+ Subpopulation die maximale Ausprägung, während in der CD4+ Population keine Unterschiede gegenüber der Kontrolle mehr vorhanden waren. ** p<0,01.

■ Mittelwert Tx

□ Mittelwert Kontrolle

4.3.3 Zeitpunkt 48 Stunden nach Tx-Trauma

48 Stunden posttrauma zeigte sich eine Normalisierung im Bereich der einzelnen Subpopulationen.

Der Anteil der Gesamt-T-Zellen (CD3+) an den WBC lag in der Trauma-Gruppe mit durchschnittlich $56,8 \pm 10,6$ % in etwa auf dem Niveau der Kontrolle ($\bar{\varnothing} 54,3 \pm 3,5$ %).

Der zuvor bestehende Trend der T-Zell-Reduktion fand keine Fortsetzung.

Dies zeigte sich ebenfalls an den beiden T-Zell-Subpopulationen. Sowohl die gemittelten Anteile der T-Helfer-Zellen (CD4+) mit $\bar{\varnothing} 46,4 \pm 6,8$ % als auch die der Killer-/Suppressorzellen (CD8+) mit $\bar{\varnothing} 10,4 \pm 7,7$ % befanden sich jeweils in etwa auf Kontrollniveau (CD4+: $\bar{\varnothing} 43,5 \pm 4,7$ % und CD8+: $\bar{\varnothing} 11,2 \pm 6,2$ %).

Eine Normalisierung fand auch innerhalb der B-Lymphozyten (CD45RA+), der aktivierten T-Zellen (CD71+) sowie der natürlichen Killerzellen (NKR P1A+) statt (siehe Abb. 8).

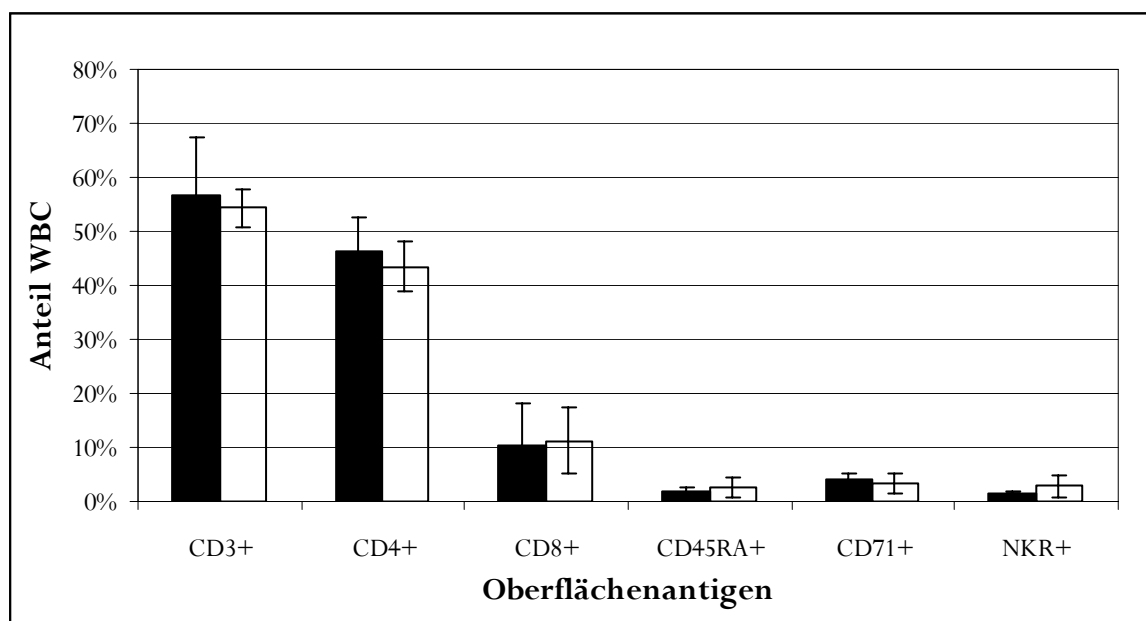


Abbildung 8 **FACS Scan 48 hrs:** Prozentuale Anteile (MW \pm SD) der T- und B-Lymphozyten-Populationen an den Leukozyten = WBC. Die nach 6 und 24 hrs beobachtete T-Zell-Reduktion (CD3+) sowie die Depression der CD8+ Zellen waren nicht mehr nachweisbar. In allen Subpopulationen zeigte sich ein Normalisierungstrend.

- Mittelwert Tx
- Mittelwert Kontrolle

4.3.4 Zeitpunkt 72 Stunden nach Tx-Trauma

Die zum Zeitpunkt 48 Stunden posttrauma beobachtete Normalisierung blieb auch nach 72 Stunden bestehen.

Bei $\bar{x} 56,3 \pm 15,2$ % (Tx-Gruppe) gegenüber $\bar{x} 57,6 \pm 9,7$ % (Kontrolle) lagen die Anteile der CD3+ T-Zellen an den WBC auf gleichem Niveau.

Entsprechend blieben wiederum auch die Werte der CD4+ T-Helfer-Zellen und der Killer-/Suppressorzellen (CD8+) im Kontrollbereich. Durchschnittlich $43,6 \pm 7,9$ % WBC standen in der Tx-Gruppe der Helfer-Zellen einem Kontrollwert von $\bar{x} 42,9 \pm 9,9$ % gegenüber.

Die CD8-positive Subpopulation erreichte nach Trauma einen durchschnittlichen Anteil von $16,9 \pm 8,4$ %, der kaum von dem der Kontrolle mit $\bar{x} 15,9 \pm 7,7$ % abwich.

Keine Veränderungen zeigten sich in den Anteilen der B-Lymphozyten-Population (CD45RA+), der CD71-positiven aktivierten T-Zellen und der natürlichen Killerzellen (NKR P1A+) (siehe Abb. 9).

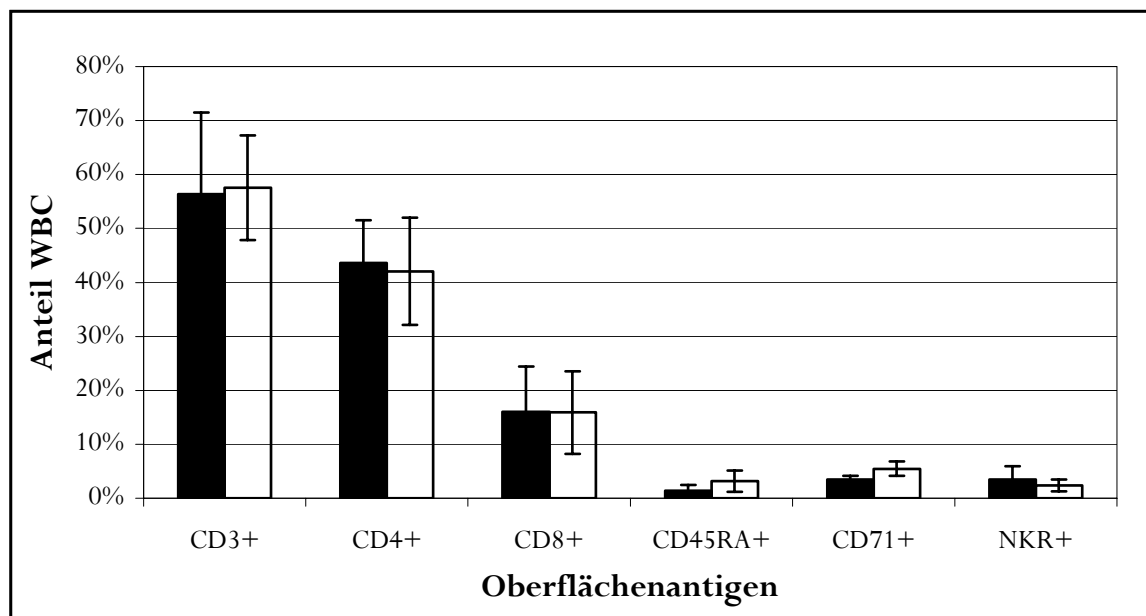


Abbildung 9 **FACS Scan 72 hrs:** Prozentuale Anteile (MW \pm SD) der T- und B-Lymphozyten-Populationen an den Leukozyten = WBC. In allen Zell-Populationen zeigten sich keine wesentlichen Abweichungen der Tx- von der Kontrollgruppe, der Normalisierungstrend blieb bestehen.

- Mittelwert Tx
- Mittelwert Kontrolle

4.3.5 CD4+/CD8+ Ratio

Das Verhältnis der T-Helfer-Zellen (CD4+) zu den zytotoxischen Killer-/Suppressorzellen (CD8+), bezeichnet als CD4+/CD8+ Ratio, wird zur Beurteilung der zellulären Immunkompetenz verwendet.

Zum Zeitpunkt von 24 Stunden nach Thoraxtrauma lag der CD4+/CD8+ Quotient mit durchschnittlich $11,0 \pm 2,6$ signifikant ($p < 0,01$) über dem Wert der Kontrollgruppe ($\emptyset 2,2 \pm 1,3$).

