

Aus der Klinik für Neurologie, Abteilung für Experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Entzündungsreaktion und Immundepression nach akuter
traumatischer Rückenmarkverletzung –
Charakterisierung der post-traumatischen Immunantwort und
Auswirkungen von Infektionen auf die Erholung
neurologischer Funktionen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marcel Alexander Kopp

aus Hagen

Datum der Promotion: 04. September 2015

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
<i>Abstract deutsch</i>	3
<i>Abstract englisch</i>	5
<i>Einführung</i>	7
<i>Methodik</i>	9
<i>Ergebnisse</i>	13
<i>Diskussion</i>	17
<i>Literaturverzeichnis</i>	21
Eidesstattliche Versicherung	23
<i>Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen</i>	23
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	25
<i>Publikation 1 – Prüss et al., 2011</i>	27
<i>Publikation 2 – Failli et al., 2012</i>	39
<i>Publikation 3 – Kopp et al., 2013</i>	63
Lebenslauf (<i>aus Datenschutzgründen nicht enthalten</i>)	77
Vollständige Publikationsliste	79
Danksagung	81

Zusammenfassung

Abstract deutsch

Einleitung: Infektionen sind häufige Komplikationen und Haupttodesursache nach akuter Rückenmarkverletzung. Zudem sind systemische Infektionen mit schlechterer funktioneller Erholung nach Verletzungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) assoziiert. Mechanische Beatmung oder Schluckstörungen mit Aspiration bieten allein keine hinreichende Erklärung für die hohe Inzidenz von Pneumonien nach Rückenmarkverletzung. Erschwerend kommt das *Spinal Cord Injury-induced Immune Depression Syndrome* (SCI-IDS) hinzu, dem eine Störung der normalerweise fein abgestimmten Wechselwirkungen zwischen Immunsystem und ZNS zugrunde liegt. Auch die verletzungsbedingte Entzündungsreaktion, deren Abklingen – die sogenannte Resolution – im ZNS verzögert und möglicherweise unvollständig stattfindet, könnte zu einer kompensatorischen Immundepression beitragen. Diesen immunologischen Aspekten der Querschnittlähmung sind die hier zusammengefassten Studien gewidmet.

Methodik: Die Resolution von Leukozytenpopulationen im ZNS wurde nach experimenteller Rückenmarkverletzung unter Anwendung eines Modells der Halbwertszeit-Kinetik beschrieben. Es konnten zelltypspezifische Resolutionsindices berechnet werden – das Resolutionsintervall (Zeitdifferenz vom Maximum bis zum Abfall der Zellzahl um 50%) und das Resolutionsplateau (verbleibende Zellzahl in Prozent des Maximums).

Die Hypothese, dass Infektionen (Pneumonien/post-operative Wundinfektionen) mit schlechterer neurologischer Erholung nach Rückenmarkverletzung assoziiert sind, wurde in einer prospektiven, multizentrischen Datenbank klinisch untersucht. Die Verlaufsbeurteilung erfolgte nach den *International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury*. In multiplen Regressionsmodellen wurde für demografische Faktoren, Verletzungsschwere und klinische Charakteristika adjustiert.

Die Prognose-Studie mit dem Kurztitel *SClentineI* dient der genaueren klinisch-immunologischen Charakterisierung des SCI-IDS. Das Studienprotokoll wurde auf Grundlage von Pilotstudien entwickelt. Eine administrative Zwischenanalyse basiert auf Daten zur Vollständigkeit des primären Laborparameters (HLA-DR Expression auf Monozyten) hinsichtlich der berechneten Rekrutierungsziele.

Ergebnisse: Es zeigten sich deutliche Unterschiede im Resolutionsverhalten (Resolutionsintervall / Resolutionsplateau) der einzelnen Immunzelltypen: neutrophile Granulozyten (1,2 Tage / 0%); T-Lymphozyten (1,5 Tage / 10%); aktivierte Macrophagen oder Microglia (55 Tage / 45%).

