

Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Chirurgie

Klinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. F. Gebhardt

**Lipidperoxidation und lokale histologische
Veränderungen nach experimentellem
Thoraxtrauma im Tiermodell der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Universität Ulm

vorgelegt von

Sven Marquardt

aus Ravensburg

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. U.C. Liener

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Kornmann

Tag der Promotion: 11.05.2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Epidemiologische Bedeutung von Thoraxtraumen	1
1.2.	Letalität und Pathogenese des Thoraxtraumas	1
1.3.	Pathogenese des Thoraxtraumas	4
1.4.	Immunologische Reaktionen	5
1.5.	Untersuchungen am Tiermodell	8
1.6.	Ziel der vorliegenden Arbeit	10
2.	Material und Methoden	11
2.1.	Versuchsaufbau	11
2.1.1.	Druckwellengenerator	11
2.1.2.	Narkose und Monitoring	13
2.1.3.	Tierversuch	13
2.1.4.	Tötung und Begutachtung der Tiere	14
2.1.5.	Organentnahme	15
2.2.	Probenaufarbeitung für weitere Untersuchungen	15
2.2.1.	Probenvorbereitung	15
2.2.2.	Gewebeeinwaage	16
2.2.3.	Gewebehomogenisation	17
2.2.4.	Mikroskopische Betrachtung	17
2.2.5.	Messmethodik der Myeloperoxidase (MPO)	18
2.2.6.	Malonsäuredialdehyd (MDA)	19
2.2.7.	Prostaglandine	22
2.2.7.1.	6-Keto-PGF _{1α}	22
2.2.7.2.	13,14-Dihydro-15-Keto-PGF _{2α}	24
2.3.	Statistische Methoden	26
3.	Ergebnisse	27
3.1.	Makroskopische Ergebnisse	27
3.2.	Mikroskopische Ergebnisse	28
3.3.	Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe	34
3.4.	Myeloperoxidaseaktivität im Lebergewebe	35
3.5.	Malonsäuredialdehyd (MDA) im Lungengewebe	37
3.6.	Malonsäuredialdehyd (MDA) im Lebergewebe	38
3.7.	Prostaglandine	39
3.7.1.	Prostaglandin 13,14-Dihydro-15-Keto-PGF _{2α} (PGM)	39
3.7.2.	Prostaglandin 6-Keto-PGF _{1α} (Prostazyklin)	40

4.	Diskussion	41
4.1.	Validität des Versuchsaufbaus	41
4.2.	Mikroskopische Ergebnisse	42
4.3.	Mediatorfreisetzung	45
4.3.1.	Myeloperoxidase und Malonsäuredialdehyd	45
4.3.2.	Prostaglandine	50
4.4.	Fazit der Studie	56
5.	Zusammenfassung	59
6.	Literaturverzeichnis	61

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
cm	Zentimeter
EIA	Enzyme Immunosorbent Assay (Enzymimmuntest)
Fa.	Firma
H&E	Hematoxylin-Eosin
HETE	Hydroxyeicosatetraeonsäure
g	Gramm
°C	Grad Celsius
h	Stunde
IL-4, IL-10	Interleukin-4, Interleukin-10
ISS	Injury Severity Score
K	Kontrollgruppe
KPP	Kaliumphosphatpuffer
MDA	Malonsäuredialdehyd
Max	Maximum
Med	Median
Min	Minimum
mg	Milligramm
µm	Mikrometer
mM	Millimol
µmol	Mikromol
MW	Mittelwert
MOV	Multiorganversagen
MPO	Myeloperoxidase
n	absolute Häufigkeit (Anzahl)
n.s.	nicht signifikant
(p _a O ₂)	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PNM	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostacyclin I ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGH ₂	Prostaglandin-Endoperoxid
PGM	13,14-Dihydro-15-Keto-Prostaglandin F _{2α}
%	Prozent
p-Wert	Signifikanzniveau
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
Tx-Gruppe	Thoraxtraumagruppe
U	Unit

1. Einleitung

1.1. Epidemiologische Bedeutung von Thoraxtraumen

In Deutschland verunfallen jährlich etwa 8 Mio. Personen. Dabei erliegen zwischen 20.000 - 25.000 Personen ihren Verletzungen (Statistisches Bundesamt 1998, Statistisches Bundesamt 2001, www.baua.de 2000). In der Altersgruppe der unter 40jährigen ist der Unfalltod die führende Todesursache (Calhoon und Trinkle 1997, Champion et al. 1990). Hieraus resultiert ein Verlust an produktiven Lebensjahren, der von wesentlich größerer gesellschaftlicher und volkswirtschaftlicher Bedeutung ist, als jener durch Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems, welche aber insgesamt die häufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland darstellen (Statistisches Bundesamt 1998).

Polytraumatisierte Patienten erleiden in 44-60% neben Verletzungen von Schädel und Extremitäten auch Thoraxverletzungen (Bardenheuer et al. 2000, Gebhard et al. 1997a, Goff 1994, Knöferl et al. 2003, Liener et al. 2004, Calhoon und Trinkle 1997). 51% der polytraumatisierten Patienten mit nach einem Injury Severity Score (ISS) bewerteten Punktestand von ≥ 16 weisen ein begleitendes Thoraxtrauma auf (Liener et al. 2002). Bei ca. 19.000 schwer- und mehrfachverletzten Patienten mit einem ISS > 16 Punkten errechnen sich damit pro Jahr etwa 9.000 Personen in Deutschland mit einem derartigen Trauma, das in seiner Verletzungsschwere in ca. 80% der Fälle als gravierend eingestuft werden muss.

Das Thoraxtrauma spielt bei diesen Patienten bezüglich eines traumabedingten Todes eine Schlüsselrolle (Gebhard et al. 1997a, Melton et al. 1999, Raghavendran et al. 2005).

1.2. Letalität und Pathogenese des Thoraxtraumas

Ein stumpfes Thoraxtrauma ist mit einer höheren Mortalität als penetrierende Verletzungen assoziiert (Calhoon und Trinkle 1997). Das daraus resultierende, akute respiratorische Distress-Syndrom führt zu sehr hohen Mortalitätsraten von 10-25% bei

Erwachsenen (Davis et al. 1999, Davis et al. 2000, Desselle et al. 2001, Einsiedel et al. 2003, Raghavendran et al. 2005).

Ein Thoraxtrauma kann prinzipiell alle intrathorakal gelegenen Organe schädigen (Fujikawa et al. 2001, Hunt et al. 1996, McSwain 1992, Pretre und Chilcott 1997). Schwerwiegende kardiale Verletzungen oder Gefäßverletzungen wie die Aortenruptur können zwar unmittelbar zum Tode führen, dennoch werden Letalität und Morbidität des Thoraxtraumas vorwiegend durch die Lungenkontusion bestimmt (Fujikawa et al. 2001, Pinilla 1982, Shorr et al. 1987). Die Prognose schwer mehrfachverletzter Patienten hängt einerseits von der Summe der Verletzungen ab, andererseits jedoch auch von deren Lokalisation und Art. In über der Hälfte der unfallbedingten Todesfälle spielen begleitende stumpfe Thoraxverletzungen eine prognostisch wichtige Rolle (Nast-Kolb et al. 1992, Regel et al. 1993).

In einer prospektiven Studie an 100 Patienten betrug die Letalität polytraumatisierter Patienten mit Thoraxtrauma 23%, in einem Kollektiv mit ähnlicher Verletzungsschwere ohne zusätzliche Brustkorbverletzung jedoch weniger als 4% (Nast-Kolb et al. 1992). Damit kann man das Thoraxtrauma mit begleitender, schwerer Lungenkontusion ähnlich wie das Schädel-Hirn-Trauma als Schlüsselverletzungen bezeichnen, welche bei polytraumatisierten Patienten einen entscheidenden Einfluss auf das Überleben hat (Pinilla 1982).

Ursache für die wachsende Problematik ist einerseits ein Anstieg der Brustkorbverletzungen durch die zunehmende Rasanz der Unfallmechanismen bei Verkehrsunfällen bzw. Stürzen aus großer Höhe, außerhalb Deutschlands aber auch im militärischen Bereich auf der Basis von kriegerischer Auseinandersetzungen durch nicht-penetrierende Verletzungen, die von modernen Waffen erzeugt werden (Cannon 2001, Cernak et al. 1999a, Johnston 2004, Regel et al. 1995).

Andererseits überleben heute immer mehr schwerstverletzte Patienten, die früher direkt am Unfallort verstorben wären, die ersten Stunden, da die präklinische Behandlung und die Transportzeiten in die Klinik sehr effizient bzw. kurz sind (Einsiedel et al. 2003, Gavelli et al. 2002).

Ogleich neben der Schädel-Hirn-Verletzung auch der Verletzung der Thoraxorgane eine Schlüsselbedeutung bei polytraumatisierten Patienten zukommt, ist das Ausmaß

der Verletzungen trotz suffizienter Bildgebung nicht immer von Anfang an in der Klinik klar erkennbar (Einsiedel et al. 2003).

Die Frühletalität dieser Patienten in der Klinik innerhalb der ersten 48 Stunden nach dem Unfall resultiert meist aus der direkten, vital gefährdenden Gewalteinwirkung mit nachfolgendem, traumatisch-hämorrhagischen Schock bzw. aus schweren Hirnschädigungen. Die unfallbedingte Spätletalität ist hingegen meistens die Folge von Komplikationen wie Organversagen oder Sepsis (Brückner et al. 1999). Häufig ist im weiteren Verlauf eine vorher nicht absehbare Verschlechterung der Lungenfunktion zu beobachten, die bis zu einem beatmungspflichtigen Lungenversagen führen kann (Dresing et al. 1994, Pape et al. 2000, Trupka et al. 1997).

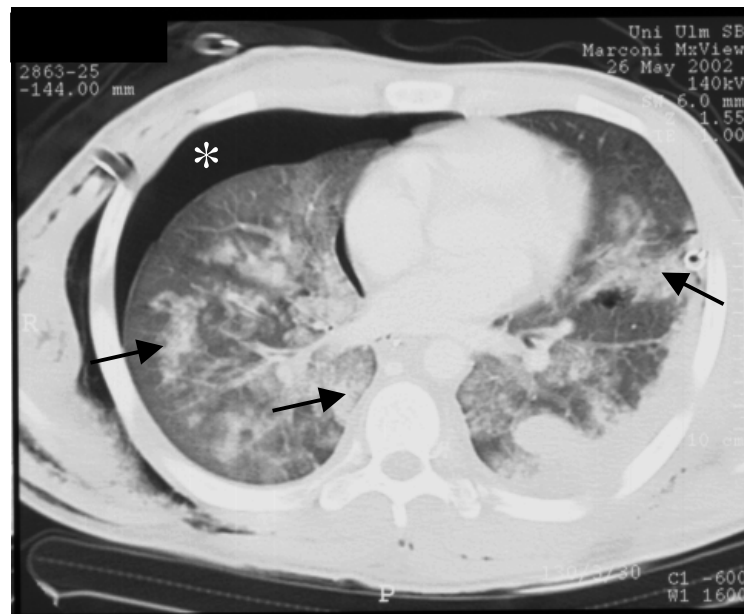


Abbildung 1: Computertomographie eines 17 jährigen männlichen Patienten mit unfallbedingtem Thoraxtrauma. Deutlich sichtbar sind die kontusionierten Gewebsareale beider Lungen (Pfeile) mit einem Pneumothorax rechts (Stern).

Die in den konventionellen Bildaufnahmen und sogar der Computertomographie initial erkennbaren Veränderungen korrelieren nicht immer zuverlässig mit der Schwere des Parenchymschadens (Garfield und Howard-Griffin 2000, Girisgen et al. 2002).

1.3. Pathogenese des Thoraxtraumas

Unabhängig vom auslösenden Schädigungsmechanismus werden durch Verletzungen des Lungengewebes spezifische Akutreaktionen ausgelöst, die im Kreislauf nachweisbar sind. Es kommt zu Abrissen von Gefäßen, Bronchien, Einblutungen sowie Atelektasen. Histologisch erkennt man Parenchymdestruktionen, rupturierte Alveolarmembranen sowie alveoläre und bronchiale Hämorrhagien (Cohn 1997, Dodd et al. 1997). Im Verlauf folgt dann ein proteinreiches, interstitielles und alveoläres Ödem auf der Basis einer erhöhten alveolokapillären und mikrokapillären Permeabilität. Die muzinäre Clearance ist vermindert, die Surfactant-Produktion reduziert, es kommt zu alveolärem Kollaps und in der Folge zu herabgesetzter pulmonaler Compliance (Burford und Burbank 1945, Cohn 1997, Kelly et al. 2003, Obertacke et al. 1994, Oppenheimer et al. 1997).

Tierexperimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass bei stumpfen Thoraxtraumen sowohl mit als auch ohne Lungenkontusion mechanische Zerstörungen in der Mikrostrombahn der Lungengefäße zu einem vielfältigen, kapillaren Leck führten, so dass Blut in das Interstitium und die Alveolen übertreten konnte (Hellinger et al. 1993).

Begleitet wird das posttraumatische Lungenödem von spezifischen histologischen Veränderungen, insbesondere der Infiltration und Degranulation von neutrophilen Granulozyten und Freisetzung zahlreicher Mediatoren (v.a. Prostanoiden), die nicht nur in der betroffenen, sondern auch in der kontralateralen Lunge zu Veränderungen führen (Davis et al. 1999, Davis et al. 2000). Bei der direkten Lungenverletzung äußert sich die von Mediatoren vermittelte Gewebsläsion durch eine Leukostase in den Lungenskapillaren und Migration von Entzündungszellen (z.B. PNM-Granulozyten, Lymphozyten) (Davis et al. 2000).

Die primär und sekundär geschädigten Lungenareale sind minderbelüftet, wobei der Euler-Liliestrand-Reflex über eine lokale, hypoxische Vasokonstriktion, eine regionale Minderdurchblutung und Perfusionsumverteilung zugunsten besser ventilierter Lungenareale bewirkt. Allerdings ist dieser Regelmechanismus in seiner Wirksamkeit begrenzt, so dass es zu einem funktionellen Rechts-Links-Shunt kommt. Es resultiert eine eingeschränkte Lungenfunktion, eine pulmonale Insuffizienz, eine Hypoxämie und eine Hyperkapnie (Irwin et al. 1997a).

Bei nahezu allen schweren Thoraxverletzungen kommt es zu einem maschinell beatmungspflichtigen Lungenversagen. Daneben sind die häufigsten, behandlungsbedürftigen Komplikationen Pneumonien, die in etwa der Hälfte der Fälle auftreten, so wie das Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS) (Keel und Trentz 2005, Perl et al. 2005, Miller et al. 2001, Miller et al. 2002, Regel et al. 1988, Rose und Marzi 1996). Unter ARDS versteht man eine auch unter Beatmungstherapie in drei Stadien progredient verlaufende, respiratorische Insuffizienz mit schwerer Dyspnoe, Tachypnoe, sauerstoffrefraktärer Zyanose, reduzierter Lungen-compliance und diffusen alveolären Infiltrationen im Thorax-Röntgenbild, das sich in etwa 40% der Fälle nach schwerem Thoraxtrauma entwickelt (Keel und Trentz 2005).

Bei etwa 75% der Patienten mit einem direkten Thoraxtrauma kommt es zu einem posttraumatischen, akuten Lungenversagen. Diese Patienten entwickeln in der Folge fast alle ein Multiorganversagen (MOV) (Brückner et al. 1999, Pape et al. 2000). Prädisponierend für ein MOV sind der hypovolämische Schock, Massentransfusionen und traumatische Gewebsverletzungen wie die Lungenkontusion (Brückner et al. 1999).

1.4. Immunologische Reaktionen

Jede Gewebeschädigung, unabhängig, ob durch Trauma, Infektion, endo- oder exogene Noxen provoziert, löst eine sogenannte Entzündungsreaktion aus, wobei man zwischen einer lokalen Reaktion mit einer ausgeprägten Extravasation von Leukozyten, einer Phospholipase A₂ (PLA₂)-induzierten Bildung von Entzündungsmediatoren des Arachidonsäurestoffwechsels sowie einer Freisetzung inflammatorischer Zytokine (z.B. durch Makrophagen oder Endothelzellen) unterscheidet. Auf der anderen Seite kann es aber auch zu einer systemischen Reaktion (SIRS) kommen, die zwar ebenfalls durch primär am Läsionsort gebildete, inflammatorische Zytokine ausgelöst wird (z.B. Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin-1, Interleukin-6) sowie andere Mediatoren mit zunächst ortsgebundener Wirkung. Später kommen systemische Fernwirkungen hinzu und es treten die durch Eicosanoide (Abbauprodukte der Arachidonsäure, Thromboxan A₂, Prostazylin, Leukotriene, Lipoxine, HETE/Hydroxyeicosatetraensäure)

vermittelten Effekte in den Vordergrund (Baue 1993). Alle diesen Faktoren gemeinsam ist die Auslösung einer systemischen Entzündungsreaktion bei gleichzeitig lokal regulierender Wirkung.

Bei jeder Gewebsverletzung, also auch bei einer Verletzung der Lunge, kommt es zunächst zu einer lokalen Vasodilatation, zu einer Anhäufung aus der Blutbahn stammender, polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PNM) und Makrophagen via Chemotaxis. Ferner kommt es zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität für Wasser und großmolekulare Eiweißkörper (Balk et al. 1988). Tritt ein Schockzustand hinzu, tragen auch Endothelzellen in der Lunge durch PNM-Adhärenz zu einer zusätzlichen, lokalen Gewebsschädigung bei. Neben den seit Jahren bekannten klassischen Mediatoren wie Histamine und Bradykinine werden auch Produkten aus dem Arachidonsäuremetabolismus sowie toxischen Sauerstoffspezies und Proteasen (vor allem aus Granulozyten) zunehmende Bedeutung für Störungen des Gefäßtonus und der Gefäßpermeabilität in der Mikrostrombahn zugeschrieben. Diese toxischen Radikale, die proteolytischen Enzyme und Arachidonsäuremetaboliten gelten heute als wichtigste potentielle Verursacher für die beobachteten posttraumatischen Lungengewebsschäden (Balk et al. 1988, Chida und Voelkel 1996, Cook et al. 1993).

Bei Prostaglandinen und Leukotrienen handelt es es sich um derartige Abbauprodukte der Arachidonsäure. Eine wichtige Rolle spielen hier vor allem die Prostanoiden wie Thromboxan A₂ und B₂, Prostacyclin I₂ (PGI₂), Prostaglandin E₂ (PGE₂) sowie Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) (Davis et al. 1999, DeLong und Born 2004, Gebhard et al. 1997a, Gebhard et al. 1997b, Keel und Trentz 2005, Melton et al. 1999).

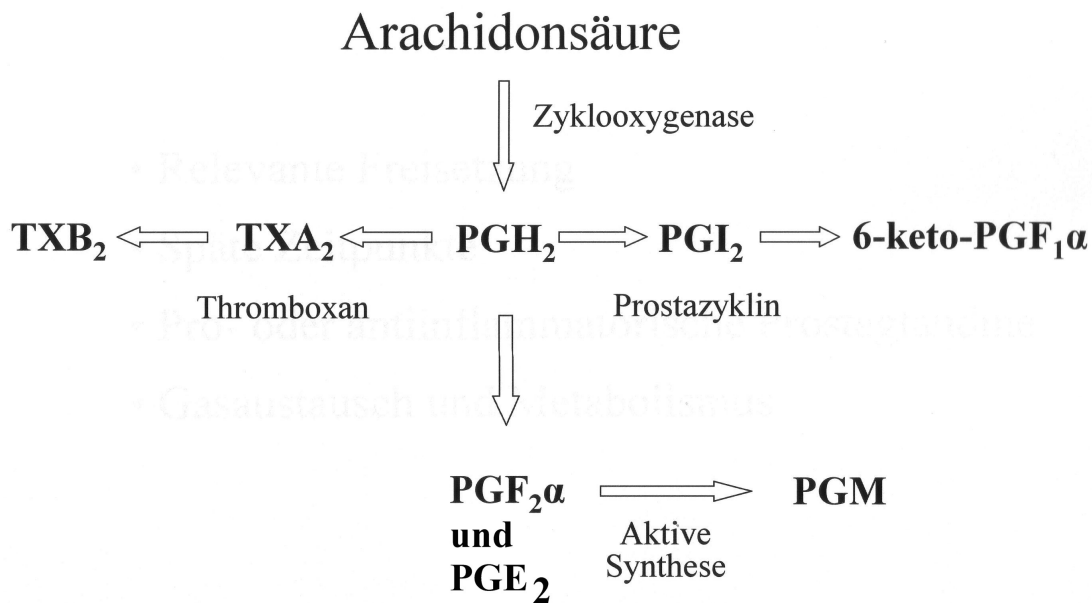


Abbildung 2: Metabolismus der Arachidonsäure im menschlichen Organismus
(Baue 1993)

Prostanoide besitzen eine starke vasoregulative Aktivität. Ferner führen sie über einen T-Zell-vermittelten Mechanismus zu einer vermehrten Freisetzung immunsuppressiver Interleukine (IL-4, IL-10) (Brückner et al. 1999, Kehl und Trentz 2005). Insbesondere PGE₂ entfaltet eine ausgeprägte immunsuppressive Wirkung auf Makrophagen (Strong et al. 2000).

Malonsäuredialdehyd (MDA) entsteht zum einen als Endprodukt einer ausgedehnten Degradierung von Zellmembranen durch O₂-Radikale, zum anderen auch durch eine nicht-enzymatische Abspaltung von Prostaglandin-Endoperoxid (PGH₂) (Brückner et al. 1999, Osuna et al. 1998).

Myeloperoxidase (MPO) ist ein wichtiger funktioneller Bestandteil der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PNM). Das Enzym spielt eine wichtige Rolle im Entzündungsprozess. Die Freisetzung aus den azurophilen Granula erfolgt nach Stimulation der PNM zusammen mit anderen lysosomalen Enzymen (Suzuki et al. 1983). Zunächst entsteht durch eine chemische Reaktion aus Sauerstoff ein Sauerstoffradikal. Dieses reagiert mit Wasserstoff zu Wasserstoffperoxid durch die Katalysierung mittels des Enzyms Superoxiddismutase. Nach Generierung des Wasserstoffperoxids kommt es durch Katalysierung mittels des Enzyms MPO zur Bildung von Hypochlorid-Ionen, die Zellwände zerstören können oder mit Wasserstoffperoxid weiterreagieren und weitere

Sauerstoffradikale bilden können (Klebanoff et al. 1984, Levinsin und Jawetz 1996). Damit ist der Gehalt an Myeloperoxidase ein Maß für die lokale Akkumulation und Infiltration des Organgewebes mit neutrophilen Granulozyten.