Zu den Zeitpunkten 48 und 72 Stunden waren keine deutlichen Veränderungen zwischen den Gruppen feststellbar (siehe Abb. 10).

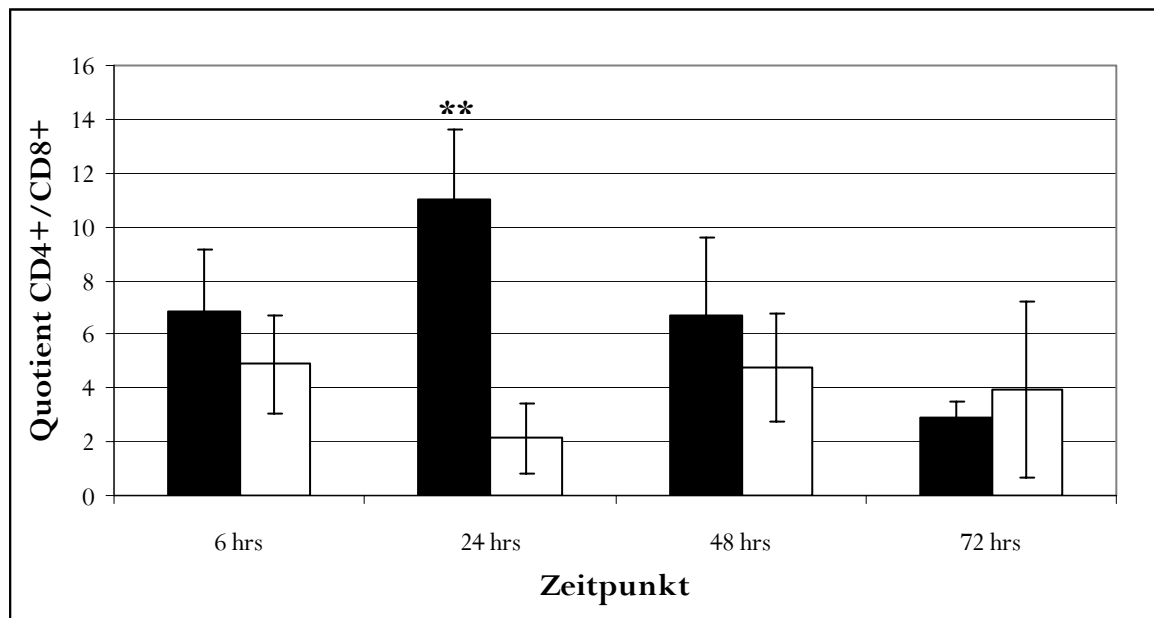


Abbildung 10 **CD4+/CD8+ Ratio:** CD4+/CD8+ Ratio (MW \pm SD) über die Zeitpunkte von 6 bis 72 Stunden. 24 Stunden nach Tx-Trauma lag der Quotient deutlich und signifikant (** $p < 0,01$) über dem Kontrollwert.

- Mittelwert Tx
- Mittelwert Kontrolle

4.4 Anti-neutrophile-Elastase

Dargestellt werden die absoluten Zahlen der anti-Elastase-positiven und damit aktivierten neutrophilen Granulozyten (PMN = polymorphonuclear neutrophils), die nach Thoraxtrauma aus der Blutbahn in das Lungenparenchym immigriert waren.

Das Thoraxtrauma war zu allen Zeitpunkten mit einer ausgeprägten Invasion der neutrophilen Granulozyten vergesellschaftet.

Zum Zeitpunkt sechs Stunden posttrauma waren im Durchschnitt 479 ± 84 PMN im Lungengewebe mittels Anti-Elastase-Färbung darstellbar. Demgegenüber zeigten sich in den Gewebsschnitten der 6 hrs Kontrollgruppe $\bar{\varnothing} 74 \pm 24$ PMN.

Das Ausmaß der Invasion der neutrophilen Granulozyten erreichte bei den Traumatizierten nach 24 Stunden ein Maximum ($\bar{\varnothing} 630 \pm 70$ PMN). Die Kontrolle zeigte zu diesem Zeitpunkt im Schnitt 69 ± 34 in das Lungenparenchym eingewanderte PMN.

Im Lungengewebe der traumatisierten Tiere sank die Zahl der anti-Elastase-positiven Granulozyten nach 48 Stunden wieder auf $\bar{\varnothing} 355 \pm 80$ ab. Der 48 hrs Kontrollwert lag mit $\bar{\varnothing} 45 \pm 10$ PMN in etwa im Bereich der vorangegangenen Kontrollen.

72 Stunden nach Tx-Trauma setzte sich der nach 48 Stunden begonnene Abwärtstrend in der Tx-Gruppe fort. Die PMN-Zahl ging auf $\bar{\varnothing} 159 \pm 32$ PMN zurück und erreichte damit ihren niedrigsten Wert. Der Kontrollwert der anti-Elastase-positiven PMN befand sich mit $\bar{\varnothing} 61 \pm 14$ auf dem konstanten Niveau der anderen drei Kontrollen.

Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren zu allen Zeitpunkten signifikant ($p < 0,01$) (siehe Abb. 11).

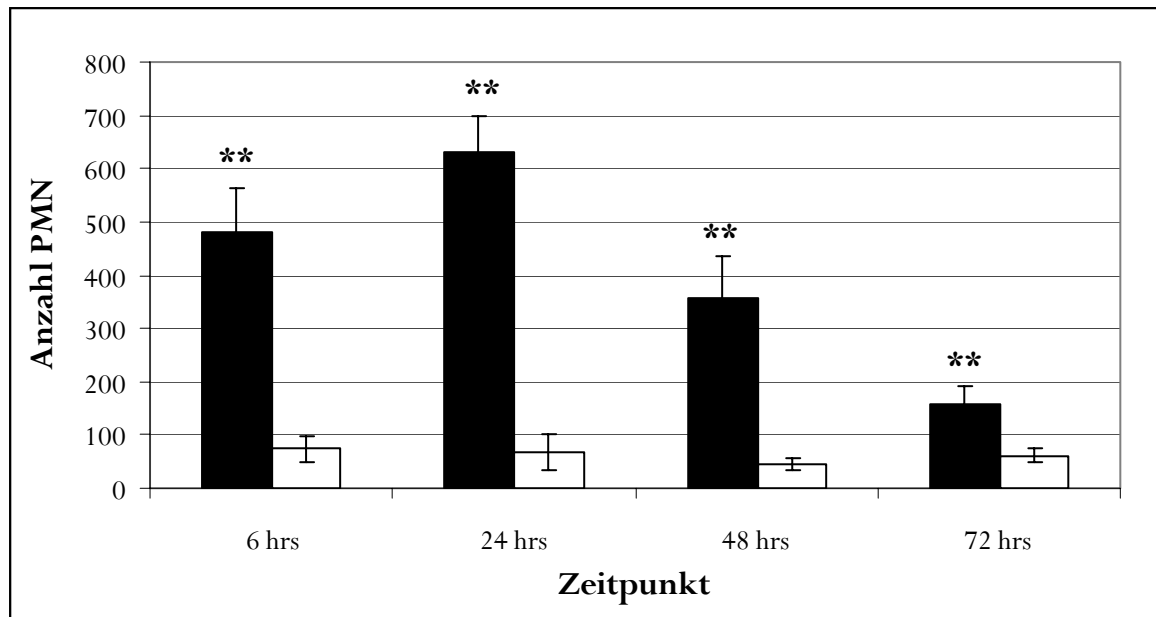


Abbildung 11 **Anzahl Granulozyten (PMN):** Anzahl (MW \pm SD) der zu den jeweiligen Zeitpunkten in das Lungengewebe immigrierten anti-elastase-gefärbten neutrophilen Granulozyten (PMN) pro 40 ausgezählter Gesichtsfelder. 24 Stunden nach Tx-Trauma erreichte die Invasion der PMN ihr Maximum. ** p < 0,01.

- Mittelwert Tx
- Mittelwert Kontrolle

5 Diskussion

5.1 Validität des angewandten Tiermodells

Das für die hier vorgestellten Untersuchungen verwendete Tiermodell wurde ursprünglich von Jaffin et al. zur Untersuchung von Explosionstraumen entwickelt (50). Im Originalmodell kamen jedoch die endotracheale Intubationsnarkose sowie die maschinelle Beatmung zum Einsatz, die ihrerseits bereits zu ausgeprägten lokalen und systemischen Inflammationsprozessen führen können (6, 89, 95). Für eine Übertragung in den klinischen Bereich und insbesondere für die Untersuchung lokaler und systemischer immunologischer Veränderungen war dieses Modell daher unbefriedigend.