Infektionen im Verlauf nach akuter Rückenmarkverletzung wurden als ein unabhängiger Risikofaktor für das Ausbleiben einer Verbesserung des neurologischen Schweregrades (*ASIA impairment scale*) nach einem Jahr identifiziert (Odds Ratio 1,89; $p < 0,0005$). Zusätzlich wurde eine Assoziation von Infektionen mit geringer Verbesserung der Muskelkraft im ASIA motor score (Regressionskoeffizient: -8,21; $p < 0,0005$) dargestellt.

Die Evaluation der Umsetzbarkeit der *SCIntinel-Studie* ergab nach Einschluss von 60 der etwa 118 zu rekrutierenden Patienten eine überwiegend ausreichende bis gute Vollständigkeit der Zielparameter.

Schlussfolgerung: Durch einen neu eingeführten Index, das Resolutionsplateau, kann die im ZNS zurückbleibende „immunologische Narbe“ systematisch quantifiziert werden. Infektionen wurden erstmals als Einflussgröße auf die neurologische Erholung nach Rückenmarkverletzung dargestellt. Die Früherkennung von Patienten mit hohem Infektionsrisiko anhand immunologischer Marker könnte zukünftig die Indikationsstellung zur Vorbeugung und Therapie von Infektionen nach Querschnittlähmung erleichtern.

Abstract englisch

Introduction: Infections are a frequent complication and a major cause of death after acute spinal cord injury (SCI). Furthermore, infections are associated with minor functional outcome after central nervous system (CNS) injury. Mechanical ventilation or aspiration due to swallowing disorders alone do not sufficiently explain the high incidence of pneumonia after SCI. Aggravating effects of the *Spinal Cord Injury-induced Immune Depression Syndrome* (SCI-IDS), which is caused by a disruption of the normally well-balanced interactions between the immune system and the CNS, are most likely. Likewise, the injury-related inflammatory response might contribute to compensatory immune-depression. The resolution of inflammation in the CNS is delayed and probably incomplete. This work summarises three studies on immunological aspects of SCI.

Methods: The resolution of leukocyte populations after SCI has been quantified using a model applicable for half-life kinetics. Cell-type-specific resolution indices were calculated: the resolution interval (days from maximum cell numbers to 50% decrease) and the resolution plateau (percentage of remaining cell numbers relative to the maximum).

The hypothesis, that infections (pneumonia/post-operative wound infections) are associated with poor neurological recovery, was examined in a longitudinal, prospective, multicenter database. The *International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury* were applied. Using multiple regression analysis we adjusted for demographic factors, injury severity and clinical characteristics.

The prognostic *SClentineI-study* aims at immunologically defining the SCI-IDS. The protocol is based on pilot trials. An administrative interim analysis comprises data on the completeness of the primary laboratory endpoint – HLA-DR expression on monocytes.

Results: The resolution indices (resolution interval / resolution plateau) revealed clear cell-types-specific differences: neutrophils (1.2 days / 0%); T-lymphocytes (1.5 days / 10%); activated macrophages/microglia (55 days / 45%).

Infections after acute SCI were identified as independent risk factor for non-improvement in the *ASIA impairment scale* one year post-trauma (odds ratio 1.89,

$p < 0.0005$). Additionally, an association of infections with lower gain in the ASIA motor score (regression coefficient: -8.21, $p < 0.0005$) has been demonstrated.

The interim feasibility evaluation of the *SClentineI-study* was performed after inclusion of 60 patients, representing 50% of the calculated sample size. The analysis revealed a principally sufficient to good data completeness.

Conclusions: The newly introduced resolution plateau index allows for a systematic quantification of the „immunological scar“ after CNS-injury. Infections may act as a disease-modifying factor after SCI by affecting neurological outcome. Using immunological markers, patients predisposed to develop infections might be identified and treated earlier in the future.