Zusätzlich zu Auswirkungen auf den Arachidonsäurestoffwechsel führt eine Lungenkontusion aber auch zu einer lokalen und systemischen Aktivierung des Gerinnungssystems und zu Änderungen in der Zusammensetzung und Funktion des Surfactant (Nichols et al. 1968, Obertacke et al. 1997). Die wichtigsten Arachidinsäuremetabolite, die Thromboxane und Prostaglandine, sind immer auch an unspezifischen Entzündungsreaktionen beteiligt. Nach schwerem Trauma können diese zu Organausfällen oder Multiorganversagen führen. Thromboxan wird von allen Prostaglandinen am schnellsten freigesetzt. Sein Gegenstück, das Prostacyclin (PGI_1) tritt bei Sepsis bzw. septischem Schock ebenfalls vermehrt auf, kann aber offensichtlich die Wirkung von TXA_2 nicht vollständig kompensieren. Die Bedeutung beider Mediatoren im Zusammenhang mit einem Thoraxtrauma wird derzeit noch kontrovers diskutiert (Brückner et al. 1999).

1.5. Untersuchungen am Tiermodell

Die ersten größeren, tierexperimentellen Untersuchungen wurden an unterschiedlichen Spezies mit Explosionswellen durchgeführt, entsprechend der in den beiden Weltkriegen am Menschen beobachteten Verletzungsmuster (Clemenson und Hultman 1954, Krohn et al. 1942). Zusätzlich entwickelte man Studien zur Untersuchung direkter Schädigungsmechanismen, die eine Lungenverletzung induzierten und zwar mit direktem Schuss penetrierend sowie stumpf durch Quetschung einzelner Lungenlappen nach Thorakotomie bzw. durch auf den Thorax fallende Gewichte (Cohn und Zieg 1996, Daniel und Cate 1948, Fulton und Peter 1970, Hopkinson et al. 1968, Moseley et al. 1970, Nichols et al. 1968, Trinkle et al. 1973). Auf der Basis dieser Untersuchungen wurde ein Großtiermodell am Schwein entwickelt und etabliert, das eine isolierte, unilaterale Lungenkontusion durch Bolzenschuss auf eine Metallplatte verursachte, welche am Thorax angelegt war (Hellinger et al. 1995, Melton et al. 1999, Obertacke et al. 1998). Mit diesem Tiermodell lassen sich auch isolierte, unilaterale Traumen beo-

bachten und damit die Verletzungsauswirkungen auch auf die gesunde, unverletzte, kontralaterale Lunge untersuchen. Ein Vorteil dieses Modells sind die physiologischen Untersuchungs- und Behandlungsmöglichkeiten. Nachteile sind die eingeschränkten immunologischen Untersuchungsmöglichkeiten, da einerseits aufgrund der höheren finanziellen und ethischen Hürden weniger kommerziell etablierte Methoden existieren, und andererseits geringere immunologische Kenntnisse über Schweine vorliegen, als dies bei Nagern der Fall ist. Auch ist der logistische und finanzielle Aufwand im Vergleich zu Kleintiermodellen eher groß. Ebenso machen die Begleitverletzungen der Thoraxwand zusätzliche Probleme. Daher versuchte man schon seit Jahren adäquate Kleintiermodelle zu etablieren.

Jaffin et al. (1987) entwickelten ein derartiges Modell an der Ratte mit der Zielsetzung, Explosionsverletzungen an unterschiedlichen Organen zu untersuchen. Sie erzeugten eine Druckwelle mittels einer in einen Zylinder eingespannten Membran. Andere Arbeitsgruppen griffen dieses Modell auf, um die bei Explosionstraumen entstehenden kardiopulmonalen Veränderungen zu charakterisieren (Guy et al. 1998, Irwin et al. 1997a). Da sich durch dieses Tiermodell auch die Möglichkeit ergibt, isolierte Thoraxtraumen zu induzieren, scheint es geeignet, immunologische Reaktionen einer Lungenkontusion über die bereits bekannten Veränderungen hinaus zu untersuchen.

Daher wurde das Tiermodell aufgrund seiner Vorteile in unserem Labor etabliert, in Vorversuchen charakterisiert und mit dem Ziel verwendet, die immunologischen Veränderungen nach einer Lungenkontusion weiter zu untersuchen.

1.6. Ziel der vorliegenden Arbeit

Aus der vorausgegangenen Darstellung ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. lässt sich durch eine kontaktlose Druckwellenverletzung im Thorax des Kleintiers (Ratte) eine reproduzierbare Schädigung der Lungen erzielen?
2. sind die zu beobachtenden makroskopischen und histologischen Veränderungen ähnlich den Verletzungsfolgen beim Menschen bzw. lassen sich die Ergebnisse auf die klinische Realität übertragen?
3. führt das Thoraxtrauma zu einer Degranulation von neutrophilen Granulozyten (MPO) ausschließlich in der Lunge oder auch in anderen Organen?
4. führt das stumpfe Thoraxtrauma zu einer Änderung der Lipidperoxidation auf zellulärer Ebene?

2. Material und Methoden

Die im folgenden beschriebenen tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Tübingen durchgeführt.

Für die Versuchsreihe wurden männliche Wistar Ratten verwendet, die sich bei freiem Zugang zu Wasser und Nahrung jeweils zu zweit in einem Käfig aufhielten. Die Beleuchtung wurde dem zirkadianen Rhythmus der nachtaktive Tiere angepasst. Bereits 2 Wochen vor Durchführung der Experimente wurden die Versuchstiere im Tierstall akklimatisiert.

2.1. Versuchsaufbau

2.1.1. Druckwellengenerator

Der Druckwellengenerator besteht aus zwei Zylindern, wobei der obere als Druckreservoir dient und mit dem Druckluftschlauch über ein elektronisches Einlassventil verbunden ist. Die untere Kammer ist nach unten hin zum Versuchstier offen und wird über den Thorax zentriert. Zwischen den Zylinderkammern spannt sich eine 190 μm dicke Mylar Polyesterfolie (Fa. Du Pont de Nemur, Bad Homburg).

Die Druckwelle wird ausgelöst, indem Druckluft in die obere Kammer einströmt bis die Berstspannung der Folie erreicht ist. Beim Zerreißen der Folie entsteht eine Druckwelle, welche durch den unteren Zylinder auf den Thorax des Versuchstieres trifft.

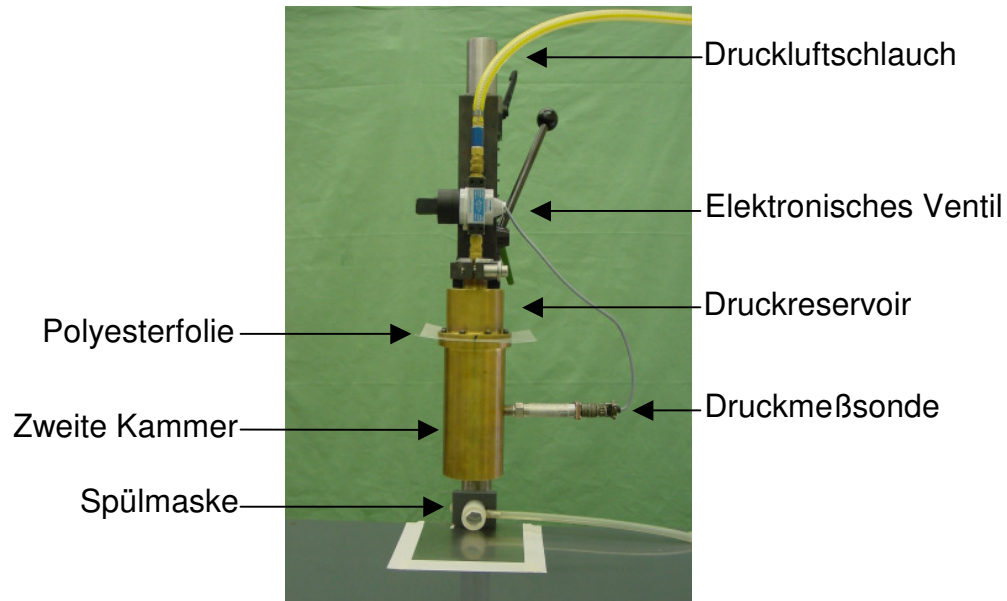


Abbildung 3: Aufbau des Druckwellengenerators mit zugehöriger Narkoseeinrichtung für das Versuchstier.

Die Intensität der Druckwelle wurde anhand einer Meßsonde (Newport Omega PX 603, Deckenfrohn) und über die PC-Software Daisylab (Datalog, Mönchengladbach) erfasst und verarbeitet. Es stellt sich eine steil ansteigende erzeugte Druckwelle mit $1,19 \pm 0,22$ bar dar, die nur wenige Millisekunden andauert. In der Abbildung 4 ist der charakteristische Druckwellenverlauf dargestellt.

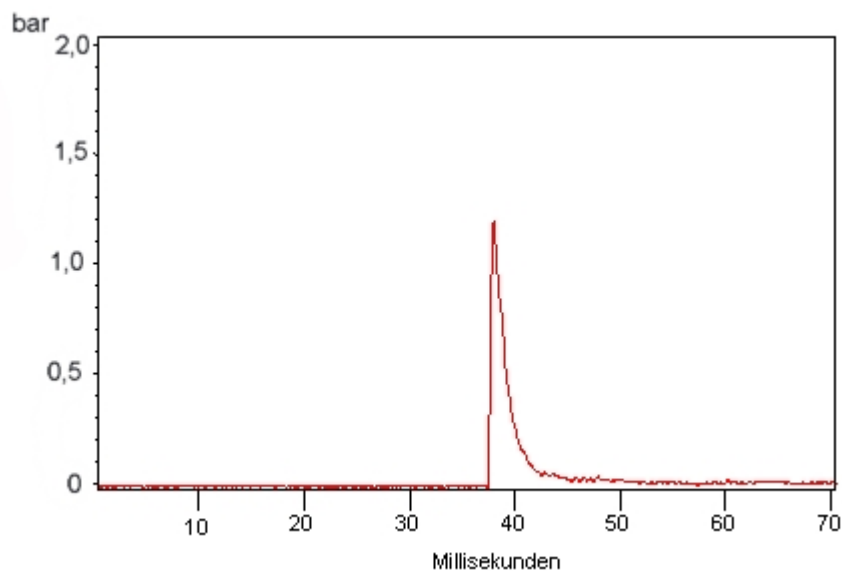


Abbildung 4: Druckwelle gemessen in der Mitte der unteren Kammer. Auf der Ordinate ist die erzielte Druckintensität in bar und auf der Abszisse die Zeit in ms aufgetragen

2.1.2. Narkose und Monitoring

Zunächst erfolgte die Prämedikation mit 0,005 mg/100 g Körpergewicht Atropin zur Herzfrequenzstabilisierung. Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer verschließbaren äthergefüllten Box. Die folgende Inhalationsnarkose wurde durch ein Gasgemisch in Form von Sevofluran 3,5% (Sevorane, Fa. Abbott GmbH, Wiesbaden) und reinem Sauerstoff (F_iO_2 1,0) aufrecht erhalten. Die Anästhesie erfolgte über eine Spülmaske am spontan atmenden, nicht intubierten Tier.

Nach atraumatischer Fixierung auf einer Kunststoffplatte in Rückenlage und wärme-erhaltenden Maßnahmen in Form einer Wärmematte, erfolgte die Rasur des Thorax und Abdomen sowie die Markierung des Processus xyphoideus um eine exakte Positionierung des Generators zu erreichen. Zusätzlich erfolgte eine Markierung des Tieres am Schwanz.

Die Messung des arteriellen Blutdrucks erfolgte über einen A. femoralis Katheter anhand eines modifizierten Meßsystems (Hewlett Packard 78353 A, Böblingen). In regelmäßigen Abständen wurden die Herzfrequenz, der mittlere arterielle Druck sowie der arterielle Sauerstoffpartialdruck (p_aO_2) gemessen und aus letzterem sowie dem O_2 -Anteil in der Beatmungsluft (F_iO_2) der sogenannte Horowitz Oxygenierungsquotient berechnet (p_aO_2 / F_iO_2). Zusätzlich erfolgte in regelmäßigen Abständen eine arterielle Blutgasanalyse.

2.1.3. Tierversuch

In Vorversuchen wurde die für das Versuchsvorhaben notwendige Verletzungsschwere ermittelt. Da sich aus der Literatur bereits Anhaltspunkte für die Traumastärke bei verschiedenen Einstellungen ergaben, wurden die Folienstärke (125, 190, 250 μ m) sowie der Abstand des Druckwellengenerators (1, 2, 3 cm) zum Versuchstier variiert. Es sollte einerseits eine deutliche Lungenkontusion erzielt werden, andererseits sollten die Tiere nicht direkt durch die Druckwelle getötet werden oder kurz nach dem Trauma versterben.

Die gewünschte Verletzungsschwere wurde durch Verwendung einer 190 µm dicken Folie bei einem Abstand des unteren Zylinderrandes zum Versuchstier von 2 cm erreicht.

Im Hauptversuch wurden thoraxtraumatisierte Tiere gegen Kontrolltiere verglichen, die den identischen Manipulationen, nicht aber der Thoraxverletzung ausgesetzt waren, d.h. auch die Kontrolltiere wurden allen erforderlichen Maßnahmen unterzogen, jedoch wurde dabei keine Folie eingespannt, so dass nur ein Luftstrom auf den Thorax resultierte, der keinerlei Verletzungen verursachen konnte. Zur Durchführung des Versuchs wurden insgesamt 64 Tiere mit einem Durchschnittsgewicht von 310 +/- 48 g in vier Thoraxtraumagruppen (6, 24, 48 u. 72 Stunden: Tx-Gruppe) und vier entsprechende Kontrollgruppen (6, 24, 48 u. 72 Stunden: K-Gruppe) zu je 8 Tieren (n = 8) pro Untergruppe randomisiert. Nach der jeweiligen Manipulation und dem Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere in die Käfige zurückgesetzt. Alle 6 Stunden erhielten alle Tiere zur Analgesie 10 µg/kg Körpergewicht Buprenorphin (Temgesic®, Boehringer, Mannheim) s.c. verabreicht und wurden regelmäßig kontrolliert.

Zu den jeweiligen Zeitpunkten nach 6, 24, 48 bzw. 72 Stunden erfolgte die Tötung der Tiere in Narkose mittels Punktion der Aorta mit folgender Blut- und Organentnahme.

2.1.4. Tötung und Begutachtung der Tiere

Zur Tötung wurden die Tiere in Narkose laparo- und thorakotomiert. Im ersten Schnitt wurden sofort die intraabdominell und intrathorakal gelegenen Organe sowie die Thoraxwand makroskopisch auf Verletzungen untersucht. Die Schwere der Lungenkontusion wurde anhand des Ausmaßes der makroskopisch sichtbaren Einblutung in jeden Lungenlappen (% pro Fläche) erfaßt. Durch Punktion der Aorta abdominalis erfolgte die Blutentnahme für die Blutgasanalyse und die Vollblutuntersuchung sowie letztlich die Tötung der Tiere.

2.1.5. Organentnahme

Die Lungenlappen wurden nach einer festgelegten Reihenfolge entnommen, anschließend Leber, Milz und beide Nieren, die jeweils auf einer Glasplatte, die entsprechend eines Asservierungsschema beschriftet war, in vorgegebenen Stücke zerteilt wurden.

Nach Beendigung der Organasservierung wurden die Organe in die formalingefüllten Gefäße bei Raumtemperatur für 48 Stunden auf einer Schüttelplatte KS 250 basic (Fa. Häberele, Lonsee-Ettlenschieß, Germany) gestellt und die Organe nach abgießen der Formalin-Lösung in 100 % iges Isopropanol (Bezug über Klinikapotheke) umgesetzt, in dem sie bei Raumtemperatur gelagert werden konnten. Die Asservierungsbehältnisse mit den in Stickstoff gefrorenen Organen wurden in die Gefriertruhe (-80°C) umgesetzt.

Die in Isopropanol eingelagerten Lungen aller Tiere wurden nach dem Einbetten in Paraffin in 3 µm dicke Mikrotomschnitte geschnitten und mit Hematoxylin-Eosin (H&E) gefärbt.

Zur mikroskopischen Aufarbeitung wurden mikroskopische Kriterien für eine Lungenverletzung wie u.a. subpleurale, alveoläre und bronchiale Einblutungen untersucht. Beurteilt wurden die Schnitte in 40facher Vergrößerung in Kooperation mit einem Pathologen der Universität Ulm, welchem die Einteilung in die Versuchsgruppen nicht bekannt war. Der Umfang der Lungenverletzung wurde in Prozent pro Fläche dokumentiert.

2.2. Probenaufarbeitung für weitere Untersuchungen

2.2.1 Probenvorbereitung

Für die Bestimmung des Gehaltes an Myeloperoxidase (MPO) und Malonsäuredialdehyd (MDA) ist eine Homogenisation und somit eine Freisetzung der zellulären Bestandteile notwendig.

Für die Bestimmung des MPO-Gehalts wurden in die Reagenzröhrchen je 1,5 ml Pufferlösung (0,05 M KPP/Kaliumphosphatpuffer bei pH 6,0 + 0,5% HTAB/Hexadecyltriethylammoniumbromid) für die notwendige Demembranisierung der Gewebeproben vorgelegt. Für die Bestimmung des MDA-Gehalts wurden in die Reagenzröhrchen je 1,5 ml NaCl 0,9% (Hausapotheke, Fa. Fresenius) vorgelegt.

2.2.2. Gewebeeinwaage

Im folgenden Schritt wurde, beginnend mit der ersten Probe des Lungengewebes, die Einwaage begonnen. Dazu wurde das gefrorene Gewebestück, das zum Schutz vor direkter Agenzwirkung mit Aluminiumfolie umwickelt war, mit einer anatomischen Pinzette aus dem Asservierungröhrchen entnommen und in das stickstoffgefüllte Styroporschälchen eingelegt.

Das zu erreichende Zielgewicht für die jeweilige MPO-Bestimmung beträgt für Lungengewebe 60 mg, wobei der Geweberest (zw. 100–300 mg) für die MDA-Bestimmung verwendet wurde. Für Lebergewebe wurde 150 mg zur MPO-Bestimmung verwendet, der Geweberest (zw. 300-600 mg) für die MDA-Bestimmung. Diese Einwaage diente der Quantifizierung auf das jeweilige Einwaagegewicht.

Die gefrorene Gewebeprobe wurde nun durch einen sanften Schlag mit einem Hammer geteilt. Durch Zugabe von flüssigem Stickstoff blieben die Teile gefroren.

Da die erhaltene Gewebefraktion nun das gewünschte Zielgewicht erhalten hatte, wurde sie in das bezeichnete Reagenzröhrchen eingeworfen, das exakte Gewicht dokumentiert und die Probe markiert. Wie oben beschrieben, wurde der erhaltene Geweberest in das MDA-Röhrchen gegeben. Zu großer Rest wurde verworfen.

Vor erneuter Einwaage wurde die Waage jeweils mit dem neu eingestellten Reagenzglas kalibriert und anhand der Libelle waagrecht gestellt.

Nach Beendigung der Einwaage des Lungengewebes, wurde mit dem Lebergewebe in der gleichen Technik fortgefahren.

2.2.3. Gewebehomogenisation

Nach Einwaage der Gewebeprobe erfolgte die Homogenisation im jeweiligen Medium mit Hilfe des Ultra-Turrax T 25 (Fa. Janke und Kunkel) Homogenisator.

Zunächst wurde die Homogenisation der Einwaage zur MPO-Bestimmung durchgeführt, da diese Proben im Anschluß im Heizblock bei 60°C für 2 Stunden inkubiert wurden.

Der Rührstab wurde vollständig in das Reagenzröhrchen mit der Einwaage im Medium eingetaucht. Durch intermittierendes Starten des Rührwerkes wurde das Gewebe homogenisiert, bis makroskopisch keine Gewebestrukturen mehr zu erkennen waren. Nach Homogenisation wurde das Reagenzröhrchen mit Plastikstopfen verschlossen.

Die Reinigung des Rührstabes erfolgte nach jeder Probe durch Spülung mit Aqua dest. Nach Abschluß der Homogenisation der MPO-Proben und deren Einstellung in den Heizblock, wurde mit der Homogenisation der MDA-Proben nach identischem Procedure fortgefahren. Diese Proben wurden ebenfalls mit Plastikstopfen verschlossen und in den Kühlschrank eingestellt.

Bei jedem Arbeitsschritt wurde auf sorgfältige Beschriftung der Proben und der Probenständer mit Inhalt (MPO-MDA-Lunge-Leber), Versuchsnummer, Probennummer, Datum und Name des Durchführenden geachtet.

2.2.4. Mikroskopische Betrachtung

Alle angefertigten Schnitte wurden nach ihrer Färbung unter dem Universalmikroskop Axioskop (Fa. Carl Zeiss Jena, 07740 Jena, Germany, Nr. 451485) unter folgenden Bedingungen ausgewertet:

Zur histologischen Aufarbeitung der gewonnenen Schnitte, wurden mikroskopische Kriterien für eine Lungenverletzung untersucht. Beurteilt wurden die Schnitte in Kooperation mit einem Pathologen der Universität Ulm, welchem die Einteilung in die Versuchsgruppen nicht bekannt war.

Die Untersuchung der Schnitte erfolgte in 40facher Vergrößerung und wurde tabellarisch im Einzelnen nach folgenden Kriterien zusammengefasst: Tiernummer und

Gruppe, Hämorrhagie in der Übersicht (in %), intraalveoläre Einblutung, interstitielles Ödem, intraalveoläres Ödem, Atelektasen, Granulozyten pro 5 Gesichtsfelder (gehäuft in Marginalisation, in Bronchus, in Alveolarsepten), Verdickung der Pleura, subpleurale Einblutung, Endothelschwellung und Besonderheiten.

Hierbei erfolgte die Beurteilung der Versuchstiere der 6 h-, 24 h-, 48 h- und 72 h-Gruppen sowohl der Versuchs- als auch der Kontrolltiere.

Als Subgruppe erfolgte unter dem Punkt Besonderheiten die Klassifizierung in einzelne Schnittbesonderheiten: Kristalle, Hämorrhagien, hyalin veränderte Hämorrhagien, flächig veränderte Hämorrhagien und Atelektasen.

2.2.5. Messmethodik der Myeloperoxidase (MPO)

Die Messung der Myeloperoxidaseaktivität (MPO) im Gewebe stellt einen zuverlässigen Marker der Infiltration und Aktivität neutrophiler Granulozyten dar (Schoenberg et al. 1995).

Die folgende Messmethodik der Myeloperoxidase-Bestimmung in Lunge und Leber erfolgte nach einem modifizierten Schema nach Suzuki et al. (1983) ebenfalls in dem ausgelagerten biochemischen Labor der Abteilung Chirurgie der Universität Ulm.