In Vorversuchen, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sind, wurde aus diesem Grund ein modifiziertes Modell etabliert, in dem eine volatile Narkoseführung ohne Intubation zur Anwendung kam und das die Standardisierung einer reproduzierbaren isolierten bilateralen Lungenkontusion ermöglichte. Die bereits von Irwin et al. und Jaffin et al. beschriebenen kardiopulmonalen Reaktionen nach einer Druckwellenverletzung in Intubationsnarkose sowie auftretende makro- und mikroskopische Veränderungen konnten am hier verwendeten Modell bei anderer Narkoseführung bestätigt werden (48, 50). Die durch die Schädigung beider Lungen ausgelösten alveolären und bronchialen Einblutungen sowie die Einwanderung von Granulozyten entsprechen den beim Menschen nach bilateraler Lungenkontusion auftretenden Veränderungen (42, 46, 87). Die Verletzung des Lungengewebes entsteht dabei durch den starken Druckgradienten an der Grenzfläche zwischen den flüssigen bzw. festen und den stark gashaltigen Kompartimenten (14). Auch die deutlich vorhandene vagale Reaktion der Tiere mit Bradykardie und Hypotonie ist mit der des Menschen vergleichbar (55).

Die Frühletalität in sechs Fällen direkt nach der Druckwellenverletzung wurde durch die Ruptur der großen Gefäße, in erster Linie der Vena cava superior, verursacht. Diese Gefäßverletzungen stellen auch in der Literatur die charakteristische Ursache für ein frühes Versterben nach experimenteller Thoraxkontusion dar und zeigen die starken

mechanischen Kräfte, welche auf die thorakalen Organe eingewirkt haben (21, 27, 47). In Anbetracht dieser Verletzungen ist es wahrscheinlich, dass das Thoraxtrauma auch kardiale Schäden induziert, obwohl diese makroskopisch nicht nachgewiesen werden konnten. Weitere Studien zur Untersuchung dieser Problematik erscheinen daher angezeigt. Eine Spätletalität, z.B. durch respiratorische Insuffizienz, wurde bis zu 72 Stunden nach Traumatisierung nicht beobachtet.

Fasst man die vorgestellten Erkenntnisse zusammen, so ist gut dokumentiert, dass das für die hier vorgelegten Untersuchungen verwendete Tiermodell eine Lungenkontusion im Rahmen eines berührungslosen Thoraxtraumas mit komprimierter Luft induziert, wobei die verursachten Schäden mit den beim Menschen in der Klinik auftretenden Verletzungen vergleichbar sind. Das gewählte Modell ist daher geeignet, die komplexen Auswirkungen der „Schlüsselverletzung“ Thoraxtrauma auf die Lunge selbst und weiterhin auf lokale posttraumatische Immunfunktionen der Lungen und des Gesamtorganismus zu untersuchen.

5.2 Granulozyten

Ein Schwerpunkt der hier vorgestellten Untersuchungen lag im direkten Nachweis der Invasion von neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe.

Die neutrophilen Granulozyten spielen als Effektorzellen der unspezifischen zellulären Immunabwehr eine wichtige Rolle. Im Rahmen der Immunabwehr bilden sie den Pool der erstreagierenden Zellen, die in der Lage sind, transendothelial zu migrieren und unmittelbar am Ort der Entzündung oder des Traumas zu agieren. Geleitet durch einen chemotaktischen Gradienten von Mediatoren wie z.B. Interleukin-8, erreichen sie die betroffenen Gewebsareale (77). Ihre entscheidende Bedeutung für die Immunabwehr, aber auch für die Entstehung von Folgeschäden, besteht in der Art ihrer Wirkungsweise im Zielgewebe. Durch Degranulation erfolgt die Freisetzung von gewebstoxischen Proteasen, wie der neutrophilen Elastase, aber auch von Sauerstoffradikalen, der

sogenannten „Reactive oxygen species“ (23, 38, 53, 93). Diese Substanzen lysieren nekrotische Zellen, besitzen aber dabei auf Grund einer breiten Substratspezifität auch destruierende Wirkung auf gesundes Gewebe (23, 54). Um diesen Effekt auf intaktes Gewebe zu verhindern, existiert in der Lunge ein physiologischer Hemmstoff der neutrophilen Elastase, der α_1 -Proteinase-Inhibitor (α_1 -PI) (23). Beide Proteinasen unterliegen einem fein abgestimmten Regulationsprozess, der ein Gleichgewicht beider Substanzen gewährleistet. Dies zeigen Untersuchungen, welche darstellen konnten, dass bereits ab einem Verhältnis der Elastase-Konzentration zu α_1 -PI von 1:1 ca. 90 % des α_1 -PI inaktiviert vorliegen und somit keine ausreichende Schutzfunktion mehr besteht (23).

Die hier vorgestellten Ergebnisse belegen zu allen vier Untersuchungs-Zeitpunkten nach der Lungenkontusion eine massiv erhöhte Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe und bestätigen daher die bereits zuvor in anderen experimentellen und klinischen Studien gewonnenen Ergebnisse. Bisherige Untersuchungen messen zwar die Anwesenheit der immigrierten neutrophilen Granulozyten mit Hilfe der Bestimmung der Myeloperoxidase, es existieren jedoch keine Angaben über das tatsächliche Ausmaß der Granulozyteninvasion (54, 77, 78).

Die neutrophilen Granulozyten können ihre Wirkung nicht nur unmittelbar am Ort der Schädigung entfalten, sondern auch in von der Primärlokalisierung entfernte Areale wie z.B. die Lunge einwandern (78). Ursache dafür ist das sogenannte „Priming“ bzw. die Aktivierung der Granulozyten. So führen Hämorrhagie und Sepsis durch Aktivierung der neutrophilen Granulozyten zu deren sekundärer Einwanderung in das intakte und nicht durch den Primärinsult geschädigte Lungengewebe. Im weiteren Verlauf wird dieses durch die Produkte der immigrierten Neutrophilen geschädigt (78). Aus diesem Grund wird den neutrophilen Granulozyten eine zentrale Rolle in der Entwicklung sekundärer pulmonaler Schäden nach Hämorrhagie, Sepsis und vor allem in der Pathogenese des ARDS (acute respiratory distress syndrome) zugewiesen (18, 30, 78, 88, 92, 93, 94). So zeigen Patienten, die ein ARDS entwickelten, eine 3-4fach er-

höhte Elastase-Konzentration in der bronchoalveolären Lavage (BAL) gegenüber gesunden Kontrollpatienten zum Zeitpunkt von 24 Stunden nach Trauma (30). Die stark erhöhte Konzentration an neutrophiler Elastase im Lungengewebe lässt auf einen Funktionsverlust des körpereigenen Schutzmechanismus sowie auf eine sehr hohe Anzahl eingewanderter und aktivierter neutrophiler Granulozyten im Gewebe schließen (22, 30).

Im Unterschied hierzu liegt bei der traumatischen Lungenkontusion der primäre Schaden in der Lunge selbst. Neben den durch die Verletzung induzierten mechanischen Schäden ist es möglich, dass das Lungengewebe durch die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten über physiologische Reparationsvorgänge hinaus weiter geschädigt wird. Die Einwanderung der Neutrophilen wird in erster Linie durch chemotaktische Substanzen wie Interleukin-8 vermittelt (77). Da das Chemokin Interleukin-8 von Ratten nicht exprimiert wird, kann in Bezug auf die hier vorgelegten Untersuchungen das murine Analogon „growth-related oncogene/cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1“ (GRO/CINC-1) herangezogen werden. Wie sein humanes Gegenstück IL-8 ist GRO/CINC-1 ein Mitglied der „Chemokin-Familie CXC“ und wirkt in erster Linie auf neutrophile Granulozyten (49). Neben der rein chemotaktischen Wirkung wurde für das GRO/CINC-1 nachgewiesen, dass es auch die Aktivierung von PMN-Granulozyten induziert (49). Die Analyse der BAL einer an dem gleichen Tiermodell durchgeführten Untersuchung zeigt tatsächlich eine hochgradige Ausschüttung von GRO/CINC-1 in den bronchoalveolären Raum sechs und 24 Stunden nach Thoraxtrauma (59). Dies korreliert mit der in den eigenen Ergebnissen auftretenden Granulozyteninvasion zu diesen Zeitpunkten.

Die eigenen Ergebnisse belegen bereits sechs Stunden nach Trauma eine gegenüber der Kontrolle 6fach erhöhte Zahl an Neutrophilen im Lungengewebe, die nach 24 Stunden auf das 9fache gegenüber der Kontrolle ansteigt. Betrachtet man den weiteren Verlauf der neutrophilen Granulozytenzahlen über den Zeitpunkt von 24 Stunden hinaus, so ergeben sich in den hier vorgestellten Untersuchungen zwar noch deutlich erhöhte

Zahlen im Lungengewebe, jedoch nehmen diese bis zu 72 Stunden nach der Lungenkontusion stetig und deutlich ab.

Die beobachtete Einwanderung von neutrophilen Granulozyten steht in Einklang mit Untersuchungen der Neutrophilen nach hämorrhagischem Schock und induzierter Sepsis, die hierbei bereits nach einer Stunde durch eine erhöhte Myeloperoxidase-Konzentration (MPO) in der Lunge nachgewiesen wurden (78). Nach Verbrennungsverletzung zeigten sich ebenfalls unmittelbar erhöhte Zahlen von neutrophilen Granulozyten im betroffenen Gewebe, die zum Zeitpunkt von vier Stunden posttrauma ihren höchsten Wert erreichten. Die Konzentration der Myeloperoxidase erreichte nach 24 Stunden einen Höhepunkt, was mit dem Maximum der Granulozyteninvasion der eigenen Ergebnisse in Einklang steht (98). Der Zeitpunkt 24 Stunden konnte als maßgeblich für die Induktion des entstehenden Gewebeschadens ausgemacht werden (98).

Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen eine Granulozytopenie im peripheren Blut 24 Stunden nach Traumatisierung. In Zusammenschau mit den Ergebnissen in der Literatur ist es daher naheliegend, dass die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten unmittelbar nach Trauma direkt aus dem peripheren Blut erfolgt.

Bis zum Zeitpunkt von 24 Stunden nach Trauma kann die Zahl der ins Lungengewebe immigrierten Neutrophilen bis zum 9fachen Wert gegenüber den gesunden Kontrolltieren ansteigen. Da die zunächst in großer Menge eingewanderten Granulozyten im Lungengewebe degranulieren, entziehen sie sich danach möglicherweise der immunhistochemischen Anti-Elastase-Färbung. Dies könnte die sich verringernden Zahlen nach 48 und 72 Stunden erklären.

Eine weitere Hypothese für die rückläufigen Granulozytenzahlen ist das Auftreten von neutrophiler Apoptose. Tatsächlich wurde in einer früheren Studie dargelegt, dass der in neutrophilen Granulozyten ausgelöste programmierte Zelltod die entzündlichen Vorgänge in der Lunge einschränken kann und somit „gesunde“ Gewebsanteile geschont werden (40).

Liener et al. konnten erstmalig zeigen, dass nach bilateraler Lungenkontusion apoptotische Zellen im Lungengewebe selbst nachgewiesen werden können, deren maximale Anzahl sich 48 Stunden nach Trauma fand (58). Die genaue Zuordnung der apoptotischen Zellen gelang zwar auf Grund der bereits fortgeschrittenen Pyknose der Zellen mit Verlust deren identifizierender Antigene nicht, es ist aber anzunehmen, dass der programmierte Zelltod auch die neutrophilen Granulozyten betrifft. Damit wäre dies eine weitere plausible Erklärung für den hier dargestellten Verlauf der Neutrophilenzahlen in der Lunge, und vor allem für die ab dem Zeitpunkt von 48 Stunden abnehmenden Zahlen.

Die Zusammenschau der gewonnenen Erkenntnisse verdeutlicht, dass ein experimentelles Thoraxtrauma zu einer massiven Immigration von neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe führt. Diese zeigt ihr Maximum innerhalb der ersten 24 Stunden nach Trauma. Erstmalig konnten wir mit den hier präsentierten Ergebnissen das tatsächliche Ausmaß der immigrierten Granulozyten im Verlauf bis zu 72 Stunden nach stumpfer Lungenkontusion darstellen. In wie weit das Thoraxtrauma zu über die Einwanderung hinausgehenden Funktionsveränderungen der neutrophilen Granulozyten führt, lässt sich durch die hier vorgelegten Untersuchungen nicht beantworten und ist daher Gegenstand weiterer Studien.

5.3 Leukozyten

In der Gruppe der Leukozyten („peripheral blood mononuclear cells“ = PBMC) unterscheidet man drei Zellarten mit deren jeweiligen Subpopulationen.

Dies sind zum einen die Granulozyten mit den prozentual am stärksten vertretenen neutrophilen Granulozyten (PMN), sowie den basophilen und den eosinophilen Granulozyten. Letztgenannte spielen im Rahmen von parasitären Infektionen und in der allergisch ausgelösten Immunantwort eine Rolle, während die Neutrophilen ihre Schlüsselfunktion in der Reaktion auf unspezifische Infektionen, Entzündungen und auch traumatisch bedingte Läsionen besitzen.

Die zweite große Gruppe innerhalb der Leukozyten bilden die Blutmonozyten. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit, infizierte, nekrotische oder apoptotische Zellen zu erkennen und mittels des Phagozytose-Mechanismus aufzunehmen und zu eliminieren (62). Dazu verlassen sie die Blutbahn und differenzieren sich zu gewebstypischen Makrophagen, wie beispielsweise den Kupffer-Stern-Zellen in der Leber oder den speziellen Alveolarmakrophagen in der Lunge. Ähnlich wie den neutrophilen Granulozyten kommt den Monozyten bzw. Makrophagen eine bedeutsame Aufgabe in der unspezifischen zellulären Immunabwehr zu. Die Alveolarmakrophagen spielen beispielsweise eine zentrale Rolle in der Erhaltung der Struktur und Funktion der Lunge durch ihre Fähigkeit, Partikel und Debris zu phagozytieren, Mikroorganismen abzutöten, andere immunologisch aktive Zellen zu rekrutieren sowie zu stimulieren und maligne Zellen zu erkennen (10, 26). Da zu jeder Zeit inhalierte Partikel und Krankheitserreger die Alveolen erreichen, liegt eine der Hauptaufgaben in der Phagozytose und Destruktion pathogener Keime (88). Zusätzlich zu diesen immunologischen Fertigkeiten können Alveolarmakrophagen auch den Umbau und die Reparatur von Bindegewebe in der Lunge aktiv steuern (34, 88, 90). Zirkulierende Monozyten tragen ihrerseits durch Einwanderung in den Alveolarraum zur Erneuerung des Zellpools der Alveolarmakrophagen bei (88).

Ziel der hier vorgestellten Experimente war die Untersuchung der Lymphozyten, die die dritte Zellspezies im Pool der Leukozyten darstellen. Neben den natürlichen Killerzellen, deren Funktion mit der der Makrophagen vergleichbar ist, stehen die B-Lymphozyten und vor allem die T-Lymphozyten im Vordergrund. Diese beiden Zelltypen sind sowohl für das Erkennen von spezifischen Antigenen als auch für die gezielte zelluläre und humorale Immunabwehr zuständig. Zu diesem Zweck besitzen die Zellen die Fähigkeit, sowohl direkt interzellulär als auch über immunmodulatorische Botenstoffe wie Interleukine miteinander zu kommunizieren (52, 62, 63). Ihre Aufgabe besteht daher neben der rein „ausführenden“ Funktion auch in der Koordination der Immunabwehr. Andere Studien zeigten nach verschiedenen Arten von Traumatisierung Veränderungen, die von den Autoren als „Immunsuppression“ gewertet wurden. Die

jeweiligen Arbeitsgruppen konnten dies nach operativer Lungengewebverletzung, aber auch nach Verbrennungen und allgemein chirurgischen Eingriffen beobachten (19, 31, 56, 76). In den Untersuchungen von Gebhard et al. ließ sich in der Gruppe der an der Lunge operierten Patienten die stärkste Suppression der Lymphozytenzahlen nach 24 Stunden ermitteln (31).

Die Bestimmung der Leukozyten im peripheren Blut kann somit auch als Marker für die Änderung der Gesamtimmunlage nach Trauma herangezogen werden.

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit zeigen dabei eine sechs Stunden nach Trauma auftretende mäßige Erhöhung der Leukozytenzahl gegenüber dem Kontrollwert. Nach 24 Stunden beobachtet man jedoch eine ausgeprägte Leukopenie gegenüber der Kontrollgruppe. Im Verlauf von 48 bis 72 Stunden lässt sich ein Normalisierungstrend der Leukozytenzahl feststellen, ohne dass jedoch die entsprechenden Werte der Kontrollgruppen vollständig erreicht werden.

Für zirkulierende neutrophile Granulozyten existieren vergleichbare Ergebnisse in der Literatur. Eine neuere Studie an traumatisierten Patienten, die später ein ARDS entwickelten, zeigt, dass die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Blut unmittelbar nach Trauma deutlich erhöht war. Nach 24 Stunden zeigte sich jedoch bereits ein massiver Rückgang (77).

Wie die eigenen Ergebnisse belegen, befindet sich nach 24 Stunden bereits eine große Anzahl an Neutrophilen im Lungengewebe. Die deutlich abnehmenden Gesamtleukozytenzahlen im peripheren Blut sind demnach möglicherweise auf deren massive Rekrutierung und Immigration in die Lunge zurückzuführen.

5.4 T-Zellen

Im Bereich dieser speziellen und für die spezifische Immunabwehr entscheidenden Lymphozyten-Subpopulation stehen die CD4⁺ - sowie die CD8⁺ Zellen im Mittelpunkt. Beide Zellarten tragen auf ihrer Oberfläche auch das CD3⁺ Antigen, das somit als Marker für die T-Zell-Gesamtheit herangezogen werden kann.

Wie einleitend dargestellt, kommt den deshalb auch als CD4+ Helfer-Zellen bezeichneten CD4+ T-Lymphozyten die entscheidende Aufgabe der Antigenerkennung und Auslösung sowie Steuerung der adäquaten zellulären Immunantwort zu. Zunächst kann über den sogenannten „major histocompatibility complex class II“ (= MHC-II-Molekül) direkter interzellulärer Kontakt zu einer antigenpräsentierenden Zelle aufgenommen werden. In steuernder Funktion sezerniert die CD4+ Zelle in der Folge verschiedene Botenstoffe, um weitere Zellen zu aktivieren. Im Vordergrund stehen dabei das Interleukin-2, das weitere T-Zellen stimuliert, das makrophagenstimulierende Interferon- γ sowie das auf B-Zellen wirkende Interleukin-4. Mit den B-Zellen kann aber wiederum direkter Kontakt über das MHC-II-Molekül hergestellt und somit deren spezifische Antikörperproduktion in Gang gebracht werden. Neben diesen aktivierenden Prozessen kann jedoch von den CD4+ Zellen durch die Freisetzung von IL-10 auch immunsuppressive Wirkung ausgehen.