Einführung

Weltweit gesehen variiert die Häufigkeit der traumatischen Querschnittlähmung und liegt durchschnittlich bei 23/1.000.000 pro Jahr. Für Deutschland ist in der Literatur eine Inzidenz von 11/1.000.000 angegeben.¹ Traumatische Rückenmarkverletzungen entstehen hauptsächlich durch Frakturen der Wirbelsäule mit Dislokation, die zur Kontusion und Kompression des Rückenmarks im Spinalkanal führen. Im Moment der Verletzung werden Zellen, Axone und Blutgefäße mechanisch zerstört. Im Verlauf kommt es zu intramedullären Blutungen sowie Zeldysfunktion und Zelltod durch Excitotoxizität und Ischämie, letztere wird durch vasogene und zytotoxische Ödembildung weiter verstärkt.^{2,3} Die Auswirkungen der traumatisch bedingten massiven Entzündungsreaktion im Rückenmark, die im Rahmen dieser Arbeit unter dem Aspekt des Abklingens der Entzündung im zentralen Nervensystem (ZNS) untersucht wurde⁴, sind im Hinblick auf das Überwiegen protektiver oder schädigender Effekte bisher nicht eindeutig zugeordnet worden.^{4,5}

Eine Querschnittlähmung hat offensichtliche Funktionseinschränkungen des Bewegungsapparates, der Atmung und des sensiblen Systems zur Folge. Mindestens gleichbedeutend ist die Dysregulation des autonomen Nervensystems im Sinne von kardialen, gastrointestinalen und neuro-urologischen Störungen. Neurogene Aspekte einer Immundepression nach ZNS-Verletzungen⁶ wurden im Zusammenhang mit Rückenmarkverletzungen erst seit den 1990er Jahren vermutet^{7,8} und 2009 als *Spinal Cord Injury-induced Immune Depression Syndrome* (SCI-IDS)⁹ klinisch beschrieben. Diese Pilotstudien erbrachten Hinweise für gestörte Lymphozyten-Proliferation und NK-Zell-Funktion, sowohl nach akuter⁷ als auch nach chronischer⁸ Querschnittverletzung. Die aktuellere Studie lieferte auch erste longitudinale Daten zum SCI-IDS.⁹ Hier wurde ein sehr frühes Maximum der Immundepression innerhalb der ersten Woche nach der Verletzung festgestellt. Mit Ausnahme der Granulozyten fielen die Zahlen der meisten Leukozytensubpopulationen bereits am ersten post-traumatischen Tag ab. Gleichzeitig wurde eine verminderte Expression von HLA-DR beobachtet.⁹ HLA-DR gehört zu den *Major Histocompatibility Complex*-Klasse-II Molekülen (MHC II) und ist für die Antigenpräsentation und Initiierung der adaptiven Immunantwort essentiell.

Infektionen sind Hauptkomplikationen und Haupttodesursachen in der akuten und subakuten Phase nach einer Querschnittverletzung.¹⁰ Da Infektionen präventiven und

therapeutischen Maßnahmen zugänglich sind, bilden sie einen klinisch relevanten Faktor in der Behandlung Rückenmarkverletzter. Neben einer Reduktion der Mortalität kann durch Vorbeugung oder frühe Therapie von Infektionen möglicherweise auch einer vermehrten Neurodegeneration entgegenwirkt werden, die durch systemische Infektionen bedingt sein kann^{z.B. 11} und die in der Folge zu einem schlechteren Rehabilitationsergebnis führen könnte. Hinweise für negative Auswirkungen von Infektionen auf die neurologische Erholung nach akuter ZNS-Schädigung kommen aus dem Bereich der klinischen Schlaganfallforschung.^{z.B. 12} Die Fragestellung, ob systemische Infektionen die Wiederherstellung neurologischer Funktionen beeinträchtigen können, wurde mit dieser Arbeit anhand einer, in eine prospektive klinische Datenbank eingebetteten Observationsstudie erstmals auch nach traumatischer Rückenmarkverletzung untersucht.¹³

Die Pathophysiologie des SCI-IDS umfasst möglicherweise neben der verstärkten Anfälligkeit für Infektionen mit negativen Folgen für das Überleben und den Erhalt neurologischer Restfunktionen auch protektive Mechanismen, im Sinne einer Begrenzung von potentieller Autoimmunität. Diese könnte durch eine ZNS-Verletzung, einhergehend mit dem massiven Kontakt des peripheren Immunsystems mit ZNS-Epitopen, die sonst durch die intakte Blut-Hirn-Schranke abgeschirmt sind, begünstigt werden.⁶ Der Aspekt von Autoimmunität nach Rückenmarkverletzung sowie dem SCI-IDS zugrundeliegende Mechanismen werden in einer laufenden Prognosestudie mit dem Kurztitel „*SClentine*-Studie“ untersucht, die auf den oben genannten Pilotstudien^{7,8,9} aufbaut. Die Studie ist Bestandteil dieser Arbeit und soll die Darstellung einer Schweregrad- und Läsionshöhenabhängigkeit des SCI-IDS ermöglichen.¹⁴