Das Prinzip der Nachweismethode basiert auf der H_2O_2 abhängigen Oxidation von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin durch die Myeloperoxidase (Suzuki et al. 1983).

Es wurde der quantitative Anteil an MPO in einer Gewebeprobe in der Einheit Units pro Liter photometrisch bestimmt und dann das Resultat in Relation zum Proteingehalt der Gewebeprobe gesetzt. Der Quotient stellt somit die Menge MPO mit dem Proteingehalt als Bezugsgröße dar.

Die zur quantitativen MPO-Messung benötigte Referenzreihe mit definiertem Gehalt an MPO wurde aus einer Standardlösung mittels 1 Unit MPO pro ml hergestellt. Die Standardlösung wurde nach folgendem Schema vorbereitet: Verdünnung jeweils 1:2 mit KPP-HTAB 0,05 M, pH 6,0. Damit lagen folgende Konzentrationen in U/ml vor: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63 und 0 (Leerwert, enthielt nur Puffer).

Es erfolgte eine entsprechende Vorverdünnung der Probe in Abhängigkeit von der für die Messung ausgewählten Gewebeart, falls der Überstand eine zu hohe Konzentration an MPO enthielt.

Die Gewebepvorbereitung mit Aufarbeitung der Proben besteht in einer Einwaage, Demembranisierung, weitgehenden Homogenisierung und Inkubation. Die Demembranisierung erfolgt in 1,5 ml Pufferlösung (KPP-HTAB-Puffer 0,05 M bei pH 6,0), die das zu bestimmende Agens MPO nicht in ihrer Funktion und Menge beeinflusst.

Das abgekühlte Gewebehomogenat wurde nach der Inaktivierung der Katalase bei 3200 g und 18 °C für 15 min zentrifugiert (Minifuge T Heraeus). Es entstand ein Sediment mit Überstand, das sogenannte Pellet.

Von dem Überstand wurden je 25 µl vorsichtig abpipettiert und auf eine vorbereitete Mikrotiterplatte aufgetragen. Diese war wiederum entsprechend nummeriert, um auch hier eine eindeutige Zuordnung der Proben zu ermöglichen. Das Sediment mit dem Rest der Probe wurde aufbewahrt für die später folgende Proteinmessung der jeweiligen Probe.

Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 3.200 g über 15 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand auf Mikrotiterplatten mit 25 µl Tetramethylbenzidin (Sigma Biology, Taufkirchen) und 200 µl H₂O₂ (1:18.000 in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer) versetzt und über 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion mit 50 µl 2 M H₂SO₄ wurde die MPO-Aktivität im Gewebe gegen einen MPO-Standard bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und als Aktivität in U/mg Proteingehalt angegeben.

2.2.6. Malonsäuredialdehyd (MDA)

Nach der Einwaage (Waage wurde jeweils vor jeder Messung mit Röhren neu kalibriert) erfolgte die Homogenisierung nach Vorlage von jeweils 1,5 ml NaCl 0,9% in den gekennzeichneten und nummerierten Rundboden-Reagenzröhren.

Durch die Homogenisierung wurde ein mechanisches Aufbrechen der molekularen Strukturen, sowie die Durchmischung mit den Reagenzien erreicht, um deren Angriff zu erleichtern. Diese Durchführung der Gewebehomogenisierung war identisch mit der

oben beschriebenen Technik zur Gewebeaufarbeitung bei der Bestimmung der Myeloperoxidase.

Die Reinigung des Rührwerkes erfolgte nach jeder Probe. Jedes Röhrchen war durch farbige Probennummer und Farbdeckel eindeutig einzuordnen. Hierdurch konnte eine Verwechslung im Rahmen der zahlreichen Messvorgänge verhindert werden.

Folgende Reagenzien wurden benötigt:

- TCA: Trichloressigsäure 20% (Fa. Merck)
- HCl 0,01 N (Merck)
- 1-BuOH (Apotheke)
- Ethanol (Apotheke)
- NaOH 0,5 N (Apotheke)
- 2-Propanol = Isopropanol (Apotheke)
- NaCl 0,9% (Fresenius)

Homogenisiertes MDA-Gewebe wurde aus dem Kühlschrank entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Eine Durchmischung erfolgte mit dem Vortex-Gerät. Parallel erfolgte die Herstellung einer Standardverdünnungsreihe 16 bis L (s.u.).

Zur Herstellung einer Verdünnungsreihe wurde zunächst die Stammlösung angesetzt. Die Stammlösung bestand aus 25,5 µl MDA-Standard (MDA-Standard: Malondialdehydbisdimethylacatal Merck, Art. 820756) und wurde mit H₂O auf 100 ml im Messkolben verdünnt ($160 \mu\text{M} / 100 \text{ ml} = 1,6 \text{ mM}$).

In das erste Röhrchen (beschriftet mit 16) wurden 5 ml 0,01 N HCl gegeben und sofort wieder 50 µl mit der Pipette entnommen. Diese wurden durch die Zugabe von 50 µl der Stammlösung ersetzt. Es entsteht eine Verdünnung von 1:100.

Zur Fortsetzung der Verdünnungsreihe 16 – 8 – 4 – 2 – 1 - 0,5 - 0,25 – L (nur HCl) wurden in die Rundboden-Glasröhrchen (ab 8) je 1 ml 0,01 N HCl vorgelegt. Von vorne beginnend (ab 16) wurde je 1 ml aufgenommen und in das nächste Röhrchen eingeben, gemischt und dann erneut 1 ml aufgenommen usw. In 0,25 bleiben also 2 ml.

Inzwischen wurde TBA (Thiobarbitursäure 0,67% Fa. Sigma, Art.-Nr. T 5560) vorbereitet. 600 mg Lungengewebe wurden an der Gewebewaage abgewogen und in 90 ml

Aqua dest. auf der Wärmeplatte unter Rühren heiß gelöst (250 U/m, 100°C) sowie mit Folie abgedeckt, um Geruch und Verdunstung zu vermeiden.

In leere vorbereitete beschriftete Rundboden-Röhrchen wurden je 200 µl der Standard-Verdünnungsreihe in doppelter Ausführung und je 200 µl des aufgetauten Gewebehomogenats mit stumpfen Pipettenspitzen, deren Spitzen abgeschnitten waren, da das Homogenat sehr dickflüssig war, einpipettiert. In o.g. Standard- bzw. Homogenatreihe wurden je 500 µl TCA 20% sowie je 1000 µl TBA gegeben. Alle Proben wurden im Vortexgerät durchmischt, mit Plastikdeckeln verschlossen und bei 96°C für 30 min. inkubiert. Die höchsten Standards erschienen danach rosa. Nach Abkühlung und Zugabe von je 1,25 ml BuOH erfolgte die Zentrifugation. Danach wurden je 300 µl aus der oberer Phase in die vorbereitete, beschriftete weiße Mikrotiter-Platte (MT-Platte) gegeben. Nach PC-Anleitung wurde dann die Fluoreszenzmessung durchgeführt.

Durch das anfänglich zugegebene TCA war die Proteinfällung bereits erfolgt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Zum Sediment wurden 3 ml Aqua dest. zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und der Schritt wiederholt. Zum Sediment wurden 2 ml 0,5 N NaOH zugeben. Die Röhrchen wurden mit Plastikdeckel verschlossen und 30 min bei 56 °C inkubiert. Nach der Abkühlung wurden sie beschriftet und verschlossen in den Kühlschrank gestellt.

Der MDA-Gehalt jeder Probe wurde aus der Extinktionsmessung in µmol / l erhalten. Nach Ausfällung und somit einem Verdünnungsfaktor von 2 (nach Zugabe von 2 ml 0,5 N NaOH) sowie der Proteinbestimmung in g/l wurde mittels folgender Formel der MDA-Gehalt im untersuchten Gewebe berechnet:

$$\frac{\mu\text{mol/l} \times 2 \text{ ml}}{\text{g/l}} = \mu\text{mol/g}$$

Die Messung der MDA erfolgte nach Zugabe von 20% TCA für die optimale pH-Einstellung, sowie die spätere Proteinfällung. Durch Zugabe von BuOH, wurde MDA für den Angriff am folgenden Farbstoff separiert. Das grüne TBA-Reagenz reagiert mit dem separierten MDA als Addukt im Rahmen einer Schiffchen Base und führt somit

zu einem Farbumschlag von grün zu rotviolett, der durch Fluoreszenzmessung bei 450 nm im Photometer quantifiziert wird.

2.2.7. Prostaglandine

2.2.7.1. 6-Keto-PGF_{1α}

Bei dem verwendeten Test-Kit "6-Keto-Prostaglandin F_{1α}" (Fa. Neogen Corp, Lexington/USA Produkt-Nr. 404310) konnte Gewebematerial direkt verwendet werden, in dem es mit verdünntem Extraktionspuffer vermischt wurde. Der Extraktionspuffer musste fünfmal mit deionisiertem Wasser verdünnt werden, bevor er eingesetzt wurde. Jedes Präzipitat des Puffers wurde vor der Anwendung in Lösung gebracht. Die Extraktion verlief in folgenden Schritten:

Nach der Zugabe von 0,2 ml Methanol auf 1 ml biologische Flüssigkeit und mischen wurde Gewebe in 15%igem Methanol in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer H 7,5 (100 mg in 1 ml Methanol-Puffer) homogenisiert. Das Homogenisat wurde fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand in eine Plastikkuvette übertragen. Nach der Vorbereitung der C₁₈Sep-Pak® Säule (Waters® Corporation) durch Waschen der Säule mit 2 ml Methanol, gefolgt von 2 ml Wasser, wurden die Proben in die Säule gefüllt und die Flussrate auf 1 ml pro Minute eingestellt. Die Säule wurde mit 2 ml 15%igem Methanol in Wasser, gefolgt von 2 ml Petroleumäther, gewaschen. Das Prostaglandin wurde durch die Zugabe von 2 ml Methylformat eluiert, das Methylformat-Eluat wurde unter strömendem Stickstoffgas evaporisiert. Der Rest wurde mit 1 ml verdünntem Extraktionspuffer gelöst und 50 µl Assay dupliziert. Wenn die Prostaglandinkonzentration höher als die Obergrenze der Standardeichkurve war, wurde die Probe gemäß des letzten Schritts erneut verdünnt.

Die Standards wurden nach folgendem Schema vorbereitet:

Standard A: Stammlösung 1 µg/ml

Standard B: 20 µl des Standards A wurden zu 980 µl Enzyme Immunosorbent Assay (EIA) -Puffer gegeben und gemischt (Konzentration: 20 ng/ml)

Standard C: 200 µl des Standards B wurden zu 1,8 ml EIA-Puffer gegeben und gemischt (Konzentration: 2 ng/ml)

Standard D: 200 µl des Standards C wurden zu 1,8 ml EIA-Puffer gegeben und gemischt (Konzentration: 0,2 ng/ml)

Die Vorbereitung der Standards erfolgte nach folgendem Schema der Tabelle 1.

Tabelle 1: Vorbereitung der Standards (Schema)

Standards	ng/ml	EIA-Puffer (µl Zugabe)	Standard C (µl)	Standard D (µl)
S ₀	0	unverändert	-	-
S ₁	0,02	900	-	100
S ₂	0,04	800	-	200
S ₃	0,1	500	-	500
S ₄	0,2	-	-	unverändert
S ₅	0,4	800	200	
S ₆	1,0	500	500	
S ₇	2,0	-	unverändert	

EIA- Enzyme Immunosorbent Assay

Die Durchführung des Tests verlief folgendermaßen: Die Verdünnung des 6-Keto-PGF_{1α} Enzymkonjugates erfolgte durch die Zugabe von 1 µl Enzymkonjugat in 50 µl Gesamtvolumen EIA-Puffer für jedes Well. Für die Nutzung der gesamten Platte mussten 110 µl Enzymkonjugat mit 5,5 ml EIA-Puffer (gut durchmischt) verwendet werden. Dann erfolgte die Zugabe von 50 µl Standard (S) oder unbekannter Prüflösung (U) in die Wells (Doppelbestimmung war notwendig) sowie die Zugabe von 50 µl des verdünnten Enzymkonjugates in jedes Well. Die Platte wurde vorsichtig gemischt, ggf. mit dem Mikroplatten-Mischgerät. Dann erfolgte die Abdeckung der Platte mit einem Plastikfilm oder einer Plastikabdeckung sowie die Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde (Vermeidung von Zugluft oder Temperaturschwankungen). Der konzentrierte Waschpuffer wurde mit deionisiertem Wasser (20 ml Waschpuffer plus 180 ml deionisiertes Wasser, gut gemischt) verdünnt. Nach der Inkubation erfolgte die Entleerung der Wells sowie die Reinigung mit einem faserfreien Tuch. Nach dreimaligem Waschen jeden Wells mit jeweils 300 µl Waschpuffer (ggf. Verwendung eines automatischen Plattenwaschgerätes) erfolgte die Zugabe von 150 µl Substrat in jedes Well und es wurde vorsichtig durchmischt. Danach wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert und durch vorsichtiges Schütteln der Platte vor dem Messvorgang eine gleichmäßige Farbverteilung in jedem Well erreicht. Das Auslesen der Platte er-

folgte in einem Mikroplatten-Lesegerät bei 650 nm. Bei Verwendung einer Wellenlänge wurde $W_1 = 650$ nm und $W_2 = 490$ nm gesetzt.

2.2.7.2. 13,14-Dihydro-15-Keto-PGF_{2α}

Bei dem verwendeten Test-Kit "13,14-Dihydro-15-Keto-Prostaglandin F_{2α}" (Fa. Neogen Corp, Lexington/USA, Produkt-Nr. 404610) wurde in exakt gleicher Weise vorgegangen, wie bereits zur Prüfung von 6-Keto-PGF_{1α} beschrieben. Der Extraktionspuffer musste fünfmal mit deionisiertem Wasser verdünnt werden, bevor er eingesetzt wurde. Jedes Präzipitat des Puffers musste vor der Anwendung in Lösung gebracht worden sein. Die Extraktion verlief in folgenden Schritten:

Nach der Zugabe von 0,2 ml Methanol auf 1 ml biologische Flüssigkeit und mischen wurde das Gewebe in 15%igem Methanol in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer H 7,5 (100 mg in 1 ml Methanol-Puffer) homogenisiert. Das Homogenisat wurde fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand in eine Plastikkuvette übertragen. Die Vorbereitung der C₁₈Sep-Pak® Säule (Waters® Corporation) erfolgte durch Waschen der Säule mit 2 ml Methanol, gefolgt von 2 ml Wasser. Sodann wurden die Proben in die Säule eingefüllt und die Flussrate auf 1 ml pro Minute eingestellt. Das Waschen der Säule erfolgte mit 2 ml 15%igem Methanol in Wasser, gefolgt von 2 ml Petroleumäther. Das Prostaglandin wurde durch die Zugabe von 2 ml Methylformat eluiert, das Methylformat-Eluat wurde unter strömendem Stickstoffgas evaporisiert. Der Rest wurde mit 1 ml verdünntem Extraktionspuffer gelöst und 50 µl Assay dupliziert. War die Prostaglandinkonzentration höher als die Obergrenze der Standarddeichkurve, musste die Probe gemäß des letzten Schritts erneut verdünnt werden.

Die Standards wurden nach folgendem Schema vorbereitet:

Standard A: Stammlösung 1 µg/ml

Standard B: 20 µl des Standards A wurden zu 980 µl EIA-Puffer gegeben und gemischt (Konzentration: 20 ng/ml)

Standard C: 200 µl des Standards B wurden zu 1,8 ml EIA-Puffer gegeben und gemischt (Konzentration: 2 ng/ml)

Standard D: 200 µl des Standards C wurden zu 1,8 ml EIA-Puffer gegeben und gemischt (Konzentration: 0,2 ng/ml)

Die Vorbereitung der Standards erfolgte nach dem Schema der Tabelle 2.

Tabelle 2: Vorbereitung der Standards (Schema)

Standards	ng/ml	EIA-Puffer (µl Zugabe)	Standard C (µl)	Standard D (µl)
S ₀	0	unverändert	-	-
S ₁	0,02	900	-	100
S ₂	0,04	800	-	200
S ₃	0,1	500	-	500
S ₄	0,2	-	-	unverändert
S ₅	0,4	800	200	
S ₆	1,0	500	500	
S ₇	2,0	-	unverändert	

EIA- Enzyme Immunosorbent Assay

Die Durchführung des Tests verlief folgendermaßen:

Die Verdünnung des 13,14-d-15-keto-PGF_{2α} Enzymkonjugates erfolgte durch die Zugabe von 1 µl Enzymkonjugates in 50 µl Gesamtvolumen EIA-Puffer für jedes Well. Für die Nutzung der gesamten Platte mussten 110 µl Enzymkonjugat mit 5,5 ml EIA-Puffer (gut durchmischt) verwendet werden. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl Standard (S) oder unbekannter Prüflösung (U) in die Wells sowie die Zugabe von 50 µl des verdünnten Enzymkonjugates in jedes Well. Nach vorsichtigem Mischen der Platte ggf. mit dem Mikroplatten-Mischgerät erfolgte die Abdeckung der Platte mit einem Plastikfilm oder einer Plastikabdeckung sowie die Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde (Vermeidung von Zugluft oder Temperaturschwankungen). Der konzentrierte Waschpuffer wurde mit deionisiertem Wasser (20 ml Waschpuffer plus 180 ml deionisiertes Wasser, gut mischen) verdünnt. Nach der Inkubation erfolgte die Entleerung der Wells sowie die Reinigung mit einem faserfreien Tuch. Nach dreimaligem Waschen jeden Wells mit jeweils 300 µl Waschpuffer (ggf. Verwendung eines automatischen Plattenwaschgerätes) und der Zugabe von 150 µl Substrat in jedes Well wurde vorsichtig durchmischt. Danach erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Durch vorsichtiges Schütteln der Platte vor dem Messvorgang wurde eine gleichmäßige Farbverteilung in jedem Well erreicht.

2.3. Statistische Methoden

Die erhobenen Daten wurden in das Statistikprogramm Statistical Package for Social Sciences (SPSS/PC+, Version 9.0, Fa. SPSS GmbH/München) eingegeben und ausgewertet. Dabei wurde zunächst für die intervall- bzw. rationalskalierten Messparameter mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Gauß'sche Normalverteilung geprüft, die jedoch signifikant abgelehnt wurde. Deshalb wurden sowohl für den Vergleich der Daten zwischen den beiden Versuchsgruppen als auch für den Vergleich des Verlaufs der Daten eines Parameters über verschiedene Messzeitpunkte hinweg innerhalb einer Versuchsgruppe nichtparametrische Prüfverfahren verwendet. Im ersten Falle wurde der Mann-Whitney-Test, in zweiterem Falle der Kruskal-Wallis-Test benutzt. Zum Vergleich der Häufigkeiten verwendeten wir den Fisher-Exakt-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

Für die beschreibende Statistik wurden die absolute (n) und relative (%) Häufigkeit, der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD), der Median (Med), das Minimum (Min) und das Maximum (Max) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Makroskopische Ergebnisse

Das Thoraxtrauma, das durch den Druckwellengenerator bei den Ratten der Versuchsgruppe gesetzt wurde, führte bei allen Tieren zu makroskopisch sichtbaren, bilateralen Hämorrhagien der Lungen. Verletzungen der intraabdominellen Organe der Tiere wurden jedoch nicht beobachtet (siehe Abbildung 5).

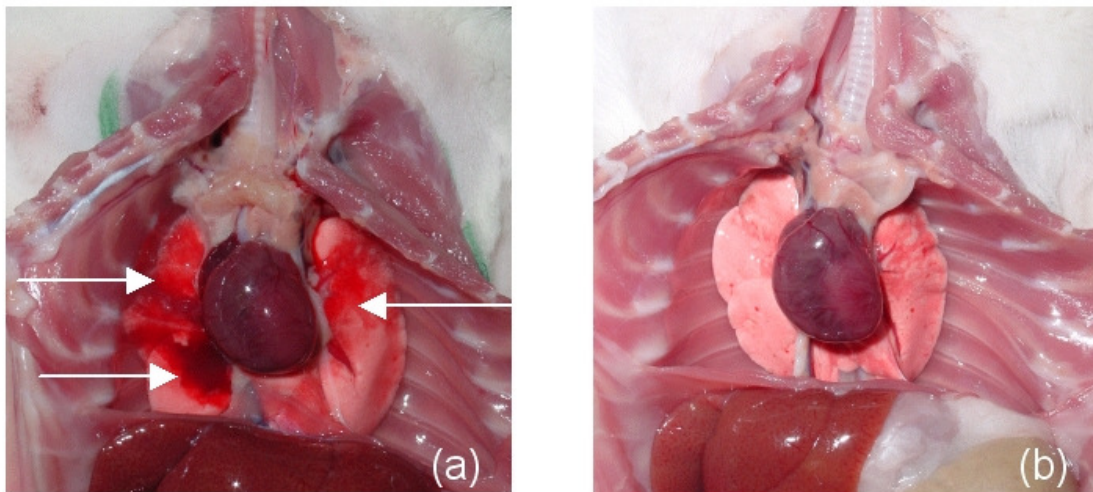


Abbildung 5: Makroskopische Ansicht der Lungen eines traumatisierten Tieres (a), sowie eines Kontrolltieres (b). Als Folge der Druckwellenverletzung bestehen bilateral deutlich nachzuweisende kontusionierte Areale mit ventral- und dorsalseitigen Hämorrhagien (Pfeile). Verletzungen der knöchernen Thoraxwand, Pneumothoraces bzw. intraabdominelle Verletzungen wurden nicht beobachtet.

3.2. Mikroskopische Ergebnisse

Die histologische Aufarbeitung des Lungenmaterials der Ratten, die eine Druckwellenverletzung appliziert erhielten, ergab bei allen Tieren charakteristische Zeichen einer stumpfen thorakalen Verletzung mit subpleuralen, alveolären und bronchialen Einblutungen (siehe Abbildung 6).