Den zweiten wichtigen Zellpool innerhalb der T-Lymphozyten bilden die CD8+ Zellen. Es gilt bereits lange als bekannt, dass innerhalb dieser Zellpopulation sowohl zytotoxische als auch suppressiv wirkende CD8+ Zellen existieren (52, 62, 63, 101). Erstere können, stimuliert durch CD4+-Zellen oder selbständig, über das MHC-I-Molekül Kontakt zu antigenpräsentierenden Zielzellen aufnehmen und diese über die Freisetzung von Perforin lysieren. Zusätzlich produzieren sie Interferon- γ sowie IL-10 (101). Demgegenüber steht die immunsuppressive Funktion des Suppressor-Zellklones, der nichtzytolytische Effektormechanismen über die Freisetzung von IL-4 vermittelt (101).

Um das Verhältnis und das immunregulatorische Gleichgewicht von beiden T-Lymphozyten-Subpopulationen besser beurteilen zu können, wird die CD4+/CD8+ Ratio als Parameter für die spezifische zelluläre Immunlage bestimmt. Alle wichtigen interstiellen Lungenerkrankungen („interstitial lung diseases“), wie z.B. Sarkoidose und Tuberkulose, gehen mit Veränderungen der CD4+ - und der CD8+ Subpopulation einher, was sich in dem sensiblen Marker der CD4+/CD8+ Ratio widerspiegelt (51, 85). Auch im Bereich der HIV-Infektion kommt der CD4+/CD8+ Ratio eine große diagnostische Bedeutung zu, da sie bei oftmals unveränderter Gesamtlymphozytenzahl die Darstel-

lung der dennoch vorhandenen Veränderungen innerhalb der CD4⁺ - sowie der CD8⁺ Zellen ermöglicht (37). Die Bestimmung der CD4⁺/CD8⁺ Ratio wurde daher auch nach experimentellem Thoraxtrauma als Parameter der Immunlage verwendet.

In den hier vorliegenden Untersuchungen zeigt sich eine Reduktion der CD3⁺ T-Lymphozyten ab dem Zeitpunkt sechs Stunden nach bilateraler stumpfer Lungenkontusion, die bis 24 Stunden nach Trauma deutlich fortschreitet und ihre maximale Ausprägung erreicht. Zu späteren Zeitpunkten lagen alle Werte wieder im Bereich der Kontrolle. Während in unseren Ergebnissen zum Zeitpunkt von sechs Stunden posttrauma sowohl die CD4⁺ Zellen als auch die CD8⁺ Zellen erniedrigte Werte gegenüber der jeweiligen Kontrolle zeigen, sind nach 24 Stunden nur noch die CD8⁺ Zellen deutlich reduziert und erscheinen somit für die T-Zell-Reduktion verantwortlich.

Betrachtet man die CD4⁺/CD8⁺ Ratio, so lässt sich 24 Stunden nach Trauma eine deutliche Erhöhung gegenüber der Kontrolle feststellen. Nach den Ergebnissen in den einzelnen T-Lymphozyten-Subpopulationen kann dies nur in der starken Reduktion der CD8⁺ T-Zellen begründet sein.

Veränderungen des T-Zell-Pools konnten nach Schädel-Hirn-Trauma, Verbrennungsverletzungen, operativer Lungengewebsverletzung, Sepsis und Polytrauma nachgewiesen werden (43, 56, 67, 79, 81, 101, 102).

Untersuchungen anderer Forschungsgruppen zeigen im Bereich der Veränderungen innerhalb der T-Lymphozyten-Subpopulationen unterschiedliche Ergebnisse. Eine Studie zu T-Zell-Veränderungen nach Verbrennung durch Zedler et al. ergab eine nur leichte, nicht signifikante Reduktion der CD8⁺-Zellen, wogegen die Werte der CD4⁺ Zellen jederzeit im Bereich der Kontrolle blieben (102). Gegensätzliche Verläufe dazu stellten andere Studien an Verbrennungspatienten sowie polytraumatisierten Patienten mit Entwicklung einer Sepsis oder eines Multorganversagens fest. Dabei waren zwar auch die Werte der CD3⁺ Population reduziert, es zeigte sich aber darüber hinaus ausschließlich eine Reduktion der CD4⁺ Zellen bei durchwegs unveränderten Werten für die CD8⁺ Subpopulation (56, 67). Eine weitere Studie bei septischen Patienten ermittelte einen gemeinsamen Rückgang aller T-Lymphozyten-Subpopulationen (43).

Wie an den dargestellten Ergebnissen aus der Literatur gut zu erkennen ist, existiert zwar Einigkeit in der Tatsache, dass eine Reduktion der CD3+ Gesamtlymphozyten nach Trauma bzw. Sepsis auftritt, in der Untersuchung der dafür verantwortlichen Subpopulationen gibt es aber unterschiedliche Ergebnisse.

Teilweise lassen sich auch keine genauen Vergleiche ziehen, da die untersuchten Zeitpunkte bzw. Zeiträume zu stark voneinander abweichen. In den eigenen Untersuchungen steht die unmittelbare Reaktion des Immunsystems nach Lungenkontusion im Vordergrund, d.h. in erster Linie die ersten 24 Stunden nach Traumatisierung. Nach sechs Stunden sind zwar auch die CD4+ Zellen gegenüber der Kontrolle erniedrigt, zum Zeitpunkt von 24 Stunden zeigen die hier vorgelegten Ergebnisse jedoch erstmals eine ausschließliche, deutliche Reduktion der CD8+ Subpopulation nach experimentellem Thoraxtrauma.

Diese im Tiermodell beobachtete Reduktion der CD8+ T-Zellen und die daraus resultierende Dysbalance der CD4+/CD8+ Ratio könnte für die nach Lungenkontusion auftretenden septischen Komplikationen wie der Kontusionspneumonie sowie einem Multiorganversagen (MOV) verantwortlich sein. In der Literatur zeigt sich tatsächlich, dass die reduzierte CD8+ Zellzahl in schwer verletzten Patienten (ISS > 20) auch von Veränderungen in der Zytokinproduktion begleitet ist (70). So kommt es zu einer verminderten Freisetzung von immunstimulierenden Zytokinen wie z.B. Interferon- γ aus CD8+ T-Zellen. Die Produktion des immunsuppressiv wirkenden Interleukin-10 bleibt jedoch erhalten (70). Die Ergebnisse einer anderen Studie an verletzten Patienten belegten einen Anstieg der Produktion von Interleukin-10 (61). Weiter konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der erhöhten IL-10 Freisetzung und der anschließenden Entwicklung septischer Komplikationen gezeigt werden (61).

Eine mögliche Ursache für den Rückgang der CD8+ Zellen könnte der programmierte Zelltod sein. Neuere Studien zeigen, dass chirurgisch verursachtes Trauma die Apoptoserate in CD8+ Zellen, allerdings auch in CD4+ Zellen erhöht, wobei die höchste Frequenz der Apoptose zum Zeitpunkt von 24 Stunden nach dem Eingriff festgestellt

wurde (19, 20, 99). In einer dieser Untersuchungen konnte sogar ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Apoptoserate innerhalb der CD8⁺ T-Zellen mit dem Auftreten von infektiösen Komplikationen in der postoperativen Beobachtungsphase belegt werden.

Die Ergebnisse unserer Studie veranschaulichen, dass die bestehende T-Zell-Dysbalance bzw. die erhöhte CD4⁺/CD8⁺ Ratio nach stumpfer bilateraler Lungenkontusion im Wesentlichen 24 Stunden nach Traumatisierung besteht. Verantwortlich dafür kann eine erhebliche Reduktion der CD8⁺ T-Zellen gemacht werden, die in dieser Ausprägung bisher nach experimentellem Thoraxtrauma noch nicht festgestellt werden konnte.

5.5 B-Zellen und natürliche Killerzellen

Die B-Lymphozyten sind in der Lage, nach Aktivierung durch die CD4⁺ T-Helfer-Zellen zu Plasmazellen zu reifen, deren Hauptaufgabe in der Produktion und Freisetzung von antigenspezifischen Antikörpern besteht (humorale Immunabwehr). Darüber hinaus existiert ein B-Zell-Klon, der den stattgehabten Antigenkontakt „speichert“ und so als Gedächtniszelle fungieren kann. Somit wird es möglich, bei einem weiteren Kontakt mit einem bereits bekannten Antigen die spezifische Antikörperproduktion sofort in großen Mengen zu induzieren (62,63).