Die Zielstellung dieser Arbeit ist, das Verständnis des immunologischen Verlaufs der Querschnittlähmung zu vertiefen. In den hier zusammengefassten Publikationen werden Defizite in der Auflösung der lokalen Entzündungsantwort – die im Folgenden als Resolution bezeichnet wird – nach experimenteller Rückenmarkverletzung durch eine Berechnung von Resolutionsindices als Kenngrößen systematisch quantifiziert.⁴ Es wird ferner die Hypothese geprüft, ob Infektionen einen unabhängigen Risikofaktor für eine schlechtere neurologische Erholung nach Rückenmarkverletzung darstellen.¹³ Zusätzlich wird das Protokoll der prospektiven *SClentine*-Studie zur genaueren Charakterisierung des SCI-IDS vorgestellt und eine administrative Zwischenanalyse der Studiendaten hinsichtlich der Umsetzbarkeit des Protokolls diskutiert.¹⁴

Methodik

Die zelluläre Entzündungsantwort im Rückenmarksgewebe nach experimenteller Verletzung wurde mittels immunhistochemischer Färbungen dargestellt. Die verwendeten Tiermodelle sind eine inkomplette dorsale 4/5 Transsektionsverletzung des thorakalen Rückenmarks nach Laminektomie in Höhe des Segments Th8 sowie eine Kontroll-Operation. Letztere besteht einzig aus einer Laminektomie und dient dem Ausschluss von Effekten, die auf einer chirurgischen Intervention ohne ZNS-Verletzung beruhen könnten. Die Tötung der Tiere zur Gewebsentnahme erfolgte an den Tagen 1, 3, 7, 14 und den Wochen 4 und 10 nach Rückenmarkverletzung sowie an Tag 7 nach Kontroll-Operation. Das Gewebe wurde mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.⁴ Die immunhistochemischen Färbungen wurden an 5 µm dicken Schnitten durchgeführt. Als zelltypspezifische Marker wurden Primärantikörper verwendet, die gegen folgende Antigene gerichtet waren: ED1 (CD68) zur Markierung von Macrophagen/Microglia, W3/13 (CD43) zur Identifizierung von T-Lymphozyten und Myeloperoxidase (MPO) zur Darstellung neutrophiler Granulozyten. Die gebundenen Sekundärantikörper wurden mittels Diaminobenzidin visualisiert. Zur Darstellung der Zellkerne wurde mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt. Da auch einzelne Macrophagen MPO exprimieren, wurden nur segmentkernige MPO-positive Zellen als Granulozyten gewertet. Ebenso wurden in die Auswertung W3/13-positiver T-Lymphozyten die Kernmorphologie und die Kern-Plasma-Relation einbezogen; in Abgrenzung zu Granulozyten und Macrophagen sind nur Zellen mit nicht-segmentiertem Kern und schmalen Zytoplasmasaum gewertet worden. Zur weiteren Deskription der Macrophagen wurde ED1 mit den Antigenen CD8, CD86 und CD206 doppelgefärbt. Als Negativkontrollen dienten Schnitte, die mit unspezifischen IgG1 Isotyp Antikörpern oder ohne Primärantikörper inkubiert wurden.⁴