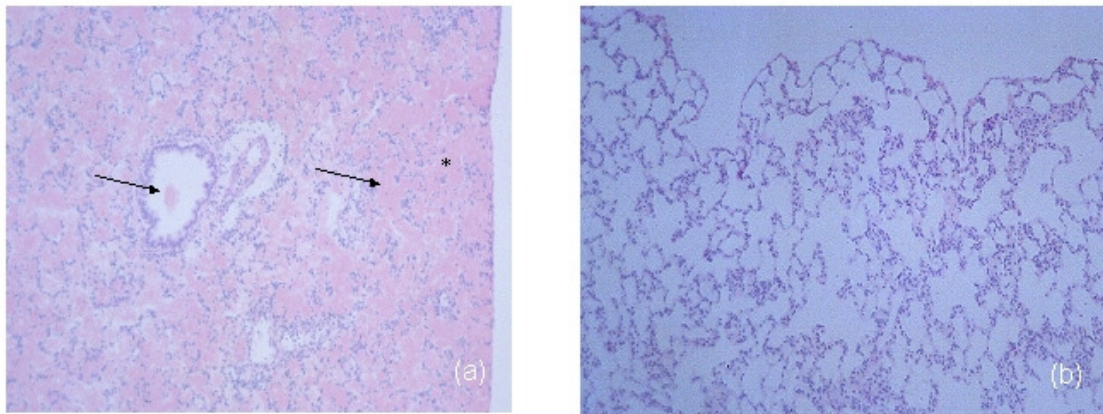


Abbildung 6: Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Lungenpräparate eines traumatisierten Tieres nach stumpfer Thoraxkontusion (a) sowie eines Kontrolltieres (b). Vergrößerung: 150fach. Deutlich sichtbar sind die bronchialen und alveolären Einblutungen nach Druckwellenverletzung (Pfeile) sowie die rupturierten Alveolarmembranen (Stern) bei gleichzeitiger Aufhebung der Alveolarseptenstruktur. Im Gegensatz hierzu zeigt sich im Gewebe des Kontrolltieres eine regelrechte Alveolarstruktur mit nur geringen artefaktbedingten Alterationen der Alveolararchitektur.

Im Detail handelte es sich um folgende Resultate, die zwischen den Trauma- und Kontrollratten vergleichend ermittelt wurden:

Die Hämorrhagie des Lungengewebes war in der Traumagruppe signifikant und drastisch stärker anzutreffen als in der Kontrollgruppe. Dies galt für alle vier Untersuchungszeitpunkte. Innerhalb der Traumagruppe nahm die Hämorrhagie, die 70% des Gewebes zum Zeitpunkt 6 h nach Lungenkontusion betrug, zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden weiter signifikant zu, nahm dann zum Zeitpunkt 72 Stunden jedoch wieder signifikant ab. Innerhalb der Kontrollgruppe ergab sich keine Veränderung der Hämorrhagie (siehe Tabelle 3).

Tab. 3: Hämorrhagie in Übersichtsaufnahme (% der Gewebeprobe) von Tieren mit Lungenkontusion (Trauma) und Kontrolltieren

Zeit	Trauma (n=7)			Kontrolle (n=8)			p-Wert ¹⁾
	MW \pm SD	Med.	Min-Max	MW \pm SD	Med.	Min-Max	
6 h	70,0 \pm 14,1	70	50 - 90	3,7 \pm 3,5	5	0 - 10	0,0010
24 h	82,8 \pm 17,9	90	50 - 100	3,1 \pm 3,7	2,5	0 - 10	0,0010
48 h	78,5 \pm 15,7	80	60 - 100	2,5 \pm 2,7	2,5	0 - 5	0,0009
72 h	41,4 \pm 27,3	40	10 - 80	5,6 \pm 6,2	5	0 - 20	0,0021
Signifikanzprüfung innerhalb Trauma-Gruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: p = 0,0174 ²⁾				Signifikanzprüfung innerhalb Kontrollgruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: p = 0,6646 ²⁾			

¹⁾ Vergleich zwischen Trauma- und Kontrollgruppe (Mann-Whitney-Test); ²⁾ Kruskal-Wallis-Test

Intraalveoläre Einblutungen wurden in beiden Rattenkollektiven beobachtet, jedoch zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h im Traumakollektiv signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Häufigkeit intraalveolärer Einblutungen im Rattenkollektiv mit Lungenkontusion (Trauma) bzw. in der Kontrollgruppe

Zeit	Trauma (n=7)				Kontrolle (n=8)				p-Wert ¹⁾
	Einblutung		keine Einblutung		Einblutung		keine Einblutung		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
6 h	7	100	-	-	5	62,5	3	37,5	0,1203
24 h	7	100	-	-	3	37,5	5	62,5	0,0186
48 h	7	100	-	-	2	25,0	6	75,0	0,0055
72 h	6	85,7	1	14,3	5	62,5	3	37,5	0,3384

¹⁾ Vergleich mittels Fisher-Exakt-Test

Intrabronchiale Einblutungen wurden in beiden Rattenkollektiven beobachtet, jedoch zu den letzten drei Zeitpunkten jeweils signifikant häufiger in der Traumagruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Häufigkeit intrabronchialer Einblutungen im Rattenkollektiv mit Lungenkontusion (Trauma) bzw. in der Kontrollgruppe

Zeit	Trauma (n=7)				Kontrolle (n=8)				p-Wert ¹⁾
	Einblutung		keine Einblutung		Einblutung		keine Einblutung		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
6 h	3	42,9	4	57,1	2	25,0	6	75,0	0,4265
24 h	5	71,4	2	28,6	1	12,5	7	87,5	0,0347
48 h	7	100	-	-	3	37,5	5	62,5	0,0186
72 h	6	85,7	1	14,3	-	-	8	100	0,0014

¹⁾ Vergleich mittels Fisher-Exakt-Test

Ein interstitielles Ödem (mikroskopische Aufhellung, Zellschwellung) war zu den Zeitpunkten 6 h und 24 h in der Traumagruppe signifikant häufiger anzutreffen als in der Kontrollgruppe. Auch wenn es prozentual zu den beiden letzten Zeitpunkten ebenfalls noch häufiger bei den Ratten mit Lungenkontusion anzutreffen war, fand sich kein signifikanter Häufigkeitsunterschied an interstitiellem Ödem mehr im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Tab. 6).

Tab. 6: Häufigkeit eines interstitiellen Ödems im Rattenkollektiv mit Lungenkontusion (Trauma) bzw. in der Kontrollgruppe

Zeit	Trauma (n=7)				Kontrolle (n=8)				p-Wert ¹⁾
	interst. Ö.		kein Ödem		interst. Ö.		kein Ödem		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
6 h	7	100	-	-	-	-	8	100	0,0001
24 h	5	71,4	2	28,6	1	12,5	7	87,5	0,0349
48 h	4	57,1	3	42,9	3	37,5	5	62,5	0,4048
72 h	1	14,3	6	85,7	-	-	8	100	0,4666

¹⁾ Vergleich mittels Fisher-Exakt-Test

Ein intraalveoläres Ödem war zu den Zeitpunkten 6 h und 24 h in der Traumagruppe signifikant häufiger anzutreffen als in der Kontrollgruppe. Zu den Zeitpunkten 48 h und 72 h jedoch war der Anteil von Gewebeproben mit intraalveolärem Ödem in der Traumagruppe nicht signifikant unterschiedlich von jenem, die in der Kontrollgruppe festzustellen war (siehe Tab. 7).

Tab. 7: Häufigkeit eines intraalveolären Ödems im Rattenkollektiv mit Lungenkontusion (Trauma) bzw. in der Kontrollgruppe

Zeit	Trauma (n=7)				Kontrolle (n=8)				p-Wert ¹⁾
	intra. Ödem		kein Ödem		intra. Ödem		kein Ödem		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
6 h	7	100	-	-	3	37,5	5	62,5	0,0186
24 h	5	71,4	2	28,6	1	12,5	7	87,5	0,0349
48 h	4	57,1	3	42,9	3	37,5	5	62,5	0,4048
72 h	2	28,6	5	71,4	-	-	8	100	0,2000

¹⁾ Vergleich mittels Fisher-Exakt-Test

Atelektasen unterschiedlicher Ausprägung waren sowohl bei jeder Ratte in der Trauma- als auch der Kontrollgruppe zu jedem der vier Messzeitpunkte vorhanden. Insofern gab es keine diesbezüglichen Unterschied zwischen den Tiergruppen (siehe Tab. 8).

Tab. 8: Häufigkeit von Atelektasen im Rattenkollektiv mit Lungenkontusion (Trauma) bzw. in der Kontrollgruppe

Zeit	Trauma (n=7)				Kontrolle (n=8)				p-Wert ¹⁾
	Atelektasen		keine Atelekt.		Atelektasen		keine Atelekt.		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
6 h	7	100	-	-	8	100	-	-	1,000
24 h	7	100	-	-	8	100	-	-	1,000
48 h	7	100	-	-	8	100	-	-	1,000
72 h	7	100	-	-	8	100	-	-	1,000

¹⁾ Vergleich mittels Fisher-Exakt-Test

Die Anzahl der pro 5 Gesichtsfelder gezählten Granulozyten im Lungenpräparat lag in den Gewebeschnitten der Traumarratten zu allen vier Messzeitpunkten signifikant höher als in jenen der Kontrolltiere. Zusätzlich zeigte sich in der Traumagruppe, dass die Zahl der Granulozyten vom Zeitpunkt 6 h bis zum Zeitpunkt 24 h nach Lungenkontusion signifikant anstieg und danach wieder abfiel, um 72 h nach Lungenkontusion den niedrigsten Wert zu erreichen. Dieser lag aber immer noch dreifach über der Granulozytenzahl von Präparaten der Kontrolltiere (siehe Tabelle 9).

Tab. 9: Anzahl von Granulozyten pro 5 Gesichtsfelder in den Lungenpräparaten von Ratten mit Lungenkontusion (Trauma) und Kontrollratten

Zeit	Trauma (n=7)			Kontrolle (n=8)			p-Wert ¹⁾
	MW \pm SD	Med.	Min-Max	MW \pm SD	Med.	Min-Max	
6 h	24,2 \pm 6,4	24	16 - 36	6,1 \pm 2,7	6	3 - 10	0,0012
24 h	40,4 \pm 16,1	38	19 - 62	5,5 \pm 1,9	5,5	3 - 9	0,0012
48 h	21,5 \pm 5,1	22	14 - 28	7,2 \pm 2,4	7	4 - 11	0,0012
72 h	12,0 \pm 3,3	12	8 - 18	4,6 \pm 1,7	4,5	3 - 7	0,0011
Signifikanzprüfung innerhalb Trauma- gruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: p = 0,0005 ²⁾				Signifikanzprüfung innerhalb Kontrollgruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: p = 0,1732 ²⁾			

¹⁾ Vergleich zwischen Trauma- und Kontrollgruppe (Mann-Whitney-Test); ²⁾ Kruskal-Wallis-Test

Zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Lungenkontusion fand sich in der Tiergruppe mit Trauma wie auch in der Kontrollgruppe kein Fall mit Verdickungen der Pleura. Der Anteil von Tieren mit Pleuraverdickung war zum Zeitpunkt 24 h nach Lungenkontusion in der Traumagruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe bzw. in der Kontrollgruppe fand sich kein einziges Tier mit Pleuraverdickung. Der Anteil von Tieren mit Pleuraverdickung in der Traumagruppe nahm zu den beiden letzten Zeitpunkten hin ab und unterschied sich dann nicht mehr signifikant von jenem in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 10).

Tab. 10: Häufigkeit von Verdickungen der Pleura im Rattenkollektiv mit Lungenkontusion (Trauma) bzw. in der Kontrollgruppe

Zeit	Trauma (n=7)				Kontrolle (n=8)				p-Wert ¹⁾
	Verdickung		keine Verdickung		Verdickung		keine Verdickung		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
6 h	-	-	7	100	-	-	8	100	1,0000
24 h	5	71,4	2	28,6	-	-	8	100	0,0069
48 h	1	14,3	6	85,7	2	25,0	6	75,0	0,5538
72 h	4	57,1	3	42,9	3	37,5	5	62,5	0,4048

¹⁾ Vergleich mittels Fisher-Exakt-Test

Subpleurale Einblutungen waren zum Zeitpunkt 6 h nach Lungenkontusion in der Traumagruppe noch nicht vorhanden, jedoch in der Kontrollgruppe anzutreffen. Der Anteil von subpleuralen Einblutungen stieg zum Zeitpunkt 24 h in der Traumagruppe auf 14,3% an, sank dann wieder und lag nach 72 h nicht signifikant verschieden zur Kontrollgruppe. Die Unterschiede waren aber inkonsistent, da es sich nur um wenige Tiere mit subpleuralen Einblutungen handelte (siehe Tabelle 11).

Tab. 11: Häufigkeit subpleuraler Einblutungen im Rattenkollektiv mit Lungenkontusion (Trauma) bzw. in der Kontrollgruppe

Zeit	Trauma (n=7)				Kontrolle (n=8)				p-Wert ¹⁾
	subpl. Einbl.		keine Einblutung		subpl. Einbl.		keine Einblutung		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
6 h	-	-	7	100	2	25,0	6	75,0	0,0055
24 h	1	14,3	6	85,7	1	12,5	7	87,5	0,0088
48 h	-	-	7	100	1	12,5	7	87,5	0,0012
72 h	1	14,3	6	85,7	-	-	8	100	0,4666

¹⁾ Vergleich mittels Fisher-Exakt-Test

Eine Endothelschwellung kam zu den Zeitpunkten 6 h und 24 h nach Lungenkontusion im Kollektiv der Traumaratten signifikant häufiger vor als in der Kontrollgruppe, in der kein einziger Fall festzustellen war. Der Anteil von Endothelschwellungen nahm allerdings in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 48 h und 72 h etwas zu und er sank ein wenig in der Traumagruppe, so dass zu beiden Zeitpunkten zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied der Auftretenshäufigkeit mehr bestand (siehe Tabelle 12).

Tab. 12: Häufigkeit von Endothelschwellung im Rattenkollektiv mit Lungenkontusion (Trauma) bzw. in der Kontrollgruppe

Zeit	Trauma (n=7)				Kontrolle (n=8)				p-Wert ¹⁾
	Schwellung		keine Schwellung		Schwellung		keine Schwellung		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
6 h	5	71,4	2	28,6	-	-	8	100	0,0069
24 h	6	85,7	1	14,3	-	-	8	100	0,0014
48 h	5	61,4	2	28,6	2	25,0	6	75,0	0,1002
72 h	2	28,6	5	71,4	3	37,5	5	62,5	0,5734

¹⁾ Vergleich mittels Fisher-Exakt-Test

3.3. Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe

Bereits sechs Stunden nach Trauma zeigte sich eine deutliche und statistisch signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung der Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe mit einem Maximum zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Lungenkontusion ($1,374 \pm 0,679$ U/mg), wobei dieses Maximum bis zum Ende der 72stündigen Beobachtungszeit ($1,331 \pm 0,55$ U/mg) erhalten blieb. Zwischen den Ratten der Kontroll- und der Traumagruppe waren die Messwerte zu jedem der vier Messzeitpunkte signifikant unterschiedlich. Die Ratten der Traumagruppe zeigten jeweils deutlich höhere Werte als die Kontrolltiere (s. Abb. 7 und Tab. 13).

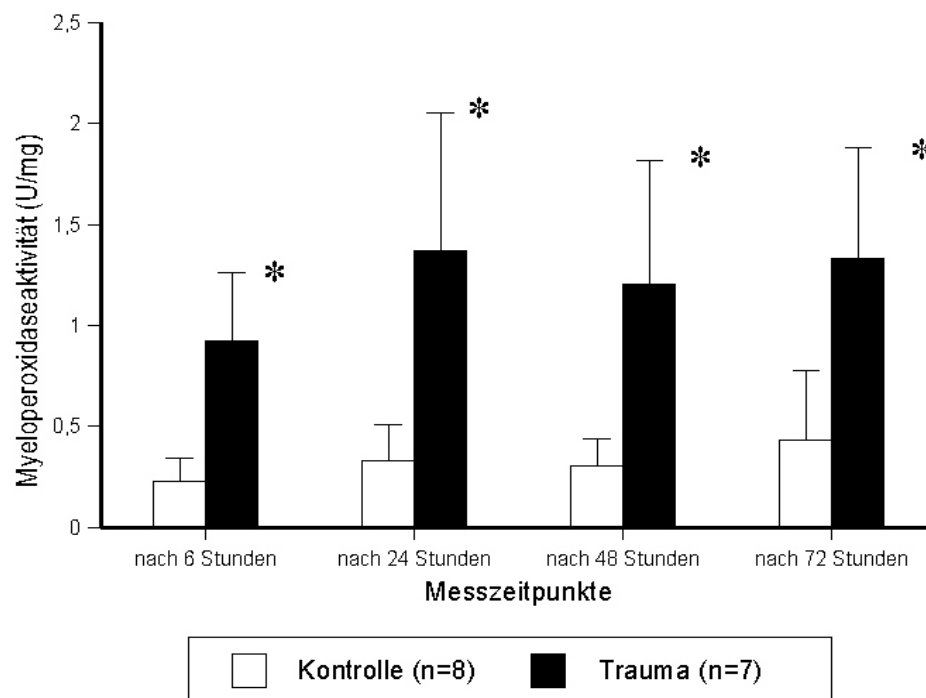


Abbildung 7: Nachweis der Myeloperoxidase im Lungengewebe (U/mg) von Kontrolltieren □ (n=8) und traumatisierten Ratten ■ (n=7); * = $p < 0,05$. In der Traumagruppe war eine Ratte verstorben.

Wie die nachfolgende Tabelle demonstriert, kam es aber innerhalb der jeweiligen Tiergruppen nicht zu signifikanten Anstiegen der Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe. Die erhöhten Werte in der Traumagruppe stiegen über den Beobachtungszeitraum nicht signifikant weiter an, ebenso veränderten sich die Werte in der Kontrollgruppe nicht statistisch signifikant.

Tab. 13: Myeloperoxidaseaktivität (MPO) im Lungengewebe (U/mg) von Ratten mit Lungenkontusion (Trauma) und Kontrolltieren

Zeit	Trauma (n=7)			Kontrolle (n=8)			p-Wert ¹⁾
	MW \pm SD	Med.	Min-Max	MW \pm SD	Med.	Min-Max	
6 h	0,925 \pm 0,338	0,810	0,533 - 1,408	0,228 \pm 0,116	0,242	0,054 - 0,423	0,0012
24 h	1,374 \pm 0,679	1,104	0,434 - 2,225	0,331 \pm 0,180	0,286	0,162 - 0,725	0,0018
48 h	1,203 \pm 0,617	0,948	0,539 - 2,353	0,303 \pm 0,133	0,275	0,140 - 0,599	0,0018
72 h	1,331 \pm 0,550	1,394	0,505 - 2,127	0,433 \pm 0,345	0,351	0,147 - 1,218	0,0055
Signifikanzprüfung innerhalb Traumagruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: p = 0,4352 ²⁾				Signifikanzprüfung innerhalb Kontrollgruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: p = 0,3860 ²⁾			

¹⁾ Vergleich zwischen Trauma- und Kontrollgruppe (Mann-Whitney-Test)

²⁾ Kruskal-Wallis-Test

3.4. Myeloperoxidaseaktivität im Lebergewebe

Die Myeloperoxidaseaktivität im Lebergewebe lag sowohl in der Lungenkontusions-/Trauma- wie auch der Kontrollgruppe sehr niedrig. Zu keinem der vier Messzeitpunkte fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Trauma- und der Kontrollgruppe, auch wenn zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma die Ratten in der Gruppe mit Lungenkontusion fast signifikant ($p = 0,0671$) höhere Myeloperoxidaseaktivitäten aufwiesen als die Kontrolltiere. Innerhalb der Trauma- und ebenso innerhalb der Kontrollgruppe fand sich keine signifikante Veränderung der Myeloperoxidaseaktivität zwischen den Messzeitpunkten 6., 24., 48. und 72. Stunde (s. Abb.8 und Tab. 14).

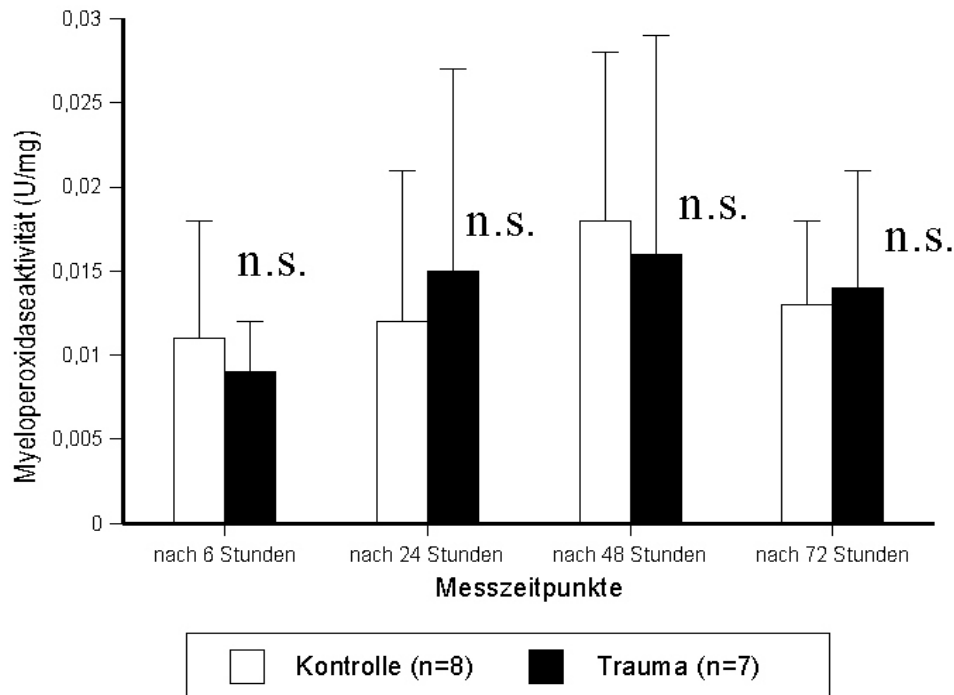


Abbildung 8: Nachweis der Myeloperoxidase im Lebergewebe (U/mg) von Kontrolltieren □ (n=8) und traumatisierten Ratten ■ (n=7); n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$); In der Traumagruppe war eine Ratte verstorben

Tab. 14: Myeloperoxidaseaktivität (MPO) im Lebergewebe (U/mg) von Ratten mit Lungenkontusion (Trauma) und Kontrolltieren

Zeit	Trauma (n=7)			Kontrolle (n=8)			p-Wert ¹⁾
	MW \pm SD	Med.	Min-Max	MW \pm SD	Med.	Min-Max	
6 h	0,009 \pm 0,003	0,009	0,004 - 0,013	0,011 \pm 0,007	0,009	0,007 - 0,027	1,0000
24 h	0,015 \pm 0,012	0,010	0,009 - 0,043	0,012 \pm 0,009	0,009	0,007 - 0,035	0,0614
48 h	0,016 \pm 0,013	0,013	0,001 - 0,042	0,018 \pm 0,010	0,013	0,007 - 0,035	0,8170
72 h	0,014 \pm 0,007	0,013	0,007 - 0,028	0,013 \pm 0,005	0,012	0,007 - 0,023	0,5241
Signifikanzprüfung innerhalb Traumagruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: $p = 0,1742$ ²⁾				Signifikanzprüfung innerhalb Kontrollgruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: $p = 0,1069$ ²⁾			

¹⁾ Vergleich zwischen Trauma- und Kontrollgruppe (Mann-Whitney-Test)

²⁾ Kruskal-Wallis-Test

3.5. Malonsäuredialdehyd (MDA) im Lungengewebe

Zu allen vier Messzeitpunkten lag die Malonsäuredialdehyd-Konzentration im Lungengewebe von Ratten mit Lungenkontusion/Trauma erheblich unter jener von Kontrolltieren. Die Unterschiede waren für die Zeitpunkte nach 6, 24 und 48 Stunden, nicht jedoch für den Zeitpunkt nach 72 Stunden, statistisch signifikant. Innerhalb der beiden Rattengruppen veränderte sich die MDA-Konzentration über den gesamten Beobachtungszeitraum jeweils nicht statistisch signifikant (s. Abb.9 und Tab. 15).