In unseren Untersuchungen ergaben sich in der B-Lymphozytenpopulation sowie in der Population der NKR P1A⁺ natürlichen Killerzellen keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen. Das führt zu der Annahme, dass diese Zellgruppen in der Immunantwort nach Trauma keine entscheidende Rolle spielen.

6 Zusammenfassung

Das Thoraxtrauma, insbesondere als Begleitverletzung beim Polytraumatisierten, stellt eine für das Überleben des Patienten entscheidende „Schlüsselverletzung“ dar. Ziel dieser Arbeit war es, mittels eines kontaktlosen Kleintiermodells die aus der Verletzung resultierenden immunologischen Veränderungen im Bereich der Lymphozyten-Subpopulationen zu charakterisieren sowie das Immigrationsverhalten neutrophiler Granulozyten in die Lunge zu untersuchen. Hierzu wurden die auf der Durchflusszytometrie basierende FACS-Analyse („fluorescence activated cell sorter“) sowie die immunhistochemische Anti-neutrophile-Elastase-Färbung angewandt.

Die eingangs gestellten Fragen können wie folgt beantwortet werden:

1. Nach experimentellem Thoraxtrauma kann zu allen untersuchten Zeitpunkten eine massive Immigration ($p < 0,01$) von neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe beobachtet werden. Sie erreicht 24 Stunden nach Trauma ihr Maximum, danach ist das Ausmaß der Invasion rückläufig.
2. Die Untersuchung der Leukozyten im peripheren Blut zeigt zunächst eine Leukozytose in traumatisierten Tieren. Nach 24 Stunden ist jedoch eine Leukozytopenie in Traumatieren zu beobachten. Ursächlich hierfür könnte die Rekrutierung und Immigration von neutrophilen Granulozyten in verletzte Lungenareale sein. Zu späteren Zeitpunkten waren in den Gruppen keine Unterschiede mehr zu beobachten.
3. Nach experimentellem Thoraxtrauma findet sich zu den Zeitpunkten sechs Stunden und 24 Stunden posttrauma ($p < 0,01$) eine Reduktion innerhalb des CD3+ („cluster of differentiation“) T-Zellpools. Danach zeigt sich ein Normalisierungstrend in allen Subpopulationen. Während zum ersten Zeitpunkt sowohl die CD4+ - als auch die CD8+ Subpopulation erniedrigte Anteile an den Leukozyten aufweisen, erreicht die CD4+ Population nach 24 Stunden wieder Kontrollwerte. Innerhalb der CD8+ Zellen setzt sich der Trend fort und der Anteil sinkt auf ein Minimum ($p < 0,01$). Dies kann auf den möglicherweise stattfindenden programmierten Zelltod

zurückzuführen sein. Die CD4+/CD8+ Ratio ist zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma signifikant ($p < 0,01$) erhöht.

Im Bereich der B-Zellen sowie der natürlichen Killerzellen ergeben sich keine aussagekräftigen Unterschiede nach Trauma.

Schlussfolgerung:

Die hier vorgestellten Untersuchungen belegen eine deutliche Invasion neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe nach experimentellem Thoraxtrauma. Erstmals wurden die eingewanderten Granulozyten dabei direkt im Lungengewebe nachgewiesen. Im peripheren Blut bestand sechs Stunden nach Thoraxtrauma eine Granulozytose, 24 Stunden posttrauma eine Granulozytopenie. In Anbetracht dieser Untersuchungen sowie der Ergebnisse in der Literatur ist eine Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten unmittelbar nach Trauma aus dem peripheren Blut naheliegend.

Ebenfalls konnte eine Reduktion der CD8+ T-Zellen in Traumatieren nachgewiesen werden. Da eine Reduktion der CD8+ Zellzahl mit einer erhöhten Infektanfälligkeit vergesellschaftet ist, könnte dieser Rückgang für die hohe Rate an septischen Komplikationen nach Thoraxtrauma verantwortlich sein. Weitere Untersuchungen zur besseren Aufklärung dieser Veränderung wären daher empfehlenswert.

7 Literatur

1. Abraham E, Freitas AA: Hemorrhage in mice induces alterations in immunoglobulin-secreting B cells. *Crit Care Med* 17: 1015-1019 (1989)
2. Ayala A, Perrin MM, Chaudry IH: Defective macrophage antigen presentation following hemorrhage is associated with the loss of MHC class II (Ia) antigens. *Immunology* 70: 33-39 (1990)
3. Ayala A, Chung CS, Lomas JL, Song GY, Doughty LA, Gregory SH, Cioffi WG, LeBlanc BW, Reichner J, Simms HH, Grutkoski PS: Shock-induced neutrophil mediated priming for acute lung injury in mice: divergent effects of TLR-4 and TLR-4/FasL deficiency. *Am J Pathol* 161: 2283-2294 (2002)
4. Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D: Epidemiologie des Schwerverletzten. Eine prospektive Erfassung der präklinischen und klinischen Versorgung. *AG Polytrauma der DGU. Unfallchirurg* 103: 355-363 (2000)
5. Barlow Y: T lymphocytes and immunosuppression in the burned patient: a review. *Burns* 20: 487-490 (1994)
6. Behnia R, Molteni A, Waters CM, Panos RJ, Ward WF, Schnaper HW, TS' Ao CH: Early markers of ventilator-induced lung injury in rats. *Ann Clin Lab Sci* 26: 437-450 (1996)
7. Bruckner UB, Pfetsch H, Kinzl L, Bock KH, Gebhard F: Prognostische Bedeutung präklinisch erfaßter biochemischer Mediatoren beim Polytrauma. *Zentralbl Chir* 124: 303-310 (1999)
8. Calhoon JH, Trinkle JK: Pathophysiologie Of Chest Trauma. *Chest Surgery Clinics of North America* 7: 199-211 (1997)
9. Casley-Smith JR, Eckert P, Foldi-Borcso E: The fine structure of pulmonary contusion and the effect of various drugs. *Br J Exp Pathol* 57: 487-496 (1976)
10. Chandler DB, Fuller WC, Jackson RM, Fulmer JD: Fractionation of rat alveolar macrophages by isopycnic centrifugation: morphological, cytochemical, biochemical, and functional properties. *J Leukoc Biol* 39: 371-383 (1986)
11. Clark GC, Schecter WP, Trunkey DD: Variables Affecting Outcome in Blunt Chest Trauma: Flail Chest vs. Pulmonary Contusion. *J Trauma* 28: 298-304 (1998)
12. Clark SL, Ward J: The effects of rapid compression waves on animals submerged in water. *Surg Gynecol Obstet* 77: 403-407 (1943)

13. Clemendson CJ, Hultman H: Air embolism and cause of death in blast injury. *The military surgeon* 6: 424-437 (1954).
14. Clemendson CJ: Blast injury. *Physiology* 36: 336-402 (1956)
15. Cohn SM, Zieg PM: Experimental pulmonary contusion: review of the literature and description of a new porcine model. *J Trauma* 41: 565-571 (1996)
16. Daniel RA, Cate WR: "Wet lung" – An experimental study. *Ann Surg* 127: 836-847 (1948)
17. Davis KA, Fabian TC, Ragsdale N, Trentham LL, Croce MA, Proctor KG: Combination therapy that targets secondary pulmonary changes after abdominal trauma. *Shock* 15: 479-484 (2001)
18. Dayal SD, Hauser CJ, Feketeova E, Fekete Z, Adams JM, Lu Q, Xu DZ, Zaets S, Deitch EA: Shock mesenteric lymph-induced rat polymorphonuclear neutrophil activation and endothelial cell injury is mediated by aqueous factors. *J Trauma* 52: 1048-1055 (2002)
19. Delogu G, Moretti S, Antonucci A, Marcellini S, Masciangelo R, Famularo G, Signore L, De Simone C: Apoptosis and surgical trauma: dysregulated expression of death and survival factors on peripheral lymphocytes. *Arch Surg* 135: 1141-1147 (2000)
20. Delogu G, Famularo G, Moretti S, De Luca A, Tellan G, Antonucci A, Marandola M, Signore L: Interleukin-10 and apoptotic death of circulating lymphocytes in surgical/anesthesia trauma. *J Trauma* 51: 92-97 (2001)
21. Dodd KT, Mundie TG, Lagutchik MS, Morris JR: Cardiopulmonary effects of high-impulse noise exposure. *J Trauma* 43: 656-666 (1997)
22. Donnelly SC, MacGregor I, Zamani A, Gordon MWG, Robertson CE, Steedman DJ, Little K, Haslett C: Plasma elastase levels and the development of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 1428-1433 (1995)
23. Döring G: The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 114-117 (1994)
24. Ertel W, Trentz O: Polytrauma und Multiorgan-Dysfunktionssyndrom (MODS). Definition – Pathophysiologie – Therapie. *Zentralbl Chir* 119: 159-167 (1994)
25. Faist E, Wichmann MW: Immunologie bei Schwerverletzten. *Chirurg* 68: 1066-1070 (1997)
26. Fels AO, Cohn ZA: The alveolar macrophage. *J Appl Physiol* 60: 353-369 (1986)