Die Zelltypen im Läsionsareal wurden pro Tier auf einer Fläche von 0,625 mm² lichtmikroskopisch gezählt. Für jeden Zeitpunkt wurden Mittelwert und Standardabweichung der Zellzahl berechnet. Zur Beschreibung etablierter Resolutionsindices¹⁵ wurden zelltypspezifisch die maximale Zellzahl (Ψ_{\max}) und der Zeitpunkt des Maximums (T_{\max}) bestimmt. Unter Annahme einer Halbwertszeit-Kinetik für die Resolution wurde ab T_{\max} eine nichtlineare Kurvenanpassung (einphasiger exponentieller Zerfall) durchgeführt. Die Regressionskurve dient der mathematischen Beschreibung des Resolutionsintervalls (R_i) als Zeitdifferenz von T_{\max} bis zum Zeitpunkt des Abfalls von Ψ_{\max} um 50%. Durch die Kurvenanpassung wird, wenn die Zeitachse X gegen unendlich strebt,

auf der Y-Achse ein Plateau beschrieben. Dieser neu definierte Index, das Resolutionsplateau (R_p), wurde als Maß für das entzündliche Residuum verwendet.⁴

Die Assoziation von Infektionen mit neurologischer Erholung nach Rückenmarkverletzung wurde in einer prospektiven, longitudinalen Datenbank untersucht. Aus der *National Spinal Cord Injury Database*, Birmingham, Alabama, USA sind alle 24.762 Datensätze, die zum Zeitpunkt der Analyse in der Datenbank vorhanden waren, einem Screening unterzogen worden. Kriterien für die Eignung der Datensätze waren neben epidemiologischen Charakteristika, wie Patientenalter und Schweregrad der Rückenmarkverletzung, auch die Aktualität und Qualität der verwendeten Messinstrumente für die neurologische Einstufung der Patienten.¹³ Die neurologische Untersuchung ist gemäß den *International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury* (ISNCSCI) – früher *American Spinal Injury Association (ASIA) classification of Spinal Cord Injury*¹⁶ – durchgeführt worden. Aus den ISNCSCI-Untersuchungen wurden der zur Schweregradeinteilung der Querschnittlähmung herangezogene *ASIA impairment scale* (AIS), der *ASIA motor score* und die motorische und sensorische neurologische Läsionshöhe erhoben. Dokumentationszeitpunkte waren die Aufnahme in die Akutversorgung, die Aufnahme in die stationäre Rehabilitation, die Entlassung aus der stationären Versorgung und die Nachuntersuchung ein Jahr nach Rückenmarkverletzung. Als Infekte wurden radiologisch bestätigte Pneumonien und post-operative Wundinfektionen (Pn/Wi) im gesamten Verlauf dokumentiert.¹³

Die Analyse umfasste zunächst die Darstellung der Infektionsraten in Abhängigkeit von der AIS sowie deren Auftreten im Zeitverlauf bis zu einem Jahr nach Rückenmarkverletzung. Zur Charakterisierung der Patientengruppen mit Infekten bzw. ohne Infekte wurden demografische, epidemiologische und klinische Merkmale der Gruppen miteinander verglichen. Die Erholung neurologischer Funktionen, d.h. eine Veränderung im AIS, ein Punktgewinn im *ASIA motor score* oder eine Veränderung der neurologischen Läsionshöhe, wurde im Zeitverlauf, stratifiziert für den *Baseline*-AIS, deskriptiv dargestellt und mittels Chi-Quadrat-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test statistisch verglichen. Zur Adjustierung für soziodemografische Variablen, Verletzungscharakteristika und klinische Begleitumstände, wie mechanische Beatmung, wurden multiple logistische oder lineare Regressionsmodelle berechnet. Aufgrund eines erheblichen Anteils fehlender Werte im Langzeitverlauf wurden zur Korrektur eines *Attrition-Bias* die Regressionsmodelle nach Multipler Imputation wiederholt.¹³

Die Studie *Sekundäre Immunsuppression durch Rückenmarkverletzungen* mit der Kurzbezeichnung *SClentineI-Studie* ist eine prospektive internationale Studie, die an insgesamt sieben Zentren in Deutschland, der Schweiz und Kanada durchgeführt wird. Koordinierendes Zentrum ist die Klinik für Neurologie, Abteilung für Experimentelle Neurologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin. Die Studie ist im Deutschen Register Klinischer Studien erfasst (DRKS00000122).