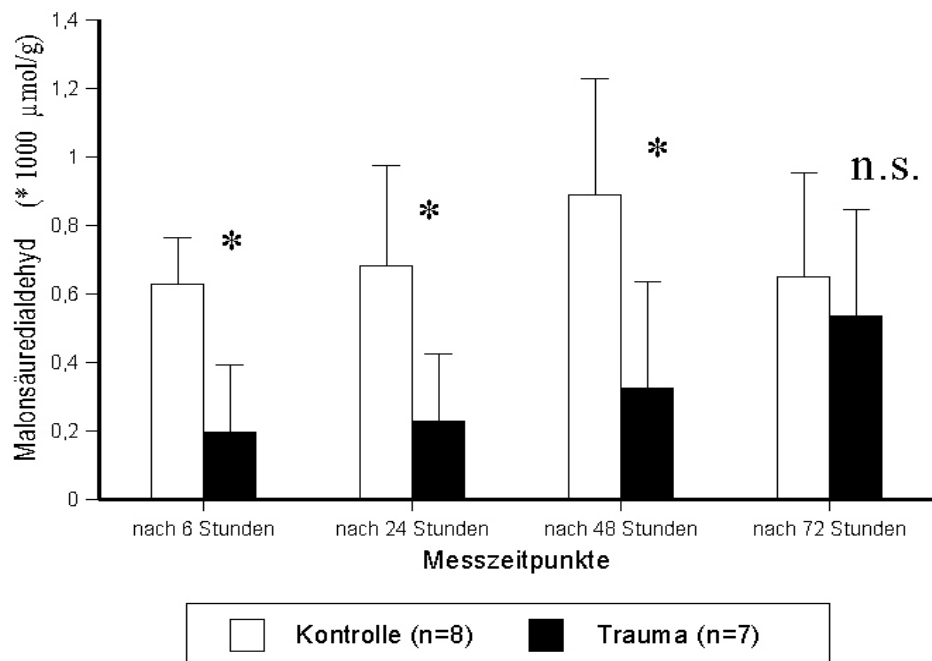


Abbildung 9: Konzentration von Malonsäuredialdehyd (MDA) im Lungengewebe (nmol/g) von Kontrolltieren □ (n=8) und traumatisierten Ratten ■ (n=7); * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$). In der Trauma gruppe war eine Ratte verstorben

Tab. 15: Malonsäuredialdehyd (MDA) im Lungengewebe (* 1000 µmol/g) von Ratten mit Lungenkontusion (Trauma) und Kontrolltieren

Zeit	Trauma (n=7)			Kontrolle (n=8)			p-Wert ¹⁾
	MW ± SD	Med.	Min-Max	MW ± SD	Med.	Min-Max	
6 h	0,195 ± 0,034	0,194	0,069 - 0,300	0,627 ± 0,138	0,659	0,401 - 0,783	0,0012
24 h	0,227 ± 0,199	0,159	0,017 - 0,527	0,683 ± 0,294	0,750	0,567 - 1,367	0,0012
48 h	0,323 ± 0,241	0,315	0,058 - 0,764	0,890 ± 0,339	0,929	0,356 - 1,496	0,0055
72 h	0,536 ± 0,311	0,473	0,093 - 0,932	0,649 ± 0,306	0,681	0,067 - 1,025	0,5628
Signifikanzprüfung innerhalb Traumagruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: $p = 0,1653$ ²⁾				Signifikanzprüfung innerhalb Kontrollgruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: $p = 0,1941$ ²⁾			

¹⁾ Vergleich zwischen Trauma- und Kontrollgruppe (Mann-Whitney-Test); ²⁾ Kruskal-Wallis-Test

3.6. Malonsäuredialdehyd (MDA) im Lebergewebe

Die MDA-Konzentration im Lebergewebe lag nur zum Zeitpunkt sechs Stunden in der Gruppe der Ratten mit Lungenkontusion signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren. Zu den späteren Zeitpunkten fanden sich zwischen beiden Rattengruppen keine signifikanten Unterschiede mehr. Innerhalb der Versuchs- und Kontrollgruppe kam es über den Beobachtungszeitraum hinweg zu keinen signifikanten Veränderungen der MDA im Lebergewebe (s. Abb. 10 und Tab. 16).

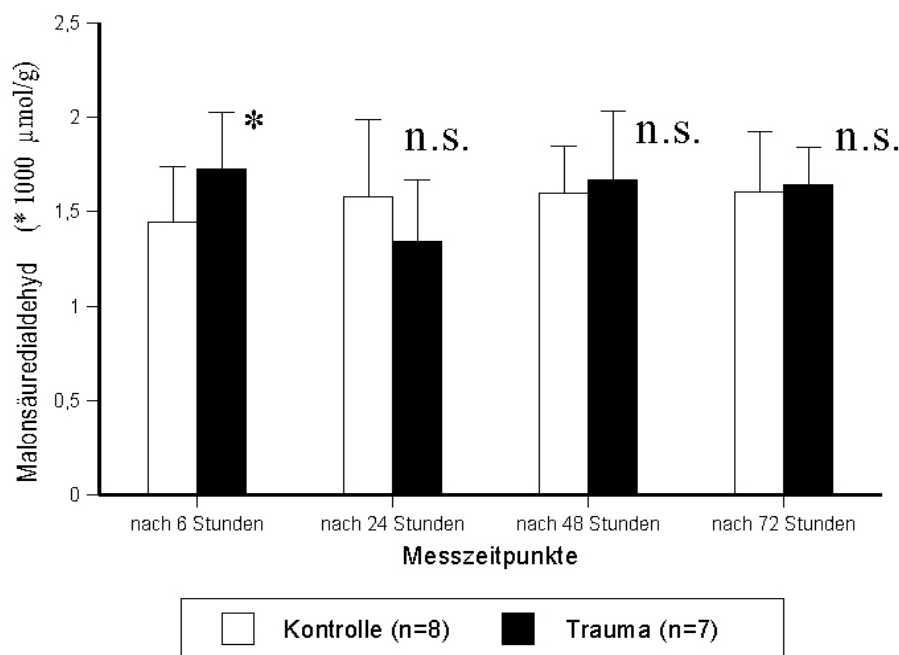


Abbildung 10: Konzentration von Malonsäuredialdehyd (MDA) im Lebergewebe (nmol/g) von Kontrolltieren □ (n=8) und traumatisierten Ratten ■ (n=7); * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$). In der Trauma-Gruppe war eine Ratte verstorben

Tab. 16: Malonsäuredialdehyd (MDA) im Lebergewebe (nmol/g) von Tieren mit Lungenkontusion (Trauma) und Kontrolltieren

Zeit	Trauma (n=7)			Kontrolle (n=8)			p-Wert ¹⁾
	MW ± SD	Med.	Min-Max	MW ± SD	Med.	Min-Max	
6 h	1,728 ± 0,297	1,847	1,392 - 2,154	1,448 ± 0,291	1,425	1,022 - 1,932	0,0491
24 h	1,345 ± 0,321	1,432	0,958 - 1,694	1,582 ± 0,409	1,477	1,018 - 2,381	0,4179
48 h	1,670 ± 0,361	1,765	1,185 - 2,107	1,598 ± 0,247	1,605	1,119 - 1,978	0,7285
72 h	1,646 ± 0,194	1,712	1,288 - 1,880	1,605 ± 0,322	1,639	1,079 - 1,969	0,8170
Signifikanzprüfung innerhalb Traumagruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: $p = 0,1347$ ²⁾				Signifikanzprüfung innerhalb Kontrollgruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: $p = 0,6006$ ²⁾			

¹⁾ Vergleich zwischen Trauma- und Kontrollgruppe (Mann-Whitney-Test); ²⁾ Kruskal-Wallis-Test

3.7. Prostaglandine

3.7.1. 13,14-Dihydro-15-Keto-Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) im Plasma

Im Plasma konnte bei den traumatisierten Ratten zu keinem der vier Messzeitpunkte eine erhöhte Konzentration von PGF_{2α} nachgewiesen werden. Sowohl bei den drei traumatisierten Rattengruppen als auch den Tieren der Kontrollgruppe war die Freisetzung von PGF_{2α} ähnlich niedrig wie bei den Kontrolltieren (s. Abbildung 11 und Tabelle 17).

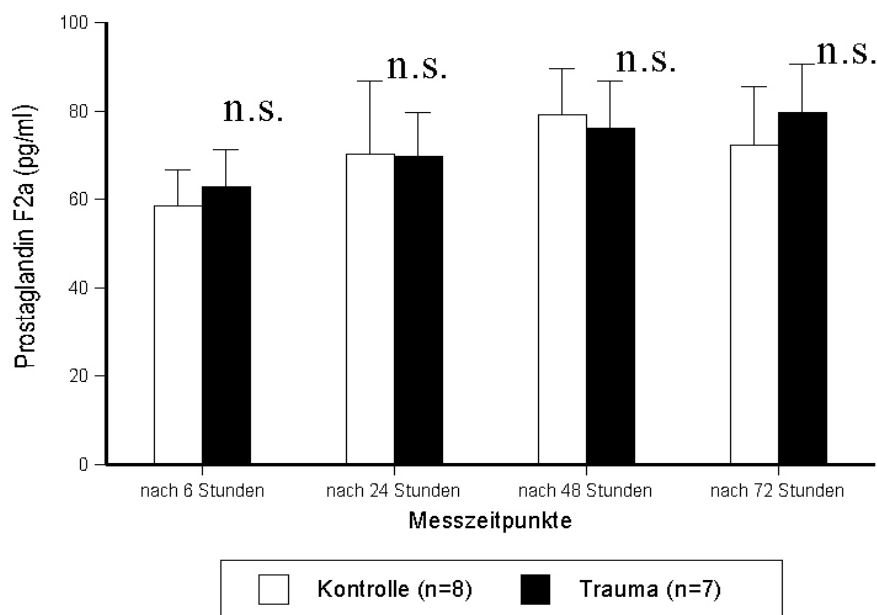


Abbildung 11: Konzentration (Mittelwert ± Standardabweichung) von PGF_{2α} (pg/ml) im Plasma von Kontrolltieren □ (n=8) und traumatisierten Ratten ■ (n=7); n.s. = nicht signifikant (p > 0,05) für Vergleich zwischen traumatisierten Ratten und Kontrolltieren

Tab. 17: 13,14-Dihydro-15-Keto-Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) im Plasma (pg/ml) von Tieren mit Lungenkontusion (Trauma) und Kontrolltieren

Zeit	Trauma (n=7)			Kontrolle (n=8)			p-Wert ¹⁾
	MW ± SD	Med.	Min-Max	MW ± SD	Med.	Min-Max	
6 h	62,95 ± 8,45	62,65	52,90 - 73,60	58,60 ± 8,02	58,4	47,0 - 66,6	0,5708
24 h	69,80 ± 9,98	72,05	52,85 - 80,0	70,34 ± 16,57	67,15	52,9 - 94,1	0,9538
48 h	76,27 ± 10,65	81,7	53,6 - 94,85	79,13 ± 10,65	84,3	66,2 - 91,3	0,6547
72 h	79,70 ± 11,0	79,3	63,05 - 98,15	72,45 ± 13,10	71,05	53,15 - 92,2	0,2712
Signifikanzprüfung innerhalb Traumagruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: p = 0,1102 ²⁾				Signifikanzprüfung innerhalb Kontrollgruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: p = 0,0376 ²⁾			

¹⁾ Vergleich zwischen Trauma- und Kontrollgruppe (Mann-Whitney-Test); ²⁾ Kruskal-Wallis-Test

3.7.2. Prostaglandin 6-Keto-PGF_{1α} (Prostazyklin) im Plasma

Die Konzentration von 6-Keto-PGF_{1α} (Prostazyklin) im Plasma von Ratten der Trauma- und der Kontrollgruppe veränderte sich über den 72stündigen Beobachtungszeitraum nicht signifikant. Es fanden sich ebensowenig signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu den Zeitpunkten 6, 24, 48 und 72 Stunden nach Setzung des Traumas (s. Abbildung 12 und Tabelle 18).

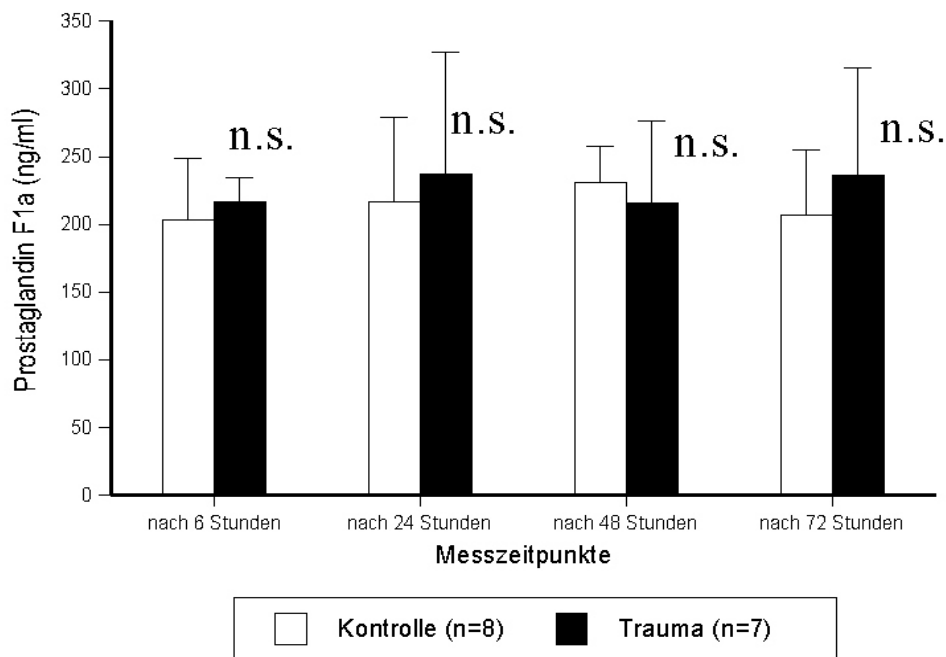


Abbildung 12: Konzentration (Mittelwert \pm Standardabweichung) von PGF_{1α} (pg/ml) im Plasma von Kontrolltieren \square (n=8) und traumatisierten Ratten \blacksquare (n=7); n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$) für Vergleich zwischen traumatisierten Ratten und Kontrolltieren

Tab. 18: 6-Keto-Prostaglandin F_{1α} (PGF_{1α}) im Plasma (ng/ml) von Tieren mit Lungenkontusion (Trauma) und Kontrolltieren

Zeit	Trauma (n=7)			Kontrolle (n=8)			p-Wert ¹⁾
	MW \pm SD	Med.	Min-Max	MW \pm SD	Med.	Min-Max	
6 h	216,65 \pm 17,52	208,35	206,9 - 247,75	203,52 \pm 44,92	187,94	148,9 - 293,33	0,3913
24 h	237,48 \pm 90,06	108,64	167,65 - 364,65	216,84 \pm 62,03	200,27	126,65 - 330,65	0,7963
48 h	215,99 \pm 60,29	197,3	159,9 - 331,93	230,45 \pm 27,02	233,43	194,75 - 267,1	0,3173
72 h	235,78 \pm 79,72	214,11	157,55 - 354,15	206,66 \pm 48,11	202,65	139,05 - 298,42	0,6056
Signifikanzprüfung innerhalb Traumagruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: $p = 0,7964$ ²⁾				Signifikanzprüfung innerhalb Kontrollgruppe zwischen den 4 Zeitpunkten: $p = 0,4932$ ²⁾			

¹⁾ Vergleich zwischen Trauma- und Kontrollgruppe (Mann-Whitney-Test); ²⁾ Kruskal-Wallis-Test

4. Diskussion

4.1. Validität des Versuchsaufbaus

Das für die vorliegende Arbeit gewählte Tiermodell wurde ursprünglich zur Untersuchung von Explosionstraumen entwickelt und erlaubt die Erzeugung von Druckwellenverletzungen an verschiedenen Organen (Irwin et al. 1997a, Irwin et al. 1997b, Jaffin et al. 1987). Allerdings wurden die Versuchstiere nicht intubiert und maschinell beatmet, sondern dem spontan atmenden Tier wurde das Narkosegemisch über eine Spülmaske zugeführt. Dies verhinderte eine Aktivierung inflammatorischer Prozesse durch die maschinelle Ventilation (Behnia et al. 1996, Kurz 2004, Tremblay und Slutsky 1998).

Mechanische Belastungen des Lungengewebes, beispielsweise durch eine Beatmungsmaßnahme, können eine erhöhte Zytokinsynthese auslösen. Derartige Beatmungsschäden bezeichnet man als "ventilator-induced lung injury" (Behnia et al. 1996, Ricard et al. 2001, Tremblay und Slutsky 1998). Weiterhin wurde für Chondrozyten, Gefäßendothelzellen und epitheliale Lungenzellen nachgewiesen, dass mechanische Reize über Integrine und Thyrosinkinasen die Expression spezifischer Gene regulieren können (Chen et al. 1999, Salter et al. 2001, Waters et al. 2002).

Die makroskopische Auswertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigte, dass mit dem Druckwellengenerator bei den Ratten ein stumpfes Thoraxtrauma induziert werden konnte. Die hierbei entstandene Schädigung der Lungen entspricht den beim Menschen auftretenden makro- und mikroskopischen Veränderungen nach bilateraler Lungenkontusion. Es zeigten sich bei den Versuchstieren deutlich sichtbare bilaterale Hämorrhagien der Lungen, jedoch keine Verletzungen intraabdomineller Organe. Entsprechende Verletzungsmuster zeigten sich in der Studie von Huang et al. (1996), die Hunden mittels Überdruckwellen stumpfe Thoraxtraumen zufügten. Auch in dieser Studie waren kleine, petichiale Lungenhämorrhagien die Hauptveränderung des Lungengewebes der Tiere. Auch zeigten die Hunde keine Verletzungen der Abdominalorgane. Auch Knöferl et al. (2003) berichteten im Mausmodell nach Lungenkontusion über eine deutliche Verletzung der Lungen, aber nicht über Verletzungen der Abdominalorgane.

Damit ist der gewählte Versuchsaufbau mit anderen Studien vergleichbar und geeignet, Aussagen über die Auswirkungen eines stumpfen Thoraxtraumas zu treffen.

4.2. Mikroskopische Ergebnisse

Mikroskopisch zeigten die traumatisierten Tiere alveoläre und bronchiale Einblutungen, die charakteristische Zeichen stumpfer thorakaler Verletzungen darstellen. Die Hämorrhagie war bei den traumatisierten Tieren signifikant höher als bei den unbehandelten Kontrolltieren und zwar zu allen vier Untersuchungszeitpunkten. Nach 6 Stunden lag bei 70% der Traumatiere eine Hämorrhagie vor. Sie nahm in der 24. und 48. Stunde signifikant weiter zu, fiel zum Zeitpunkt 72 Stunden aber wieder signifikant ab. Intra-alveoläre Einblutungen waren zum Zeitpunkt 24 und 48 Stunden in der Traumagruppe signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe. Intra-bronchiale Einblutungen waren in der Traumagruppe zu den letzten drei Untersuchungszeitpunkten signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe. Ein interstitielles Ödem war nach 6 und 24 Stunden in der Traumagruppe signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe nachweisbar. Das Gleiche galt für ein interalveoläres Ödem. Atelektasen zeigten sich zu allen Untersuchungszeitpunkten in beiden Versuchsgruppen, hier waren die Unterschiede nicht signifikant.

Auch bezüglich Pleuraverdickung, Endothelschwellung und Granulozytenzahl entsprachen die mikroskopischen Veränderungen jenen, die auch beim Menschen nach Lungenkontusion auftreten (Botha et al. 1995, Cohn 1997, Shorr et al. 1987, Stewart et al. 1997). Insgesamt zeigte sich also, dass das für die vorliegende Untersuchung verwendete Lungenmodell der Ratte eine Lungenkontusion im Rahmen eines berührungslosen Thoraxtraumas mit komprimierter Luft induzierte. Das gewählte Modell ist daher geeignet, die komplexen Auswirkungen der Schlüssel- bzw. Schrittmacherverletzung Thoraxtrauma auf die Lunge selbst und weiterhin auf posttraumatische Immunfunktionen lokal, der Lungen und des Gesamtorganismus zu untersuchen. Aufgrund der ausreichenden Größe des Versuchstieres eignet sich das gewählte Tiermodell ebenfalls zur Aufklärung pathophysiologischer Vorgänge am isolierten Zielorgan, also für eine ex vivo-Lungenperfusion.

Morphometrische und elektronenmikroskopische Untersuchungen anderer Autoren nach experimenteller Lungenkontusion bestätigen die eigenen histologischen Ergebnisse dahingehend, dass sie ein mit der Frühphase des ARDS zu vergleichendes Bildes nachwiesen, welches durch eine vermehrte Adhäsion und transendotheliale Migration neutrophiler Granulozyten und eine durch ein Ödem hervorgerufene Größenzunahme des interstitiellen Raumes gekennzeichnet ist (Hellinger et al. 1995). Diese Veränderungen sind von einer Zunahme der alveolokapillären Permeabilität für Albumin und der Einwanderung sowie Degranulation von neutrophilen Granulozyten in den bronchoalveolären Raum begleitet (Obertacke et al. 1998). Bei unilateralem Trauma ist von diesen Veränderungen auch die primär unverletzte, kontralaterale Lunge betroffen (Davis et al. 1999, Melton et al. 1999, Obertacke et al. 1998).

Diese tierexperimentellen Resultate werden auch von Untersuchungen am Menschen bestätigt. 12 und 36 Stunden nach einer Lungenkontusion wiesen Obertacke et al. (1994) eine signifikant erhöhte Permeabilität für Albumin nach. Die pulmonale Flüssigkeitsansammlung kann die Entwicklung von ARDS und Pneumonien begünstigen. Neutrophile Granulozyten spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklung eines sekundären Lungenschadens nach Hämorrhagie und Endotoxinämie (Obertacke et al. 1994). Knöferl et al. (2003) wiesen im Mausmodell ebenfalls histologische Zeichen einer bilateralen Lungenkontusion mit alveolärer und intrabronchialer Hämorrhagie nach. Huang et al. (1996) beschrieben in einer Studie an Hunden, die mittels stumpfen Thoraxtraumas verletzt worden waren, im Lichtmikroskop lungenalveoläre und interstitielle Hämorrhagien, Ödeme und Infiltration mit weißen Blutkörperchen nach. Ferner zeigten sich Ödeme der Lungenendothelzellen, Verdickungen der Kapillarmembranen sowie Degeneration und Nekrose alveolärer Epithelzellen. Irwin et al. (1997b) berichteten bei stumpfen Thoraxtraumen im Rattenmodell in Übereinstimmung mit den eigenen Resultaten ebenfalls von einer pulmonalen Hämorrhagie und Ödembildung.