27. Fricke R, Bartel M: Tierexperimentelles Modell zur Lungenkontusion. *Z Exp Chir* 15: 172-176 (1982)
28. Fujikawa T, Yukioka T, Ishimaru S, Kanai M, Muraoka A, Sasaki H, Honma H, Koika S, Kawaguchi S: Endovascular Stent Grafting for the Treatment of Blunt Thoracic Injury. *J Trauma* 50: 223-229 (2001)
29. Fulton RL, Peter ET: The progressive nature of pulmonary contusion. *Surgery* 67: 499-506 (1970)
30. Gando S, Kameue T, Nanzaki S, Hayakawa T, Nakanishi Y: Increased neutrophil elastase, persistent intravascular coagulation, and decreased fibrinolytic activity in patients with posttraumatic acute respiratory distress syndrome. *J Trauma* 42: 1068-1072 (1997)
31. Gebhard F, Kaffenberger W, Hartel W: Peripheral blood immune responses to surgically induced lung tissue injury. *Eur Surg Res* 26: 156-162 (1994)
32. Gebhard F, Kelbel MW, Strecker W, Kinzl L, Bruckner UB: Chest trauma and its impact on the release of vasoactive mediators. *Shock* 7: 313-317 (1997)
33. Gebhard F, Marzinzig M, Hartel W, Bruckner UB: Systemic release of prostanoids after surgically-induced injury of lung tissue. *Langenbeck Arch Chir* 382: 243-251 (1997)
34. Gibbs DF, Warner RL, Weiss SJ, Johnson KJ, Varani J: Characterization of matrix metalloproteinases produced by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 1136-1144 (1999)
35. Goris RJ, te Boekhorst TP, Nuytinck JK, Gimbere JS: Multiple organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Arch Surg* 120: 1109-1115 (1985)
36. Gosling P: The cellular, immune and metabolic response to trauma. *Crit Rev Clin Lab Sci* 35: 59-112 (1998)
37. Grossman Z, Herberman RB, Vatnik N, Intrator N: Conservation of total T-cell counts during HIV infection: alternative hypotheses and implications. *Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 17: 450-457 (1998)
38. Gutteridge JM, Halliwell B: Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 899: 136-147 (2000)
39. Guy RJ, Kirkman E, Watkins PE, Cooper GJ: Physiologic responses to primary blast. *J Trauma* 45: 983-987 (1998)
40. Haslett C: Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 5-11 (1999)

41. Hellinger A, Konerding MA, Malkusch W, Obertacke U, Redl H, Bruch J, Schlag G: Does lung contusion affect both the traumatized and the noninjured lung parenchyma? A morphological and morphometric study in the pig. *J Trauma* 39: 712-719 (1995)
42. Hoff SJ, Shotts SD, Eddy VA, Morris jr. JA: Outcome of isolated pulmonary contusion in blunt trauma patients. *Am Surg* 60: 138-142 (1994)
43. Holub M, Kluckova Z, Beneda B, Hobstova J, Huzicka I, Prazak J, Lobovska A: Changes in lymphocyte subpopulations and CD3+/DR+ expression in sepsis. *Clin Microbiol Infect* 6: 657-660 (2000)
44. Hopkinson BR, Border JR, Schenk jr. WG: Experimental closed chest trauma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 55: 580-585 (1968)
45. Hunt JP, Baker CC, Lentz CW, Rutledge RR, Oller DW, Flowe KM, Nayduch DA, Smith C, Clancy TV, Thomason MH, Meredith JW: Thoracic aorta injuries: management and outcome of 144 patients. *J Trauma* 40: 547-555 (1996)
46. Inthorn D, Huf R: Das Thoraxtrauma beim Mehrfachverletzten. *Notfallmed Schmerzther* 27: 498-501 (1992)
47. Irwin RJ, Lerner MR, Bealer JF, Brackett DJ, Tuggle DW: Cardiopulmonary physiology of primary blast injury. *J Trauma* 43: 650-655 (1997).
48. Irwin RJ, Lerner MR, Bealer JF, Lightfoot SA, Brackett DJ, Tuggle DW: Global primary blast injury: a rat model. *J Okla State Med Assoc* 91: 387-392 (1998)
49. Ishii H, Ishibashi M, Takayama M, Nishida T, Yoshida M: The role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 in neutrophil-mediated remote lung injury after intestinal ischaemia/reperfusion in rats. *Respirology* 5: 325-331 (2000)
50. 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)
51. Kantrow SP, Meyer KC, Kidd P, Raghu G: The CD4/CD8 ratio in BAL fluid is highly variable in sarcoidosis. *Eur Respir J* 10: 2716-2721 (1997)
52. Kaufmann SHE: Lymphokine, Interleukine, Zytokine: Funktion und Wirkmechanismus. *Immun Infekt* 15: 127-134 (1987)
53. Kellermann W, Frentzel-Beyme R, Welte M, Jochum M: Phospholipase A in acute lung injury after trauma and sepsis: its relation of the inflammatory mediators PMN-elastase, C3a, and neopterin. *Klin Wochenschr* 67: 190-195 (1989)
54. Kinoshita M, Ono S, Mochizuki H: Neutrophils mediate acute lung injury in rabbits: role of neutrophil elastase. *Eur Surg Res* 32: 337-346 (2000)

55. Krohn PL, Whitteridge D, Zuckerman SH: Physiological effects of blast. *Lancet* 28: 252-258 (1942)
56. Lebedev MY, Sholkina MN, Utkina TM, Vilkov SA, Korablev SB, Golubcova NV, Baryshnikov AY, Novikov VV: Immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in patients with burns. *Russ J Immunol* 6: 47-54 (2001)
57. Liener UC, Gebhard F, Kinzl L: Unfallchirurgie 2020. Entwicklungen der Vergangenheit- Herausforderungen und Perspektiven der Zukunft. *Unfallchirurgische Versorgung* 102: 413-420 (1999)
58. Liener UC, Knoferl MW, Strater J, Barth TF, Pauser EM, Nussler AK, Kinzl L, Bruckner UB, Gebhard F: Induction of apoptosis following blunt chest trauma. *Shock* 20: 511-516 (2003)
59. Liener UC: Immunologische Veränderungen nach experimentellem Thorax-trauma. *Med Habilitationsschrift, Universität Ulm* 2004
60. Liener UC, Rapp U, Lampl L, Helm M, Richter G, Wildner M, Gaus A, Kinzl L, Gebhard F: Inzidenz schwerer Verletzungen. Ergebnisse einer populationsbezogenen Untersuchung. *Unfallchirurg* 107: 483-490 (2004)
61. Lyons A, Kelly JL, Rodrick ML, Mannick JA, Lederer JA: Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection. *Ann Surg* 226: 450-460 (1997)
62. Mackay I, Rosen FS: The Immune System, First of two parts. *N Engl J Med* 343: 37-49 (2000a)
63. Mackay I, Rosen FS: The Immune System, Second of two parts. *N Engl J Med* 343: 108-117 (2000b)
64. McSwain Jr. NE : Blunt and Penetrating chest Injuries. *World J Surg* 16: 924-929 (1992)
65. Meert KL, Ofenstein JP, Sarnaik AP: Altered T cell cytokine production following mechanical trauma. *Ann Clin Lab Sci* 28: 283-288 (1998)
66. Melton SM, Davis KA, Moomey jr. CB, Fabian TC, Proctor KG: Mediator-dependent secondary injury after unilateral blunt thoracic trauma. *Shock* 11: 396-402 (1999)
67. Menges T, Engel J, Welters I, Wagner RM, Little S, Ruwoldt R, Wollbrueck M, Hempelmann G Changes in blood lymphocyte populations after multiple trauma: association with posttraumatic complications. *Crit Care Med* 27: 733-740 (1999)
68. Moomey jr. CB, Fabian TC, Croce MA, Melton SM, Proctor KG: Determinants of myocardial performance after blunt chest trauma. *J Trauma* 45: 988-996 (1998)