Einschlusskriterien sind eine traumatische Wirbelsäulenverletzung mit oder ohne Querschnittsyndrom. Bei jedem Patienten sollte eine chirurgische Stabilisierung der Wirbelsäule geplant oder vorgenommen worden sein. Es werden nur volljährige und einwilligungsfähige Patienten in die Studie eingeschlossen. Wichtige Ausschlusskriterien sind schwere lebensbedrohliche Mehrfachverletzung, mittelschweres bis schweres Schädel-Hirn-Trauma sowie vorbestehende Infektionen, Neoplasien oder Autoimmunerkrankungen und vorbestehende systemische Kortikosteroidtherapie. Das Studiendesign sieht zur Darstellung neurogener Aspekte der Immunsuppression die Rekrutierung der Patienten in drei Vergleichsgruppen vor: (I) Patienten mit Rückenmarkverletzung der neurologischen Läsionshöhe Th4 oder darüber, (II) Patienten mit Rückenmarkverletzung der neurologischen Läsionshöhe Th5 oder darunter; (III) Patienten mit Wirbelkörperfraktur ohne Querschnittsyndrom. Kein Patient dieser drei Gruppen, welche die *Per-Protocol*-Population der Studie darstellen, darf eine Hochdosistherapie mit Kortikosteroiden erhalten haben. Rückenmarkverletzte Patienten, die einer solchen Behandlung im Einzelfall unterzogen wurden, können jedoch als eine vierte Gruppe zur kasuistischen Auswertung in die Studie aufgenommen werden.¹⁴

Die neurologische Klassifikation der Patienten anhand des AIS und der neurologischen Läsionshöhe wird zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie durchgeführt. Der Unfallzeitpunkt, die operativen Therapien sowie Vorerkrankungen und Begleitverletzungen werden dokumentiert. An fünf Studienvisiten im Verlauf an den Tagen 1, 3, 7 und den Wochen 2 und 10 post-traumatisch werden Infektionen anhand festgelegter Kriterien erfasst. Zu jeder Visite finden identische Blutentnahmen zur Immunphänotypisierung statt. Primärer Zielparameter ist die quantitative Messung der Expression von HLA-DR auf Monozyten mittels *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS). Ein Absinken der HLA-DR Expression auf Monozyten ist ein validierter Marker für eine Immundepression und kann für eine Prädiktion von Infektionen eingesetzt werden.¹⁷

Sekundäre Zielparameter sind eine Leukozytendifferenzierung inklusive Subpopulationen von Lymphozyten (B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen) und T-Zellen (CD3, CD4, CD8), die Messung der Zytokinsekretion nach Stimulation von T-Zellen (IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17), die Spiegelbestimmung von weiteren Immunmodulatoren (IL-6, Katecholamine) und indirekten Entzündungsparametern (CRP, Procalcitonin) im Plasma. Zusätzlich ist die Analyse der Immunparameter auf mRNA-Ebene möglich. Eine Untersuchung von zellulärer oder humoraler Autoimmunität nach Rückenmarkverletzung durch einen T-Zell Elispot unter Stimulation mit ZNS-Antigenen bzw. durch ein Screening nach Autoantikörpern im Serum der Patienten ist Gegenstand assoziierter Studien.¹⁴

Die Fallzahlschätzung basiert auf Daten der Pilotstudie aus der ersten Woche nach Rückenmarkverletzung zur Anzahl HLA-DR positiver Zellen (Riegger et al. 2009). Die Berechnung wurde für die Prüfung der Hypothese mittels one-way ANOVA für eine Effektgröße von 0,18 vorgenommen. Die Wahrscheinlichkeit für den Fehler erster Art wurde auf 0,05 (zweiseitig) und für den Fehler zweiter Art auf 0,2 festgelegt. Eine Rate von bis zu 50% fehlender Werte durch Abbruch der Studienteilnahme oder Nichterscheinen von Patienten zur Nachuntersuchung wurde berücksichtigt, ebenso die gegebenenfalls erforderliche Anwendung verteilungsunabhängiger statistischer Testverfahren.¹⁴