Der in der eigenen Studie gefundene Anstieg der Granulozytenzahl wird von zahlreichen anderen Autoren bestätigt, wie bereits in der Parallelarbeit von Kopetzky (2005) ausführlich dargelegt wurde. Davis et al. (2001) fanden bei Schweinen nach stumpfen Bauchtrauma einen starken Anstieg der neutrophilen Granulozyten. Perl et al. (2005) berichteten bei Mäusen nach Kontusionstrauma ebenfalls von einer verstärkten Einwanderung neutrophiler Granulozyten in die Lunge. Auch Raghavendran et al.

(2005) stellten bei Ratten, die mit stumpfem Brusttrauma verletzt worden waren, eine Infiltration mit Neutrophilen in der Lunge fest. Nach Schlag und Redl (1987) kommt es auch beim Menschen nach Polytraumen zu einer verstärkten Freisetzung von Granulozyten. Burchardi (1987) betont, dass beim akuten Lungenversagen in vielschichtigen, interaktiven Pathomechanismen (Komplementaktivierung, Stimulation des Arachidonsäurestoffwechsels mit Freisetzung zahlreicher Mediatoren) zu einer Kumulation neutrophiler Granulozyten in der Lunge kommt. Die Granulozyten spielen im Frühstadium des akuten Lungenversagens eine entscheidende Rolle. Die stimulierten Granulozyten, aber auch die Alveolarmakrophagen, Endothelzellen, Monozyten, usw. setzen vor Ort verschiedene Mediatoren frei, die für die typischen Endothelläsionen und die Veränderung der Lungenperfusion verantwortlich gemacht werden. Aus stimulierten Granulozyten kommt es zur lokalen Freisetzung toxischer Sauerstoffradikale, unspezifischer Proteasen, Leukotriene und Lipoxigenaseprodukte der Arachidonsäure (Burchardi 1987, Neuhof 1991). Kopetzky (2005) betont, dass die massiv erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten im Lungengewebe von Ratten nach experimentellem Thoraxtrauma nicht nur unmittelbar am Ort der Schädigung wirken, sondern auch entferntere Areale betreffen können. Hämorrhagie und Sepsis führen durch Aktivierung der neutrophilen Granulozyten zu deren sekundären Einwanderung in intaktes und nicht durch den Primärinsult geschädigtes Lungengewebe. Im weiteren Verlauf wird dies durch die Produkte der imigrierten Neutrophilen geschädigt. Dies ist der Grund dafür, dass den neutrophilen Granulozyten eine wesentliche Rolle in der Entwicklung sekundärer pulmonaler Schäden nach Hämorrhagie, Sepsis und in der Pathogenese des ARDS zugewiesen wird (Parsey et al. 1998).

Bei bereits vorgeschädigtem Lungengewebe aufgrund der traumatischen Lungenkontusion führt nun die Aktivierung der Granulozyten zu weiteren Schäden des Gewebes. Interessanterweise zeigten die eigenen Ergebnisse einen deutlichen Anstieg der pro 5 Gesichtsfelder gezählten Granulozyten bis 24 Stunden nach der Lungenkontusion der Ratten. Danach fiel deren Zahl aber wieder ab. Daher ist es naheliegend, dass die Rekrutierung der Granulozyten unmittelbar nach dem Trauma direkt aus dem peripheren Blut erfolgt. Die zunächst in großer Menge eingewanderten Granulozyten degranulieren im Lungengewebe und entziehen sich danach möglicherweise der immunhistochemischen Anti-Elastasefärbung. Dies könnte die abnehmenden Zahlen

der Granulozyten nach 48 und 72 Stunden erklären. Eine weitere Hypothese für die Abnahme der Granulozytenzahlen ist das Auftreten von neutrophiler Apoptose. Der in neutrophilen Granulozyten ausgelöste programmierte Zelltod kann die entzündlichen Vorgänge in der Lunge einschränken und somit gesunde Gewebeanteile schonen (Haslett 1999). Auch Liener et al. (2003) wiesen nach bilateraler Lungenkontusion apoptotische Zellen im Lungengewebe selbst nach, deren maximale Anzahl sich 48 Stunden nach dem Trauma fand. Die eigenen Ergebnisse bestätigen also die isolierte Lungenschädigung.

4.3. Mediatorfreisetzung

4.3.1. Myeloperoxidase und Malonsäuredialdehyd

Die beobachtete Einwanderung der neutrophilen Granulozyten in Lunge und Leber, wie in anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe (Kopetzky 2005, Kurz 2004, Liener 2003) bereits gezeigt, steht im Einklang mit der ermittelten erhöhten Myeloperoxidase-Konzentration (MPO) in der Lunge. Die MPO-Aktivität im Lungengewebe zeigte bereits sechs Stunden nach dem Trauma einen starken und signifikanten Anstieg mit einem Maximum 24 Stunden nach der Lungenkontusion (1,37 U/mg). Das Maximum blieb bis Ende der 72stündigen Beobachtungsperiode nachweisbar (1,331 U/mg). Zu allen vier Zeitpunkten zeigten die Ratten der Traumagruppe signifikant höhere MPO-Aktivitäten als die Tiere der Kontrollgruppe. Im Verlauf innerhalb der jeweiligen Gruppe fand sich aber keine signifikante MPO-Veränderung. Im Lebergewebe hingegen war die MPO nicht zwischen den Ratten der Trauma- und Kontrollgruppe verschieden. Beide Gruppen zeigten hier sehr niedrige Werte. Lediglich 24 Stunden nach dem Trauma hatten die Tiere der Traumagruppe fast signifikant höhere MPO-Werte (0,016 versus 0,018 U/mg) als die Ratten der Kontrollgruppe. Zwischen den vier Messzeitpunkten ergab sich in der Leber keine signifikante Veränderung in beiden Gruppen.

Das Enzym Myeloperoxidase ist ein wichtiger funktioneller Bestandteil von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN). Sie spielen beide eine wichtige

Rolle in der inflammatorischen Reaktion. Die Myeloperoxidase ist in den azurophilen Granula enthalten und wird unter anderem bei der Bekämpfung von Bakterien in den Phagolysosomen freigesetzt. Erfolgt die Stimulation der PMN durch weitere Induktoren, wird MPO zusammen mit anderen lysosomalen Enzymen aus der Zelle freigesetzt (Suzuki et al. 1983). Bei unverhältnismäßiger Aktivierung kann es auch zu lokalen Gewebsschädigungen kommen.

Durch eine chemische Reaktion entsteht zunächst aus Sauerstoff ein Sauerstoffradikal, welches dann mit Wasserstoff zu Wasserstoffperoxid mittels Katalysierung durch das Enzym Superoxid-Dismutase reagiert.

Nach Generierung von Wasserstoffperoxid kommt es mittels Katalysierung durch das Enzym MPO zur Bildung von Hypochlorit-Ionen. Diese können selbst zum einen Zellwände zerstören oder aber auch mit dem Zwischenprodukt Wasserstoffperoxid weiter reagieren und weitere Sauerstoffradikale bilden, die wiederum Zellen durch Reaktionen mit den Doppelbindungen der Fettsäuren der membranständigen Lipide zerstören (Klebanoff et al. 1984, Levinsin und Jawetz 1996). Neutrophile Granulozyten können somit u.a. einen apoptotischen Zelltod in epithelialen Zellen der Lunge induzieren (Matute-Bello et al. 2001, Serrao et al. 2001). Es lässt sich somit folgern, dass der Gehalt an Myeloperoxidase als Maß für die lokale Akkumulation und Infiltration des Organgewebes mit neutrophilen Granulozyten herangezogen werden kann.

Die Anwendung dieses Sachverhaltes wurde bereits 1982 in einer Studie durch Bradley et al. (1982) nachgewiesen und in zahlreichen Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung der entzündlichen Reaktion des Gewebes angewandt (Arndt et al. 1995, Bhatia et al. 1998, Frossard et al. 1999, Jaffray et al. 2000, Lundberg et al. 2000).

Zur weiteren Quantifizierung der Gewebsreaktion wurde in weiteren Arbeiten unserer Forschungsgruppe der apoptotische Zelltod im Lungengewebe, Nachweis neutrophiler Granulozyten mittels Anfärben der zytoplasmatischen neutrophilen Elastase sowie lokale und systemische Mediatorkonzentrationen bestimmt.

Das humane Enzym Myeloperoxidase der neutrophilen Granulozyten spielt bei der Abwehr von Pathogenen eine entscheidende Rolle. Mit Hilfe von Wasserstoffperoxid vermag es Chlorid in das starke Oxidationsmittel Hypochlorit zu oxidieren. Dieses ist wahrscheinlich für den oxidativen Abbau der mittels Phagozytose aufgenommenen Fremdkörper (Bakterien, Viren) verantwortlich. Das Enzym scheint aber auch bei ent-

zündlichen Gewebsschädigungen und diversen Krankheiten an herausragender Stelle beteiligt zu sein, z.B. bei rheumatoider Arthritis oder Arteriosklerose. Sein genauer Wirkungsmechanismus ist aber bis heute ungeklärt (Obinger 2004).

Parsey et al. (1998) beobachteten neben der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten nach hämorrhagischem Schock und induzierter Sepsis auch bereits eine Stunde nach dem Schock eine erhöhte MPO-Konzentration in der Lunge. Wang et al. (2000) berichteten nach Verbrennungsverletzungen ebenfalls unmittelbar erhöhte Zahlen neutrophiler Granulozyten im betroffenen Gewebe, aber auch eine Erhöhung der Konzentration der Myeloperoxidase, die nach 24 Stunden einen Höhepunkt erreichte. Perl et al. (2005) berichteten am Mausmodell über eine deutliche Erhöhung der MPO-Aktivität in der Lunge zwei Stunden nach einem stumpfen Brusttrauma. 24 Stunden nach dem Trauma konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Trauma- und Kontrolltieren mehr nachgewiesen werden. Der sehr frühe Anstieg der Lungen-MPO-Aktivität deutet laut Perl et al. (2005) auf eine sehr schnelle Einwanderung polymorphkerniger Granulozyten ins Lungengewebe innerhalb der ersten 24 Stunden hin. Der Mechanismus dieser polymorphkernigen Granulozytenaktivierung wird durch einen signifikanten Anstieg der Makrophagen-Chemokine im Lungengewebe unterstützt. Davis et al. (2001) wiesen beim Schwein nach, dass es zu einem Anstieg der MPO kam, gleichgültig ob die Tiere einen hämorrhagischen Schock durch Trauma, einer zökalen Unterbindung oder einer Inzision unterzogen wurden. Der Schädigungsmechanismus scheint also keine Rolle zu spielen. Myeloperoxidase in polymorphkernigen Granulozyten spielt eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Bakterien (Suzuki et al. 1983). Davis et al. (2000) fügte Schweinen im rechten Brustbereich eine Kontusionsverletzung zu. Auch in dieser Studie zeigte sich eine deutliche Erhöhung der MPO-Spiegel in der Lunge. Nach Cernak et al. (1996) ist die Lungen-MPO-Aktivität geeignet, um die Konzentration der neutrophilen Granulozyten im Lungenparenchym zu quantifizieren. Eine stumpfe Traumaverletzung induzierte in ihrer Studie an Hasen eine erhöhte MPO-Aktivität im Lungengewebe. Auch Liener et al. (2003) betonen, dass die MPO-Aktivität ein gutes Maß für das Ausmaß der Granulozyteninfiltration darstellt. Das Ausmaß der neutrophilen und Lymphozyten-Apoptose ist wichtig für eine effiziente Abwehrreaktion auf Trauma und Sepsis (Liener et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde auch das Malonsäuredialdehyd (MDA) in Lungen- und Lebergewebe von Ratten bestimmt. Die Tiere der Traumagruppe hatten zu allen vier Messzeitpunkten erheblich niedrigere Werte als die Kontrolltiere. Zum Zeitpunkt sechs, 24 und 48 Stunden war der Unterschied signifikant, zum Zeitpunkt 72 Stunden nach dem Trauma aber nicht mehr. Die Werte nach sechs Stunden betragen in der Traumagruppe $0,195 (* 1000 \mu\text{mol/g})$ und in der Kontrolle $0,627 (* 1000 \mu\text{mol/g})$. Zwischen den Zeitpunkten war jedoch in beiden Gruppen keine signifikante Veränderung im Konzentrationsverlauf festzustellen. Im Lebergewebe hatten die Ratten der Traumagruppe lediglich sechs Stunden nach der Lungenkontusion signifikant niedrigere MDA-Werte als die Kontrolltiere. Zu den anderen Zeitpunkten waren die Unterschiede nicht mehr signifikant und auch der Verlauf innerhalb der jeweiligen Gruppe zeigte keine signifikanten Veränderungen. Sechs Stunden nach dem Trauma waren die Werte der Ratten der Traumagruppe im Mittel $1,728 (* 1000 \mu\text{mol/g})$ und die der Kontrolltiere $1,48 (* 1000 \mu\text{mol/g})$.

Die Messung von MDA hat sich als anerkannte Methode etabliert, die Zerstörung von Lipidstrukturen durch freie Radikale in vivo zu klassifizieren. Das antioxidative Potential des Organismus ist vorrangiges Überlebensprinzip und entscheidet weitgehend und unmittelbar über Gesundheit oder Krankheit. Die Einschätzung und Messung ist aber immer noch schwierig. Lipidperoxidation ist eine Reaktion, die in der Folge der Bildung freier Radikale in Geweben und Zellen abläuft. Die oxidative Reaktion ist ein Phänomen des unkontrollierten, oxidativen Stresses. Zwischen Lipidperoxidation und dem Ausmaß der Membranzerstörung besteht eine gute Korrelation (Steinkellner 1997). Die Lipidperoxidation setzt erst dann ein, wenn die antioxidative Potenz der Enzymsysteme nicht mehr ausreicht. Daher kann die MDA-Bestimmung die Bestimmung der antioxidativen Enzyme nicht ersetzen. Sie ergänzt sie aber insofern als sie eine Aussage über den funktionellen Zustand bzw. die Reserven dieser Enzyme und deren Kompensationsfähigkeit gegenüber freien Radikalen erbringen kann (Steinkellner 1997).

Brückner et al. (1999a) berichteten über 85 traumatisierte Patienten, die bereits an der Unfallstelle Blutproben entnommen erhielten. Später bei Klinikaufnahme und weiter in stündlichen bzw. täglichen Zeitintervallen wurde ebenfalls Blut entnommen. Bei der Analyse zeigte sich, dass von den Lipidperoxidationsprodukten das Malondialdehyd bei

Patienten mit Kopfverletzungen bereits an der Unfallstelle sichtlich erhöht war. Innerhalb von 2-4 Stunden nach dem Unfall kehrten die Werte in den Normbereich zurück. Alle Patienten zeigten in den ersten Stunden nach dem Unfall einen Anstieg der MDA-Werte und zwar unabhängig von der Verletzungskombination. Auch Brückner et al. (1999b) untersuchten verschiedene Lipidperoxidationsparameter bei Patienten mit Thoraxverletzungen (Thoraxtrauma, Polytrauma mit Thoraxtrauma). Insgesamt wurden 35 traumatisierte Patienten eingeschlossen. Eine Kontrollgruppe bestand aus Patienten mit Polytrauma ohne begleitende Thoraxverletzung. In der ersten Phase nach dem Trauma war bei allen Gruppen eine signifikant erhöhte Konzentration von MDA im Serum zu erkennen. Zwischen einer halben bis zwei Stunden nach dem Trauma nahm der MDA-Plasmaspiegel in der Gruppe mit Polytrauma und Thoraxtrauma kontinuierlich ab und verfehlte dabei nur knapp das Signifikanzniveau. Ab der 4. Stunde nach dem Trauma begann in allen Gruppen eine kontinuierliche MDA-Zunahme. Bei den polytraumatisierten Patienten maßen die Autoren ab der 12. Stunde bis zum Ende der Beobachtung im Vergleich zu Normalwerten erhöhte MDA-Konzentrationen. Auch in der Thoraxtraumagruppe waren die MDA-Werte weit außerhalb des physiologischen Bereichs.

Jedes schwere Trauma führt zu einer generalisierten Entzündungsreaktion im Organismus, wobei in der Lunge polymorphkernige neutrophile Leukozyten sequestriert werden. Dieser Vorgang beginnt bereits kurz nach einem Trauma und ist begleitet von einer Freisetzung diverser Mediatoren. Die ersten Mediatoren, welche nach dem Trauma erscheinen, sind Sauerstoffradikale, die durch Reduktion von molekularem Sauerstoff zum Superoxidanion entstehen. Dieses Molekül wiederum wird umgewandelt in das Hydrogenperoxid und in einem weiteren Reduktionsschritt werden Hydroxylradikale gebildet (Brückner et al. 1999b).

O₂-Radikale können auch durch Autooxidation kleinerer Moleküle, löslicher Enzyme und Proteine sowie beim Abbau von Arachidonsäuremetaboliten gebildet werden (Brigham und Meyrick 1986). Sauerstoffradikale lagern sich leicht an die Doppelbindungen der mehrfach ungesättigten Lipidbestandteile von Zellmembranen an, lösen diese auf und strukturieren sie um. Diese Lipidoxidation entspricht einem inflammatorischen Vorgang. Produkte dieser Lipidoxidation können entweder in Form des

relativen Endproduktes Malonsäuredialdehyd (MDA) und/oder als sog. konjugierte Diene im Serum nachgewiesen werden (Brückner et al. 1999b).

Die Generierung von Sauerstoffradikalen hängt auch mit dem Abbauweg der Arachidonsäure zusammen. Zum einen werden bei der Entstehung von Prostaglandinen über den Cyclooxygenase-Weg auch O_2 -Radikale gebildet, zum anderen hemmen Produkte der Lipidperoxidation die Degradierung von Prostaglandinen, so dass eine zusätzliche Akkumulation dieser vasoaktiven Substanzen eintritt. In der Studie von Brückner et al. (1999b) zeigte sich bei sehr schwer verletzten Patienten ab der 12. Stunde nach dem Trauma eine signifikant erhöhte MDA-Konzentration. Dies deuteten die Autoren als gesteigerte Lipidperoxidation auf der Basis von verstärkt generierten O_2 -Radikalen.

Osuna et al. (1998) untersuchten Lungengewebe von 94 an stumpfen Thoraxtrauma verstorbenen Patienten bzw. Kontrollpersonen ohne Lungenverletzung. Die niedrigsten durchschnittlichen MDA-Werte fanden sie in den Kontrollproben, die höchsten bei Personen, die an stumpfem Thoraxtrauma verstorben waren, aber die Verletzung noch eine Weile überlebt hatten. Die Unterschiede waren signifikant. Allerdings zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den mittleren Spiegeln der MDA im Lungengewebe mit dem Alter der Patienten, dem postmortalen Intervall oder der Schwere des Thoraxtraumas. Signifikante Korrelationen fanden sich jedoch zwischen der Überlebenszeit und den Werten der Lipidperoxidation im unteren linken, mittleren rechten und unteren rechten Lungenlappen. Die Autoren deuteten ihre Resultate dahingehend, dass die Lipidperoxidation ein Prozess ist, der nur im lebenden Organismus abläuft, so dass längere Überlebenszeiten zu einem höheren Grad der Lipidperoxidation führen.

4.3.2. Prostaglandine

Im Rahmen der eigenen Studie wurden auch verschiedene Prostaglandine bestimmt. Prostaglandin ist ein aus mehreren ungesättigten Fettsäuren gebildetes Gewebshormon. Wichtigste Quelle ist die Arachidonsäure, die über Phospholipase A_2 aus Phospholipiden freigesetzt wird. Phospholipase A_2 spaltet Acylgruppen vom C_2 des Glycerinrestes ab. Prostaglandine modulieren second-messenger-Systeme. Sie gelten als entscheidende inflammatorische Mediatoren bei posttraumatischen Endothelschäden und

Permeabilitätsstörungen. Bei jeder Verletzung ist daher mit einer Freisetzungsreaktion in unterschiedlichem Ausmaß zu rechnen (Gebhard et al. 1996).

Die Kaskade als Antwort auf ein Trauma beginnt mit den Zytokinen IL-1 und Tumornekrosefaktor α . Infolgedessen steigen die Spiegel von NO und Cyclooxygenase. Als Endresultat kommt es zur Freisetzung von Thromboxanen, Prostaglandinen, Plättchenaktivierendem Faktor mit nachfolgender Aktivierung der Blutkoagulation und das ICAM steigt an (DeLong et al. 2004). Nach Baumgartner et al. (1996), Danz et al. (1996), Grieser et al. (2001) und Regel et al. (1988) werden durch chirurgische Verletzungen des Lungengewebes spezifische Akutreaktionen ausgelöst, die im Kreislauf nachweisbar sind und damit auf den Gesamtorganismus wirken können. Hierbei sind vor allem Substanzen aus der Stoffgruppe der Prostanoiden (Thromboxan, Prostazyklin und Prostaglandin E) erhöht.

Bei Patienten nach Polytrauma konnte eine erhöhte $\text{PGE}_{2\alpha}$ -Synthese der Monozyten nachgewiesen werden (Faist et al. 1987). $\text{PGE}_{2\alpha}$ wird auch von alveolaren Makrophagen freigesetzt. Es spielt eine zentrale Rolle in der Immunsuppression nach ausgedehnten Verbrennungen oder schweren Traumen, also dann, wenn der gesamte Organismus betroffen und gefordert ist. Er bewirkt eine Unterdrückung der sog. Lymphozytenantwort. Dabei beruht der Haupteffekt auf einer Hemmung der zellulären Interleukin-2-Produktion (Ertel und Faist 1993, Faist et al. 1996).

Faist et al. (1987) berichteten, dass Patienten nach einem Polytrauma eine erhöhte PGE-Synthese der Monozyten aufwiesen. Nach Rose und Marci (1998) kommt Prostaglandin E_2 aufgrund seiner immunsupprimierenden Eigenschaften und der Tatsache, dass Cyclooxygenase-Inhibitoren die Immunkompetenz von Makrophagen nach Trauma steigern, eine zentrale Bedeutung in der posttraumatischen Immunmodulation zu. Die Lipidmediatoren des Arachidonsäurestoffwechsels spielen eine wichtige Rolle als permeabilitätssteigernde Faktoren bei membranabhängigen Prozessen (Rose und Marci 1998).