69. Moseley RV, Vernick JJ, Doty DB: Response to blunt chest injury: a new experimental model. *J Trauma* 10: 673-683 (1970)
70. Murphy T, Paterson H, Rogers S, Mannick JA, Lederer JA: Use of intracellular cytokine staining and bacterial superantigen to document suppression of the adaptive immune system in injured patients. *Ann Surg* 238: 401-411 (2003)
71. Nast-Kolb D, Waydhas C, Jochum M, Duswald KH, Machleidt W, Spannagl M, Schramm W, Fritz H, Schweiberer L: Biochemische Faktoren als objektive Parameter zur Prognoseabschätzung beim Polytrauma. *Unfallchirurg* 95: 59-66 (1992)
72. Nichols RT, Pearce HJ, Greenfield LJ: Effects of experimental pulmonary contusion on respiratory exchange and lung mechanics. *Arch Surg* 96: 723-730 (1968)
73. Obertacke U, Redl H, Schlag G, Schmit-Neuerburg KP: Lokale und systemische Reaktionen nach Lungenkontusion. *Hefte zu Der Unfallchirurg* 240: 98-126 (1994)
74. Obertacke U, Neudeck F, Majetschak M, Hellinger A, Kleinschmidt C, Schade FU, Hogasen K, Jochum M, Strohmeier W, Thurnher M, Redl H, Schlag G: Local and systemic reactions after lung contusion: an experimental study in the pig. *Shock* 10: 7-12 (1998)
75. Oettinger W, Mayo K, Stager MA, Fischer N, Engst U, Hansen jr. ST: Thromboxan-A₂ und Granulozyten-Elastase nach schwerem Trauma – Beziehungen zu Verlaufskomplikationen und Überlebensraten. *Wiener Klinische Wochenschrift* 23: 805-813 (1989)
76. Ordemann J, Jacobi CA, Schwenk W, Stosslein R, Muller JM: Cellular and humoral inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections. *Surg Endosc* 15: 600-608 (2001)
77. Pallister I, Dent C, Topley N: Increased neutrophil migratory activity after major trauma: a factor in the etiology of acute respiratory distress syndrome? *Crit Care Med* 30: 1717-1721 (2002)
78. Parsey MV, Tudor RM, Abraham E: Neutrophils are major contributors to intraparenchymal lung IL-1 β Expression after hemorrhage and endotoxemia. *The Journal of Immunology* 160: 1007-1013 (1998)
79. Pellegrini JD, De AK, Kodys K, Puyana JC, Furse RK, Miller-Graziano C: Relationships between T lymphocyte apoptosis and anergy following trauma. *J Surg Res* 88: 200-206 (2000)
80. Pretre R, Chilcott M: Blunt Trauma of the Heart and Great Vessels. *N Eng J Med* 336: 626-632 (1997)

81. Quattrocchi KB, Issel BW, Miller CH, Frank EH, Wagner Jr. FC: Impairment of helper T-cell function following severe head injury. *Journal of Neurotrauma* 9: 1-9 (1992)
82. Ratliff JL: The risk of anticoagulation with experimental pulmonary contusion. *Arch Surg* 109: 802-804 (1974)
83. Richardson JD, Adams L, Flint LM: Selective management of flail chest and pulmonary contusion. *Ann Surg* 196: 481-487 (1982)
84. Rose S, Marzi I: Pathophysiologie des Polytraumas. *Zentralbl Chir* 121: 896-913 (1996)
85. Semenzato G, Adami F, Maschio N, Agostini C: Immune mechanisms in interstitial lung diseases. *Allergy* 55: 1103-1120 (2000).
86. Shijo H, Iwabuchi K, Hosoda S, Watanabe H, Nagaoka I, Sakakibara N: Evaluation of neutrophil functions after experimental abdominal surgical trauma. *Inflamm Res* 47: 67-74 (1998)
87. Shorr RM, Crittenden M, Indeck M, Hartunian SL, Rodriguez A: Blunt Thoracic Trauma. Analysis of 515 Patients. *Ann Surg* 206: 200-205 (1987)
88. Sibille Y, Reynolds HY: Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* 141: 471-501 (1990)
89. Slutsky AS: Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest* 116: 9-15 (1999)
90. Souza Jr. AL, Poggetti RS, Fontes B, Birolini D: Gut ischemia/reperfusion activates lung macrophages for tumor necrosis factor and hydrogen peroxide production. *J Trauma* 49: 232-236 (2000)
91. Strong VE, Mackrell PJ, Concannon EM, Naama HA, Schaefer PA, Shaftan GW, Stapleton PP, Daly JM: Blocking prostaglandin E2 after trauma attenuates pro-inflammatory cytokines and improves survival. *Shock* 14: 374-379 (2000)
92. Sutton ET, Norman J, Rao PS, Graham LB, Newton CA, Richards IS: Pulmonary endothelial and epithelial integrity and neutrophil infiltration after endotoxin in interleukin-1 receptor knockout mice. *Shock* 13: 117-125 (2000)
93. Tamura DY, Moore EE, Partrick DA, Johnson JL, Offner PJ, Silliman CC: Acute hypoxemia in humans enhances the neutrophil inflammatory response. *Shock* 17: 269-273 (2002)
94. Tate RM, Repine JE: Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 128: 552-559 (1983)

95. Tremblay LN, Slutsky AS: Ventilator-induced injury: from barotrauma to bio-trauma. *Proc Assoc Am Physicians* 110: 482-488 (1998)
96. Trinkle JK, Furman RW, Hinshaw MA, Bryant LR, Griffen WO: Pulmonary contusion. Pathogenesis and effect of various resuscitative measures. *Ann Thorac Surg* 16: 568-573 (1973)
97. Trupka A, Nast-Kolb D, Schweiberer L: Das Thoraxtrauma. *Unfallchirurg* 101: 244-258 (1998)
98. Wang S, Fang P, Xu W: The role of PMNs in early progressive injury of deep partial-thickness burn wound. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 16: 46-49 (2000)
99. Yamada R, Tsuchida S, Hara Y, Tagawa M, Ogawa R: Apoptotic lymphocytes induced by surgical trauma in dogs. *J Anesth* 16: 131-137 (2002)
100. Yamashita S, Nishimaki H, Lin ZB, Imai H, Kumagai K, Shindo M, Isobe Y, Soma K, Ohara K, Owada T: Endovascular Stent-Graft Placement for Thoracic Aortic Injury: Case Report. *J Trauma* 51: 587-590 (2001)
101. Zedler S, Faist E, Ostermeier B, von Donnersmarck GH, Schildberg FW: Postburn constitutional changes in T-cell reactivity occur in CD8+ rather than in CD4+ cells. *J Trauma* 42: 872-881 (1997)
102. Zedler S, Bone RC, Baue AE, von Donnersmarck GH, Faist E: T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med* 27: 66-72 (1999)

8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Florian Gebhard für die Überlassung des Themas, für die materielle Förderung sowie sein ausgezeichnetes Engagement.

Herrn PD Dr. med. Ulrich C. Liener gilt mein besonderer Dank für die hervorragende Betreuung während des gesamten Projektes, seine stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung, die für die Erstellung dieser Arbeit maßgeblich waren.

Dank gebührt darüber hinaus insbesondere der MTA Silke Beil für ihre geduldige und kompetente Hilfestellung bei allen Versuchsdurchführungen im Labor und die freundschaftlich angenehme Zusammenarbeit.

Für die gegenseitige Hilfe und Motivation möchte ich mich außerdem bei meinen Doktoranden-Kollegen Evi Pauser, Sven Marquardt und Matthias Kurz bedanken, ebenso wie bei den weiteren Mitarbeitern aus dem Traumalabor, PD Dr. med. Markus Knöferl, Dr. med. Markus Huber-Lang sowie der MTA Sonja Braumüller.

Dank gilt daneben auch dem gesamten Team der allgemeinchirurgischen Forschungsgruppe für das Überlassen ihrer Arbeitsgeräte.

Judith Pradler danke ich für die große Hilfe in computertechnischen, statistischen und grammatikalischen Fragen sowie für ihre Geduld und ihren Beistand.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und die wertvolle moralische Unterstützung zu jeder Zeit.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	<u>Michael</u> Alexander Kopetzky
Geburtsdatum	28.10.1977
Geburtsort	Traunstein
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Ledig

Schulische Ausbildung

1984 - 1988	Grundschule Haslach
1988 - 1997	Chiemgau-Gymnasium Traunstein
06-1997	Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

04-2000	Freistellung vom Wehrdienst
---------	-----------------------------

Studium

1997 - 2004	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
-------------	---

Prüfungen

08-1999	Ärztliche Vorprüfung
08-2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03-2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05-2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

03-2000	Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungs- chirurgie des Kreiskrankenhauses Traunstein (Prof. Dr. R. Ketterl)
03-2001	Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungs- chirurgie des Universitätsklinikums Ulm (Prof. Dr. L. Kinzl)
08-2001	Abteilung für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Krankenanstalt Rudolfstiftung in Wien (Dr. B. Welleschik)
03-2002	Praxis für Orthopädie, Sportmedizin und Chirotherapie Dres. med. J. Winter/H. Müller-Kittnau in Traunreut

Praktisches Jahr

Innere Medizin	Abteilung für Gastroenterologie, Innere I des Klinikums Kempten, Chefarzt Dr. W. Angeli
Chirurgie	1. Abteilung für Allgemeinchirurgie des Klinikums Kempten, Chefarzt Prof. Dr. M. Neher/ PD Dr. P. Sterk 2. Abteilung für Unfall-, Hand und Wiederherstellungschirurgie, Chefarzt Prof. Dr. T. Mischkowski
Orthopädie	Orthopädische Klinik des Kantonsspital Luzern (CH), Chefarzt Dr. A. E. Staubli

Studienbegleitende Tätigkeiten

SS 2000	Versuchsbetreuer und Tutor im Physiologie-Praktikum, Versuch Hör- und Gleichgewichtsorgan
SS 2002	Teilnahme am Orthopädie-Seminar des Rehabilitationskrankenhauses der Universität Ulm

Berufstätigkeit

Seit 08-2004	AiP/Assistenzarzt in der Abteilung für Neurochirurgie am Klinikum der Barmherzigen Brüder Regensburg, Chefarzt Dr. A. Müller
--------------	--

Regensburg, 25. November 2005