Rose und Marci (1998) betonen, dass PGE_2 ein bedeutender Mediator der Immunsuppression ist, der nach Trauma ansteigt. Nach Brückner et al. (1999b) repräsentieren die Konzentrationen einzelner Prostanoiden, die in der systemischen Zirkulation gemessen werden, nicht wirklich die lokalen Konzentration am Ort der Verletzung. Ferner sind selbst beim Gesunden erhöhte Prostanoidspiegel zu beobachten, wenn abnahme-

technisch bedingte Fehler vorliegen. Auch viele Faktoren wie Stress, Narkose, Abszess, Wunddebridement beeinflussen ihre Konzentration. Daher sollten biochemische Parameter, die einer physiologischen Dynamik von Freisetzung und Abbau unterliegen, nicht nur punktuell analysiert, sondern auch immer im zeitlichen Verlauf beurteilt werden (Brückner et al. 1999b).

Abbauprodukte der Arachidonsäure werden als die bedeutsamsten Einflussgrößen der pulmonalen Zirkulation bezeichnet, da sie in der Pathophysiologie und eventuell auch der Pathogenese des septischen Schockgeschehens beteiligt sind (Demling et al. 1981, Gryglewski et al. 1978, Kumar und Das 1994, Wagner et al. 1993). Die über die Cyclooxygenase generierten Metabolite haben entweder stark vasokonstriktorische oder vasodilatatorische Eigenschaften und ihnen kommt daher eine große Bedeutung für die Lungenfunktion nach einer Lungenschädigung zu (Brückner et al. 1999b, Wagner et al. 1993).

Eine Inaktivierung der wichtigsten Arachidonsäuremetabolite durch die Lunge würde eine "schützende Funktion" der arteriellen Zirkulation vor generalisierten, schädigenden Auswirkungen bedeuten. Daher erscheint es einleuchtend, dass eine Metabolisierung von Prostazyklin als protektiver Faktor eher nachteilig wäre (Brückner et al. 1999b, Eling und Ally 1981).

Für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase ist ein Gleichgewicht der natürlichen Antagonisten Thromboxan und Prostazyklin unerlässlich. Diese Balance spielt insbesondere für die Entstehung einer akuten respiratorischen Insuffizienz (ARDS) in der Klinik eine wichtige Rolle. Brückner et al. (1999b) beobachteten bei Patienten mit Thoraxverletzungen kurz nach dem Unfall eine etwa 20fach gesteigerte Produktion von Prostazyklin aus den Endothelzellen der Lunge. Die Freisetzungsreaktion war jedoch nicht vom Schweregrad oder dem Muster der Verletzung abhängig, d.h. gruppenspezifische Unterschiede traten in diesem Bereich nicht auf. Die Autoren sehen die massiv gesteigerte PGI₂-Produktion als Indikator einer mikrovaskulären Schädigung der Lunge an, da besonders das vaskuläre Gewebe der Lunge reich am Enzym Prostaglandinsynthetase ist (Moncada und Vane 1978).

Im Patientenkollektiv von Brückner et al. (1999b) blieben die Konzentration von Prostazyklin im Vergleich zur wesentlichen stärkeren Thromboxanfreisetzung nach dem Trauma eher niedrig, was wiederum bedeutet, dass etwa 4-5 mal so viel Thrombo-

xan wie Prostazyklin in die Zirkulation gelangt. Eine mögliche Ursache dieses Phänomens könnte darin bestehen, dass die Prostazyklinsynthetase zu einem früheren Zeitpunkt als die Thromboxansynthase gesättigt ist, d.h. bei Zunahme der Freisetzung des Vorläufermoleküls PGH_2 erreicht die Produktion von Prostazyklin ein Plateau, während Thromboxan weiterhin konzentrationsmäßig linear ansteigt.

Im Patientenkollektiv von Brückner et al. (1999b) hatten polytraumatisierte Patienten mit und ohne thorakale Beteiligung noch am 5.-10. Tag nach dem Trauma gegenüber den Normwerten signifikant gesteigerte Blutspiegel von PGE_2 . PGH_2 hemmt die T-Zellaktivität durch Verminderung der Interleukin-2-Synthese und erhöht die cAMP-Konzentration und übt damit einen ungünstigen Effekt auf die alveolären Makrophagen aus. Außerdem supprimiert PGH_2 die Synthese von Tumornekrosefaktor auf der mRNA-Ebene und führt somit zu einer Downregulation der TNF-Produktion. Es schützt aber auch vor einer exzessiven Produktion schädlicher inflammatorischer Mediatoren durch Monozyten. Dieser inhibitorische und antiinflammatorische Effekt kann aber nach Trauma oder Sepsis verloren gehen. Insbesondere die erhöhte Freisetzung von PGE_2 könnte für die gehemmte zelluläre Proliferation von Lymphozyten bei schwerstverletzten Patienten verantwortlich sein (Ertel und Trentz 1994).

Interessanterweise unterschieden sich im Patientenkollektiv von Brückner et al. (1999a) die später überlebenden von den später verstorbenen Patienten nach Polytrauma signifikant hinsichtlich ihrer PGE_2 -Spiegel.

Das Prostaglandin 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (Prostazyklin) war in eigenen Studien in beiden Tiergruppen nicht signifikant verändert. Dies galt für den gesamten 72stündigen Beobachtungszeitraum innerhalb der jeweiligen Tiergruppe. Auch zeigten sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten. Prostazyklin wird physiologischerweise von der endothelialen Oberfläche der Strombahn im Lungengewebe produziert und freigesetzt. Durch seine gefäßdilatatorische und aggregationshemmende Wirkung auf Thrombozyten beugt es auf dieser Weise der Thrombosierung der Mikrozirkulation vor. Der stabile Metabolit des Prostazyklin, das 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, wird in der Lunge nicht weiter abgebaut und kann damit als Maß einer PGI_2 -Freisetzung herangezogen werden (Gebhard 1997, Gryglewski et al. 1978).

Eine Freisetzung von PGI_2 kann sowohl durch Schädigungen des Endothels selbst als auch durch Mediatoren anderer Läsionsorte induziert werden. Hohe PGI_2 -Konzentrationen sollen eine gewisse günstige Wirkung beim Vorliegen eines ARDS entfalten, da der vasodilatative Effekt des Prostazyklins auf die Mikrostrombahn der Lungengefäße eine bessere Gewebedurchblutung garantiert und das Shuntvolumen verkleinert (Cuiper et al. 1996).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der eigenen Studie zeigte sich in der Untersuchung von Davis et al. (1999) bei Schweinen nach Lungenkontusionstrauma ein zwar sehr langsamer, aber deutlicher Anstieg des Prostazyklins auf 300% des Basiswertes innerhalb von drei Stunden im Plasma. Gebhard et al. (1997) verglichen Patienten mit unterschiedlichen Traumen bezüglich der Freisetzung ihrer Arachidonsäuremetaboliten. Bei allen Traumapatienten wurden verschiedenste Arachidonsäuremetaboliten verstärkt freigesetzt, wobei sich die Prostazyklinwerte nicht zwischen Patienten mit lediglich einem Thoraxtrauma und Patienten mit Polytrauma unterschieden. Cernak et al. (1999b) stellten bei 1.303 verletzten Soldaten aus dem ehemaligen Jugoslawienkrieg signifikante Anstiege der Thromboxanspiegel und gleichzeitige Abfälle der 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ /Thromboxan-Ratio im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen fest. Dies galt für den gesamten fünftägigen Beobachtungszeitraum nach der Verletzung. Bei Patienten mit stumpfen Thoraxtraumen waren diese Veränderungen am stärksten ausgeprägt. Die Veränderung des Verhältnisses zwischen Thromboxan und Prostazyklin insbesondere nach stumpfem Thoraxtrauma wird auch von anderen Autoren bestätigt (Huang et al. 1996). In dieser Studie an Hunden zeigte sich, dass sowohl die Thromboxan- als auch die Prostazyklinspiegel nach der Verletzung zunächst anstiegen, das Prostazyklin jedoch innerhalb von 24 Stunden nach der Verletzung wieder abfiel. Insgesamt stieg der Quotient Thromboxan/Prostazyklin im Blutplasma nach der Verletzung leicht an, zeigte aber 24 Stunden nach dem Trauma keine Unterschiede mehr zur Kontrollgruppe. Cernak et al. (1999b) bestimmten bei 65 Patienten nach stumpfem Thoraxtrauma in der frühen posttraumatischen Periode verschiedene Eicosanoide. Im Vergleich zu Kontrollpersonen zeigten die Traumapatienten extrem erhöhte Plasmaspiegel von 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$. Die Werte blieben innerhalb der ersten sechs Stunden nach der Verletzung sehr hoch. Das Verhältnis von 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ zu Thromboxan lag bei den Kontrollpersonen bei 2,39 und bei den Traumapatienten war

es signifikant niedriger. Strecker et al. (2003) berichteten bei 107 Traumapatienten, dass nur eine schwache Korrelation zwischen den 6-keto-PGF_{1α}-Spiegel und der Schwere des Traumas gefunden werden konnte. Gebhard et al. (2000) werteten verschiedene Parameter bei 69 Patienten mit Polytrauma aus. Die PGI-Werte waren am Unfallort, bei der Klinikaufnahme und innerhalb der ersten 24 Stunden stündlich gemessen worden und waren stets erhöht. Nach Seeger et al. (1988) verläuft der Anstieg des Prostaglandin-I₂ nach Lungenverletzung deutlich langsamer als der Anstieg des Thromboxans, was zu den Veränderungen des Quotienten beider Metaboliten beitragen könnte.

Analog der Ergebnisse zum Prostazyklin zeigte sich auch beim Prostaglandin 13,14-Dihydro-15-Keto-PGF_{2α} (PGM) zu allen Untersuchungszeitpunkten kein signifikanter Unterschied der beiden Rattengruppen. Auch über den zeitlichen Untersuchungsverlauf hinweg kam es zu keiner signifikanten Veränderung des PGM in der Trauma- und in der Kontrollgruppe.

PGF_{2α} wird in begrenztem Umfang im Lungengewebe freigesetzt und ein Anstieg wird sowohl nach direkten Traumen als auch bei Sepsis beobachtet. Im septischen Schock ist die Freisetzung sehr charakteristisch, so dass hier zwischen hypo- und hyperdynamer Form eines septischen Schocks unterschieden werden kann (Gebhard 1997).

In Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen zeigte sich auch in der Studie von Brückner et al. (1999b) bei Patienten mit Thoraxverletzungen, dass die Konzentration von PGF_{2α} bei den Patienten nach dem Trauma nicht so stark vom Normalwert abwich, wie die übrigen Prostanoiden. Die höchsten Konzentrationen wurden immer bei Patienten mit Polytrauma gemessen, die gleichzeitig eine Thoraxbeteiligung hatten. Polytraumatisierte ohne Thoraxbeteiligung und Patienten mit überwiegendem Thoraxtrauma unterschieden sich trotz unterschiedlichen Schweregrades der Verletzung hinsichtlich des PGF_{2α} kaum. Ferner zeigten sich bei diesen beiden Gruppen keine signifikanten Abweichungen vom Referenzwert. PGF_{2α} wird aus den Endothelzellen der Lunge freigesetzt und gilt als Indikator der metabolischen Kapazität der Lunge (Jose et al. 1976). Es bewirkt eine Broncho- und Vasokonstriktion. Während einer einzigen Lungenpassage wird das Molekül nahezu vollständig zu PGM umgebaut und inaktiviert. Die Lunge metabolisiert das Endoperoxid PGH₂, das Vorläufermolekül von Prostazyklin, Throm-

boxan und $\text{PGF}_{2\alpha}$ in einem typischen Muster. Änderungen dieses Gleichgewichts durch eine Schädigung der Lungen nach Trauma können somit für eine respiratorische Störung verantwortlich sein (Endres 1993, Kumar und Das 1994). Andererseits kann man aus solchen Ungleichgewichten auch auf eine Schädigung des Lungengewebes zurückschließen, denn die Inaktivierung der Arachidonsäuremetaboliten ist nur bei einer normalen, ungestörten Lungenfunktion möglich (Brückner et al. 1999b).

Strecker et al. (2003) berichteten, dass bei Patienten mit Kopfverletzungen das $\text{PGF}_{2\alpha}$ als Marker dahingehend dienen konnte, dass es signifikant mit dem Schweregrad der Kopfverletzung korrelierte und zwar von der ersten Stunde bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nach 24 Stunden. Bei Thoraxtraumata ergab sich diese Korrelation aber nicht.

Nach Gebhard et al. (2000) waren bei Patienten mit Multitrauma die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Spiegel sowohl am Unfallort, bei der Klinikaufnahme und innerhalb der ersten 24 Stunden stündlich gemessen worden und waren stets erhöht.

4.4. Fazit der Studie

Insgesamt zeigt die eigene Studie deutliche Veränderungen der Arachidonsäuremetaboliten nach stumpfen Thoraxtrauma bei Ratten. Daraus jedoch einen prädiktiven Unterscheidungswert zur Bewertung der Schwere des Traumas abzuleiten, ist mit den Resultaten der vorliegenden Studie nicht möglich. In Übereinstimmung mit den Studien und Arbeiten der Literatur zeigt sich, dass jedes Verletzungsmuster, das eine Thoraxkomponente aufweist, auf der Basis der Metabolitenfreisetzung generell als höhergradig hinsichtlich der Schwere einzustufen ist als vergleichbare Traumen ohne Beteiligung des Brustkorbes. Dies ergibt sich aus der grundsätzlich sehr ähnlichen Freisetzungreaktion der Entzündungsmediatoren bei sehr unterschiedlich ausgeprägtem Schweregrad der Verletzung (Brückner et al. 1999b).

Das Schädigungsmuster der Lungen der traumatisierten Ratten der vorliegenden Studie entspricht den Veränderungen, die nach bilateraler Lungenkontusion beim Menschen nachgewiesen werden (Obertacke et al. 1994, Regel et al. 1988). Das Trauma der Ratten führte zu einer signifikanten Erhöhung proinflammatorischer ($\text{PGF}_{2\alpha}$) jedoch

nicht von antiinflammatorischen (PGI) wirksamer Arachidonsäuremetaboliten. Die erhöhten Serumspiegel des (PGF_{2α}) bei unveränderter Plasmakonzentration seines Metaboliten PGM deuten auf eine anhaltende Gasaustauschstörung und Dysfunktion der Syntheseleistung der Lunge hin. Auch in anderen experimentellen Untersuchungen sind Erhöhungen der Plasmakonzentration von Thromboxan-A₂ in der Frühphase (< 2 h) und später von PGI (4-6 Stunden) nach Trauma bekannt (Davis et al. 1999, Melton et al. 1999). Die von Liener et al. (2004) beobachtete späte Erhöhung von Thromboxan könnte auf eine zweiphasige Entzündungsreaktion nach pulmonaler Kontusion hindeuten.

Bei polytraumatisierten Patienten mit begleitender Thoraxverletzung tritt vor allem in der frühen Phase nach Trauma eine stark erhöhte Ausschüttung von Prostanoiden auf. Daher sollte nach Brückner et al. (1999b) bei diesen Patienten auf jede invasive Intervention verzichtet werden, die eine zusätzliche Mediatorfreisetzung mit möglichen Folgeschäden beinhaltet. Allerdings kommt sowohl nach den eigenen Ergebnissen als auch jenen von Brückner et al. (1999b) keinem der untersuchten Mediatoren bislang ein prädiktiver oder frühzeitig prognostischer Wert zu. Dies wurde auch durch die Arbeit von Strecker et al. (2003) bestätigt.

In Übereinstimmung mit Untersuchungen an Patienten, die von Gebhard et al. (1997) vorgenommen wurden, zeigte auch die vorliegende Studie einen deutlichen Anstieg der Spiegel von Prostanoiden nach Thoraxtrauma. Das Trauma führt zu einer transienten oder kontinuierlichen Veränderung der metabolischen Funktion des endothelialen Gewebes der Lunge. Diese Veränderungen zeigen sich unabhängig davon, aufgrund welcher Ursache und mit welchem Verletzungsmechanismus das stumpfe Thoraxtrauma entstand (Gebhard et al. 1997).

Die freigesetzten Arachidonsäuremetaboliten führen zu einer Aktivierung der Gerinnung und der Komplementkaskade, was zu einer Freisetzung einer potenten Kombination löslicher Mediatoren und einer systemischen Entzündungsreaktion führt. Die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und die Freisetzung ihrer Proteasen und reaktiven Sauerstoffmetaboliten verstärkt den Untergang der Gewebestrukturen sowohl lokal als auch systemisch. Nach akuter Lungenverletzung steigen insbesondere die Prostanoiden an (Davis et al. 1999).

Therapeutische Strategien müssten daher die Modulation der neutrophilen Granulozyten und/oder ihrer Produkte zum Ziel haben (Perl et al. 2005).

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich durch eine kontaktlose Druckwellenverletzung im Thorax des Kleintieres (Ratte) eine reproduzierbare Schädigung der Lunge erzielen lässt und ob sich die beobachteten makroskopischen und histologischen Veränderungen ähnlich wie die Verletzungsfolgen beim Menschen sind. Ferner interessierte die Frage, ob ein solches Thoraxtrauma zu einer Degranulation von neutrophilen Granulozyten ausschließlich in der Lunge oder auch in anderen Organen führt und ob es zu einer Veränderung der Lipidperoxidation auf zellulärer Ebene kommt.

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar-Ratten verwendet, denen mittels Druckwellengenerator stumpfe Thoraxtraumata zugefügt wurden. Die erzeugten stumpfen Thoraxtraumen bei Ratten entsprechen in ihrem Schädigungsmuster sowohl makroskopische als auch mikroskopisch den beim Menschen auftretenden Veränderungen nach bilateraler Lungenkontusion.

Es zeigten sich sichtbare, bilaterale Lungenhämorrhagien, jedoch keine Verletzungen intraabdomineller Organe. Mikroskopisch wiesen die traumatisierten Tiere alveoläre und bronchiale Einblutungen, interstitielle und alveoläre Ödeme, Pleuraverdickung, Endothelschwellung und zahlreiche eingewanderte Granulozyten im Lungenpräparat auf. Die beobachtete Einwanderung der Granulozyten steht im Einklang mit der festgestellten, erhöhten Myeloperoxidasekonzentration in der Lunge. Hingegen zeigte sich, dass die traumatisierten Ratten niedrigere Malonsäuredialdehydspiegel als die Kontrolltiere aufwiesen. Das Prostaglandin 6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ und damit das Prostacyclin war bei den Versuchstieren nicht signifikant von den Werten der Kontrolltiere unterschiedlich. Analog zeigte sich auch beim Prostaglandin 13,14-Dihydro-15-keto-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Tiergruppen.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Studie deutliche Veränderungen der Arachidonsäuremetaboliten nach stumpfen Thoraxtrauma bei den Ratten. Insbesondere die proinflammatorischen (Prostaglandin $F_{2\alpha}$) jedoch nicht die antiinflammatorischen (Prostacyclin I) Arachidonsäuremetaboliten änderten sich signifikant. Möglicherweise führt eine pulmonale Kontusion zu einer zweiphasigen Entzündungsreaktion. Aus den Ergebnissen dieser Studie ist jedoch kein prädiktiver Unterscheidungswert zur Bewertung der Traumaschwere abzuleiten.

Da polytraumatisierte Patienten mit begleitender Thoraxverletzung vor allem in der frühen Phase nach dem Trauma eine starke Ausschüttung von Prostanoiden aufweisen, sollten zusätzliche invasive Interventionen, die eine weitere Mediatorfreisetzung mit sich bringen, möglichst reduziert werden. Bei der Entwicklung therapeutischer Strategien nach Thoraxtrauma muss die Modulation der neutrophilen Granulozyten und ihrer Metaboliten berücksichtigt werden.

6. Literatur

1. Arndt H, Palitzsch KD, Anderson DC, Rusche J, Grisham MB, Granger DN: Leukocyte-endothelial cell adhesion in a model of intestinal inflammation. *Gut* 37: 374-379 (1995)
2. Balk RA, Jacobs RF, Tryka AF, Townsend JW, Walls RC, Bone RC: Effects of ibuprofen on neutrophil function and acute lung injury in canine endotoxin shock. *Crit Care Med* 16: 1121-1127
3. 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)
4. Baue AE: Clinical-mediator correlations of multiple organ failure and preventive/therapeutic strategies: to block, stimulate or replace? That is the question. In: Faist M, Meakins P, Schildberg F (Eds.): *Host defense dysfunction in trauma. Shock and Sepsis*. Springer Verlag, Berlin, S.881-889 (1993)
5. Baumgartner F, Omari B, Lee J: Survival after trauma pneumonectomy: the pathophysiology balance of shock resuscitation with right heart failure. *Am Surg* 62: 967-972 (1996)
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. Bhatia M, Saluja AK, Hofbauer B, Lee HS, Frossard JL, Steer ML: The effect of neutrophil depletion on a completely non-invasive model of acute pancreatitis-associated lung injury. *Int J Pancreatol* 24: 77-83 (1998)
8. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Sauaia A, Banerjee A, Peterson VM: Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure. *J Trauma* 39: 411-417 (1995)
9. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G: Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78: 206-209 (1982)
10. Brückner UB, Pfetsch H, Kinzl L, Bock KH, Gebhard F: Prognostische Bedeutung präklinisch erfaßter biochemischer Mediatoren beim Polytrauma. *Zbl Chir* 124: 303-310 (1999a)
11. Brückner UB, Rösch M, Kelbel MWR, Gebhard F: Prostanoidfreisetzung und Lipidperoxidation bei Patienten mit Thoraxverletzungen. *Zbl Chir* 124: 144-158 (1999b)

12. Buchardi H: Das akute Lungenversagen - eine kritische Analyse. *Langenbeck's Arch Chir* 372: 53-58 (1987)
13. Burford TH, Burbank B: Traumatic wet lung. *J Thorac Surg* 14: 415-419 (1945)
14. Calhoon JH, Trinkle JK: Pathophysiology of chest trauma. *Chest Surg Clin North Am* 7: 199-211 (1997)
15. Cannon L: Behind armour blunt trauma - an emerging problem. *J R Army Med Corps* 147: 87-96 (2001)
16. Cernak I, Savic J, Malicevic Z, Zunic G, Radosevic P, Ivanovic I: Leukotrienes in the pathogenesis of pulmonary blast injury. *J Trauma* 40 (Suppl.): 148-151 (1996)
17. Cernak I, Savic J, Zunic G, Pejnovic N, Jovanikic O, Stepic V: Recognizing, scoring and predicting blast injuries. *World J Surg* 23: 44-53 (1999a)
18. Cernak I, Savic J, Ignjatovic D, Jevtic M: Blast injury from explosive munitions. *J Trauma* 47: 96-104 (1999b)
19. Champion HR, Copes WS, Sacco WJ, Lawnick MM, Keast SL, Bain LW, Flanagan ME, Frey CF: The major trauma outcome study: establishing national norms for trauma care. *J Trauma* 30: 1356-1365 (1990)
20. Chen KD, Li YS, Kim M, Li S, Yuan S, Chien S, Shy JY: Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins and Shc. *J Biol Chem* 274: 18393-18400
21. Chida M, Voelkel NR: Effects of acute and chronic hypoxia on rat lung cyclooxygenase. *Am J Physiol* 270: L872-878 (1996)
22. Clemendson CJ, Hultman H: Air embolism and cause of death in blast injury. *The Military Surgeon* 6: 424-437 (1954)
23. Cohn SM: Pulmonary contusion: review of the clinical entity. *J Trauma* 42: 973-979 (1997)
24. Cohn SM, Zieg PM: Experimental pulmonary contusion: review of the literature and description of a new porcine model. *J Trauma* 41: 565-571 (1996)
25. Cook JA, Li E, Halushka PV: Arachidonic acid metabolism in endotoxemia and sepsis: therapeutic approaches. In: Faist M, Meakins P, Schildberg F (Eds.): *Host defense dysfunction in trauma. Shock and Sepsis*. Springer Verlag, Berlin, S.297-303 (1993)

26. Cuiper LL, Price PV, Christman BW: Systemic and pulmonary hypertension after abrupt cessation of prostacyclin: role of thromboxane A₂. *J Appl Physiol* 80: 191-197 (1996)
27. Daniel RA, Cate WR: "Wet lung" - an experimental study. *Ann Surg* 127: 836-847 (1948)
28. Danz B, Biehl C, Bühren W: Zur Akutdiagnostik therapierelevanter Thoraxverletzungen bei schwer- und polytraumatisierten Patienten. *Fortschr Geb Roentgenstr Neuen Bildgeb Verfahr* 164: 269-274 (1996)
29. Davis KA, Fabian TC, Croce MA, Proctor KG: Prostanoids: early mediators in the secondary injury that develops after unilateral pulmonary contusion. *J Trauma* 46: 824-832 (1999)
30. Davis KA, Fabian TC, Ragsdale N, Trentham LL, Proctor KG: Endogenous adenosine and secondary injury after chest trauma. *J Trauma* 49: 892-898 (2000)
31. Davis KA, Fabian TC, Ragsdale DN, Trentham LL, Croce MA, Proctor KG: Combination therapy that targets secondary pulmonary changes after abdominal trauma. *Shock* 15: 479-484 (2001)
32. DeLong WG, Born CT: Cytokines in patients with polytrauma. *Clin Orthop Rel Res* 422: 57-65 (2004)
33. Demling RH, Smith M, Gunther R: Pulmonary injury and prostaglandin production during endotoxemia in conscious sheep. *Am J Physiol* 240: 348-353 (1981)
34. Desselle WJ, Greenhaw JJ, Trentham LL, Fabian TC, Proctor KG: Macrophage cyclooxygenase expression, immunosuppression, and cardiopulmonary dysfunction after blunt chest trauma. *J Trauma* 51: 239-252 (2001)
35. Dodd KT, Mundi TG, Lagutchik MS, Morris JR: Cardiopulmonary effects of high-impulse noise exposure. *J Trauma* 43: 656-666 (1997)
36. Dresing K, Sievers KW, Obertacke U, Reicke B, Schmit-Neuburg KP: Primary diagnosis and follow-up after thoracic trauma and lung contusion. *Zbl Chir* 119: 690-701 (1994)
37. Eling TE, Ally AI: Pulmonary biosynthesis and metabolism of prostaglandins and related substances. *Bull Eur Physiopath Respir* 17: 611-625 (1981)
38. Einsiedel T, Liener U, Brinkmann A, Träger K, Liewald F, Perner S, Kinzl L, Gebhard F: Letaler Verlauf nach Mehrfachverletzung. Das Thoraxtrauma als entscheidender Faktor. *Unfallchirurg* 106: 771-776 (2003)

39. Endres S: Messengers and mediators: interactions among lipids, eicosanoids and cytokines. *Am J Clin Nutr* 57: 798-800 (1993)
40. Ertel W, Faist E: Immunologisches Monitoring nach Trauma. *Unfallchirurg* 96: 200-212 (1993)
41. Ertel W, Trentz O: Polytrauma und Multiorgan-Dysfunktionssyndrom (MODS). Definition - Pathophysiologie - Therapie. *Zbl Chir* 119: 159-167 (1994)
42. Faist E, Mewes A, Backer CC, Strasser TH, Alkan SS, Rieber P, Heberer G: Prostaglandin E₂ (PGE₂)-dependent suppression of interleukin-2 (IL-2) production in patients with major trauma. *J Trauma* 27: 837-848 (1987)
43. Faist E, Schinkel C, Zimmer S: Update on the mechanism of immune suppression of injury and immune modulation. *World J Surg* 20: 454-459 (1996)
44. Frossard JL, Saluja AK, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, Steer ML: The role of intercellular adhesion molecule-1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 116: 694-701 (1995)
45. Fujikawa T, Yukioka T, Ishimaru S, Kanai M, Muraoka A, Sasaki H, Honma H, Koike S, Kawaguchi S: Endovascular stent grafting for the treatment of blunt thoracic aortic injury. *J Trauma* 50: 223-229
46. Fulton RL, Peter ET: The progressive nature of pulmonary contusion. *Surgery* 67: 499-506 (1970)
47. Garfield MJ, Howard-Griffin RM: Non-invasive positive pressure ventilation for severe thoracic injuries. *Br J Anaesth* 85: 788-790 (2000)
48. Gavelli G, Canini R, Bertaccini P, Battista G, Bna C, Fattori R: Traumatic injuries: imaging of thoracic injuries. *Eur Radiol* 12: 1273-1294 (2002)
49. Gebhard F: Zelluläre Immunantwort und Aktivierung von Mediatoren nach chirurgisch induzierter Verletzung des Lungengewebes. Med. Habil., Universität Ulm (1997)
50. Gebhard F, Rösch M, Strecker W, Kinzl L, Brückner UB: Sind ISS und PTS untaubliche Trauma Scores zur Vorhersage eines (möglichen) posttraumatischen Lungenversagens? *Langenbeck's Arch Chir Suppl. II*: 331-333 (1996)
51. Gebhard F, Kelbel MWR, Strecker W, Kinzl L, Brückner UB: Chest trauma and its impact on the release of vasoactive mediators. *Shock* 7: 313-317 (1997a)
52. Gebhard F, Marzinzig M, Hartel W, Bruckner UB: Systematic release of prostanooids after surgically-induced injury of lung tissue. *Langenbecks Arch Chir* 382: 243-251 (1997b)

53. Gebhard F, Riepl C, Liener UC, Kinzl L, Brückner UB: Volume replacement in trauma patients within the first 24 h and its impact on the interpretation of biochemical data. *Langenbeck's Arch Surg* 385: 406-411 (2000)
54. Girisgen AS, Cander B, Gederet YT, Agrali Y: The role of cTnl levels in the detection of etiological factors for cardiac contusion. *Ulus Travma Derg* 8: 82-85 (2002)
55. Goff DR: Chest wall, pleura, and thoracic duct trauma. In: Lopez-Viego MA (Ed.): *The Parkland Trauma Handbook*. Mosby Yearbook, Baltimore, 203-216 (1994)
56. Grieser T, Buhne KH, Hauser H, Bohndorf K: Significance of findings of chest x-rays and thoracic CT routinely performed at the emergency unit: 102 patients with multiple trauma. A prospective study. *Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr* 173: 144-151 (2001)
57. Gryglewski RJ, Korbut R, Ocetkiewicz A: Generation of prostacyclin by lungs in vivo and its release into arterial circulation. *Nature* 273: 765-767 (1978)
58. Guy RJ, Kirkman E, Watkins PE, Cooper GJ: Physiologic responses to primary blast. *J Trauma* 45: 983-987 (1998)
59. Haslett C: Granulozyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 5-11 (1999)
60. Hellinger A, Obertacke U, Konerding MA, Malkusch W, Redl H, Schlag G, Schmidt-Neuerburg KP: Ultrastructural and morphometric alterations in experimental lung contusion. *Circ Shock* 39: 4-12 (1993)
61. 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)
62. Hopkinson BR, Border JR, Schenk WG: Experimental closed chest trauma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 55: 580-585 (1968)
63. Huang JZ, Yang Z, Wang Z, Leng H: Study on characteristics of blast-fragment combined injury in dogs. *J Trauma* 40 (Suppl.): 63-67 (1996)
64. Hunt JP, Baker CC, Lentz CW, Rutledge RR, Oller DW, Flowe KM, Nayduch DA, Smith C, Clancy TV, Thomason MN, Meredith JW: Thoracic aorta injuries: management and outcome of 144 patients. *J Trauma* 40: 547-555
65. Irwin RJ, Lerner MR, Bealer JF, Brackett DJ, Tuggle DW: Cardiopulmonary physiology of primary blast injury. *J Trauma* 43: 650-655 (1997a)

66. 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 (1997a)
67. 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)
68. Jaffray C, Yang J, Carter G, Mendez C, Norman J: Pancreatic elastase activates pulmonary nuclear factor kappa B, mimicking pancreatitis-associated adult respiratory distress syndrome. *Surgery* 128: 225-233 (2000)
69. Johnston AM: Pulmonary effects of combined blast injury and radiation poisoning. *J R Army Med Corps* 150: 22-26 (2004)
70. Jose P, Niederhauser U, Piper PJ, Robinson C, Smith AP: Degradation of prostaglandin F_{2α} in the human pulmonary circulation. *Thorax* 31: 713-719 (1976)
71. Keel M, Trentz O: Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 36: 691-709 (2005)
72. Kelly ME, Miller PR, Greenhaw JJ, Fabian TC, Proctor KG: Novel resuscitation strategy for pulmonary contusion after severe chest trauma. *J Trauma* 55: 94-105 (2003)
73. Klebanoff SJ, Waltersdorff AM, Rosen H: Antimicrobial activity of myeloperoxidase. *Methods Enzymol* 105: 399-403 (1984)
74. Knöferl MW, Liener UC, Seitz DH, Perl M, Brückner UB, Kinzl L, Gebhard F: Cardiopulmonary, histological and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. *Shock* 19: 519-525 (2003)
75. Kopetzky MA: Aktivierung von Lymphozyten-Subpopulationen und Immigrationsverhalten neutrophiler Granulozyten nach experimentellem Thoraxtrauma der Ratte. *Med. Diss., Universität Ulm* (2005)
76. Krohn PL, Whitteridge D, Zuckerman SH: Physiological effects of blast. *Lancet* 28: 252-258 (1942)
77. Kumar GS, Das UN: Effect of prostaglandins and their precursors on the proliferation of human lymphocytes and their secretion of tumor necrosis factor and various interleukins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 50: 331-334 (1994)
78. Kurz M: Lokale und systemische Entzündungsreaktion nach experimentellem Thoraxtrauma. *Med. Diss., Universität Ulm* (2004)

79. Levinsin W, Jawetz E: Host Defenses. In: Appleton, Lange (Hrsg.): Medical Microbiology and Immunology, Examination and Board Review. 4th Ed., Kapitel 8, 35-39 (1996)
80. Liener UC: Immunologische Reaktionen nach experimentellem Thoraxtrauma. Univ.-Habil., Ulm (2003)
81. Liener UC, Rapp U, Lampl L, Helm M, Gauss A, Kinzl L, Gebhard F: Trauma-inzidenz im Alb-Donau-Kreis. Ergebnisse einer populationsbasierten Untersuchung. Vortrag, Thoraxtraumameeting 2002 auf Schloss Reisingburg (2002)
82. Liener UC, Knöferl MW, Sträter J, Barth TFE, Pauser EM, Nüssler AK, Kinzl L, Brückner UB, Gebhard F: Induction of apoptosis following blunt chest trauma. *Shock* 20: 511-516 (2003)
83. 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)
84. Lundberg AH, Granger N, Russell J, Callicutt S, Gaber LW, Kotb M, Sabek O, Gaber AO: Temporal correlation of tumor necrosis factor-alpha release, upregulation of pulmonary ICAM-1 and VCAM-1, neutrophil sequestration, and lung lung injury in diet-induced pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 4: 248-257 (2000)
85. Matute-Bello G, Winn RK, Jonas M, Chi EY, Martin TR, Liles WC: Fas (CD95) induces alveolar epithelial cell apoptosis in vivo: implications for acute pulmonary inflammation. *Am J Pathol* 158: 153-161 (2001)
86. McSwain NE: Blunt and penetrating chest injuries. *World J Surg* 16: 924-929 (1992)
87. Melton SM, Davis KA; Moomey CB, Fabian TC, Proctor KG: Mediator-dependent secondary injury after unilateral blunt thoracic trauma. *Shock* 11: 396-402 (1999)
88. Miller PR, Croce MA, Bee TK, Qaisi WG, Smith CP, Collins GL, Fabian TC: ARDS after pulmonary contusion: accurate measurement of contusion volume identifies high-risk patients. *J Trauma* 51: 223-228 (2001)
89. Miller PR, Croce MA, Kilgo PD, Scott J, Fabian TC: Acute respiratory distress syndrome in blunt trauma: identification of independent risk factors. *Am Surg* 68: 845-850 (2002)
90. Moncada S, Vane JR: Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxidase, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 30: 293-331 (1978)

91. Moseley RV, Vernick JJ, Doty DB: Response to blunt chest injury: a new experimental model. *J Trauma* 10: 673-683 (1970)
92. 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)
93. Neuhoef H: Actions and interactions of mediator systems and mediators in the pathogenesis of ARDS and multiorgan failure. *Acta Anaesthesiol Scand* 35 (Suppl.95): 7-14 (1991)
94. Nichols RT, Pearce HJ, Greenfield LJ: Effects of experimental pulmonary contusion on respiratory exchange and lung mechanics. *Arch Surg* 96: 723-730 (1968)
95. Obertacke U, Redl H, Schlag G, Schmit-Neuerburg KP: Lokale und systemische Reaktionen nach Lungenkontusion. *Unfallchirurg* 240: 98-126 (1994)
96. Obertacke U, Neudeck F, Wish HL, Schmit-Neuerburg KP: Kostenanalyse der Primärversorgung und intensivmedizinischer Behandlung polytraumatisierter Patienten. *Unfallchirurg* 100: 44-49 (1997)
97. Obertacke U, Neudeck F, Majetschak M, Hellinger A, Kleinschmidt C, Schade FU, Hogansen 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)
98. Obinger C: Entwicklung von Inhibitoren für humane Myeloperoxidase. Universität für Bodenkultur und Angewandte Wissenschaften, Wien. www.chemie.boku.ac.at/H772_projekt.html (20. Juli 2004)
99. Oppenheimer L, Craven KD, Forkert L, Wood LD: Pathophysiology of pulmonary contusion in dogs. *J Appl Physiol* 47: 718-728 (1997)
100. Osuna E, Perez-Carceles MD, Garcia-Lorente A, Sanchez-Hanke M, Vieira DN, Carvalho L, Püschel K, Luna A: Lipid peroxidation in lung tissue after chest trauma and correlation with the duration of the post-trauma survival period. *Int J Legal Med* 111: 256-260 (1998)
101. Pape HC, Remmers D, Rice J, Ebisch M, Krettek C, Tscherne H: Appraisal of early evaluation of blunt chest trauma: development of a standardized scoring system for initial clinical decision making. *J Trauma* 49: 496-504 (2000)
102. Parsey MV, Tuder RM, Abraham E: Neutrophils are major contributors to intra-parenchymal lung IL-1 β expression after hemorrhage and endotoxemia. *J Immunol* 160: 1007-1013 (1998)

103. Perl M, Gebhard F, Brückner UB, Ayala A, Braumüller S, Büttner C, Kinzl L, Knöferl MW: Pulmonary contusion causes impairment of macrophage and lymphocyte immune functions and increases mortality associated with a subsequent septic challenge. *Crit Care Med* 33: 1351-1358 (2005)
104. Pinilla JC: Acute respiratory failure in severe blunt chest trauma. *J Trauma* 22: 221-226 (1982)
105. Pretre R, Chilcott M: Blunt trauma to the heart and great vessels. *N Engl J Med* 336: 626-632 (1997)
106. Raghavendran K, Davidson BA, Woytash JA, Helinski JD, Marschke CJ, Mander-scheid PA, Notter RH, Knight PR: The evolution of isolated bilateral lung contusion from blunt chest trauma in rats: cellular and cytokine responses. *Shock* 24: 132-138 (2005)
107. Regel G, Sturm JA, Friedl HP, Nerlich M, Bosch U, Tscherne H: Die Bedeutung der Lungenkontusion für die Letalität nach Polytrauma. Möglichkeiten der therapeutischen Beeinflussung. *Chirurg* 59: 771-776 (1988)
108. Regel G, Lobenhoffer P, Lehmann U, Pape HC, Pohlemann T, Tscherne H: Ergebnisse der Behandlung Polytraumatisierter. Eine vergleichende Analyse von 3406 Fällen zwischen 1972 und 1991. *Unfallchirurg* 96: 350-362 (1993)
109. Regel G, Lobenhoffer P, Grotz M, Pape HC, Lehmann U, Tscherne H: Treatment results of patients with multiple trauma: an analysis of 3406 cases treated between 1972 and 1991 at a german level I trauma center. *J Trauma* 38: 70-78 (1995)
110. Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G: Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1176-1180
111. Rose S, Marzi I: Pathophysiologie des Polytraumas. *Zbl Chir* 121: 896-913 (1996)
112. Rose S, Marzi I: Mediators in polytrauma - pathophysiological significance and clinical relevance. *Langenbeck's Arch Surg* 383: 199-208 (1998)
113. Salter DM, Millward-Sadler SJ, Nuki G, Wright MO: Integrin-interleukin-4 mechanotransduction pathways in human chondrocytes. *Clin Orthop* 391 Suppl: 49-60
114. Schlag G, Redl H: Mediators in trauma. *Acta Anaesthesiol Belgica* 38: 281-291
115. Schoenberg MH, Poch B, Moch D, Marzinzig M, Marzinzig E, Mattfeldt T, Gruber H, Beger HG: Effect of acadesine treatment on postischemic damage to small intestine. *Am J Physiol* 269: H1752-H1759 (1995)

116. Shorr RM, Crittenden M, Indeck M, Hartunian SL, Rodriguez A: Blunt thoracic trauma. Analysis of 515 patients. *Ann Surg* 206: 200-205 (1987)
117. Seeger W, Neuhof H, Hall J, Roka L: Pulmonary vasoconstrictor response to soluble fibrin in isolated lungs: possible role of Thromboxane generation. *Circulation Res* 62: 651-659 (1988)
118. Serrao KL, Fortenberry JD, Owens ML, Harris FL, Brown LA: Neutrophils induce apoptosis of lung epithelial cells via release of soluble Fas ligand. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L298-L305 (2001)
119. Statistisches Bundesamt: Gesundheitsbericht für Deutschland. S. 280-285. Metzler Poeschel, Berlin (1998)
120. Statistisches Bundesamt: Gesundheitsbericht für Deutschland. www.destatis.de (2001)
121. Steinkellner EM: Die Aussagekraft der Bestimmung von Malondialdehyd (Thio-barbitursäurereaktive Substanzen - TBARS) für die Bestimmung des antioxidativen Status. *Praxis* 7: 3 (1997); www.oego.at/co/co_vii_3.htm
122. Stewart KC, Urschel JD, Nakai SS, Hamilton SM: Pulmonary resection for lung trauma. *Ann Thorac Surg* 63: 1587-1588 (1997)
123. Strong VE, Mackrell PJ, Concannon EM, Naama HA, Schaefer PA, Shaftan GW, Stapleton PP, Daly JM: Blocking prostaglandin E2 after trauma attenuates proinflammatory cytokines and improves survival. *Shock* 14: 374-379 (2000)
124. Strecker W, Gebhard F, Perl M, Rager J, Buttenschön K, Kinzl L, Beck A: Biochemical characterization of individual injury pattern and injury severity. *Int J Care Injured* 34: 879-887 (2003)
125. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T: Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 132: 345-352 (1983)
126. Tremblay LN, Slutsky AS: Ventilator-induced injury: from barotrauma to bio-trauma. *Proc Assoc Am Phys* 110: 482-488 (1998)
127. 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)
128. Trupka AW, Trautwein K, Waydhas C, Nast-Kolb D, Pfeiffer KJ, Schweiberer L: Can diagnosis and subsequent trauma management of the multiple trauma patient with blunt thoracic trauma be improved by early computerized tomography of the thorax? *Zbl Chir* 122: 666-673 (1997)

129. Wagner RB, Slivko B, Jamieson PM, Dills MS, Edwards FH: Effect of lung contusion through the cytoskeleton. *Science* 260: 1124-1127 (1993)
130. 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)
131. Waters CM, Sporn PH, Liu M, Fredberg JJ: Cellular biomechanics in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L503-L509
132. www.baua.de/statistik/stat_2000 (2000)
133. Yagi K: A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med* 15: 212-216 (1976)

Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Liener herzlich bedanken, der mir diese Arbeit ermöglichte. Er begleitete mich stets mit wertvollen Ratschlägen, was mich bei der Durchführung der Arbeit sehr unterstützt hat.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Florian Gebhard, der das Gesamtprojekt ursprünglich angestoßen und entwickelt hat, der Arbeitsgruppe stets Hilfe bot und bei offenen Fragen jederzeit zur Verfügung stand.

Besonders bedanken möchte ich mich bei den MTA's Silke Gotschy und Sonja Braummüller sowie den Eheleuten Marzinsig, die eine große Hilfe während der Durchführung und Ausarbeitung der Arbeit waren und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Mein Dank richtet sich auch an alle Angehörigen der beiden Traumateams.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden und Freunden Michael Kopetzky und Matthias Kurz sowie der leider tödlich verunglückten Evi Pauser für die bemerkenswerte Zeit im Studium und Labor bedanken.

Lebenslauf

Name: Marquardt
Vorname: Sven
Geburtsdatum: 29.04. 1976
Geburtsort: Ravensburg

Schulische Bildung:

1982 - 1986 Grundschule Kirchgraben in Albstadt
1986 - 1995 Gymnasium Ebingen
1995 Abitur und allgemeine Hochschulreife

Grundwehrdienst:

07.1995 - 06.1996; Sanitätsoffizieranwärter der Bundeswehr ab 1.1.1997

Studium:

1997 - 2004 Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
20.04.2004 3. Staatsexamen
01.10.2004 Approbation als Arzt
seit 04.05.2004 Weiterbildungsassistent der Abteilung Anästhesie, Intensivmedizin,
Notfallmedizin und Schmerztherapie im Bundeswehrzentralrankenhaus Koblenz