Das Management der Daten und Proben erfolgt pseudonymisiert. Die Blutproben für die Durchflusszytometrie einschließlich FACS sowie für den T-Zell Stimulations-Assay werden sofort innerhalb definierter Zeitfenster analysiert. Die Proben für alle weiteren Fragestellungen werden innerhalb von zwei bis sechs Stunden aufbereitet und bei -80°C oder gegebenenfalls in flüssigem Stickstoff bis zur Analyse gelagert. Die erhobenen Daten und Messergebnisse werden in einer zentralen Datenbank (Access) gespeichert. Die administrative Zwischenanalyse zur Prüfung der Rekrutierungsziele und Umsetzbarkeit des Studienprotokolls umfasste eine Darstellung der *Per-Protocol*-Population hinsichtlich der Anzahl der rekrutierten Patienten pro Vergleichsgruppe sowie eine Übersicht über die Vollzähligkeit der Laborparameter der Durchflusszytometrie pro Studienvisite und Gruppe.¹⁴

Ergebnisse

Den Schwerpunkt der Darstellung einer gestörten Entzündungsauflösung im immunprivilegierten ZNS bildete die Analyse der Dynamik der Zellzahlen von Leukozytensubtypen nach experimenteller Rückenmarkverletzung. Die Maxima der Zellzahlen im Läsionsgebiet wurden für MPO-positive neutrophile Granulozyten an Tag 3 (112 Zellen/ $0,625\text{mm}^2$), für ED1-positive Macrophagen/Microglia an Tag 7 (366 Zellen/ $0,625\text{mm}^2$) und für W3/13-positive T-Lymphozyten an Tag 3 erreicht (174 Zellen/ $0,625\text{mm}^2$). Bei Tieren mit Kontroll-Operation waren an Tag 7 nach Verletzung keine neutrophilen Granulozyten bzw. nur vereinzelte Macrophagen/Microglia und T-Lymphozyten sichtbar. Die Beschreibung der Halbwertszeit-Kinetik ab dem Maximum ergab folgende Resolutionsintervalle (R_i): für neutrophile Granulozyten 1,2 Tage, für Macrophagen/Microglia 55 Tage und für T-Lymphozyten 1,5 Tage.⁴

Neben einer Beschreibung der Kinetik liefert das Modell der Kurvenanpassung durch das Resolutionsplateau (R_p) auch ein Maß für den residualen Anteil der im Gewebe akkumulierten Immunzellen. Neutrophile Granulozyten verschwinden bis Tag 70 vollständig aus dem Läsionsareal; das R_p ist 0%. Macrophagen/Microglia verbleiben zu diesem Zeitpunkt in einem erheblichen Ausmaß im Gewebe mit einem R_p von 45%. T-Lymphozyten, die mit ähnlicher Schnelligkeit wie Granulozyten aus dem Gewebe verschwinden, sind im Gegensatz zu diesen auch noch am Ende der Beobachtungsperiode mit einem gewissen Anteil im Gewebe vertreten und haben ein R_p von 10%.⁴

Die morphologische Charakterisierung von Macrophagen/Microglia ergab im Verlauf folgendes Bild: An den Tagen 7 und 14 wiesen etwa 20 bis 30% der ED1-positiven Zellen verdickte und verzweigte Fortsätze auf, was auf aktivierte Microglia hindeutet. Diese Zellen waren vornehmlich an der Grenze zum nekrotischen Zentrum der Verletzung sichtbar. Gleichzeitig bestand der überwiegende Anteil der ED1-positiven Zellen aus Schaumzellen mit exzentrischer Kernposition, lokalisiert sowohl im Zentrum der Läsion als auch am Läsionsrand. An Tag 70 waren über 90% Gitterzellen in die Narbenformation eingestreut, bei nur vereinzelt anzutreffenden ramifizierten Zellen.⁴ Zu diesem Zeitpunkt waren deutliche Anteile von 30% bzw. 50% der Macrophagen/Microglia positiv für CD86 bzw. CD8, d.h. für Marker für eher proinflammatorische Phänotypen, und zu einem geringeren Anteil von 20% auch für CD206, d.h. für Macrophagen mit überwiegend antiinflammatorischem Profil.⁴

Die klinische Beobachtungsstudie zur Prüfung einer Assoziation von Infektionen mit der neurologischen Erholung nach Rückenmarkverletzung untersuchte zunächst die Häufigkeit von Infekten in Abhängigkeit vom Schweregrad der Querschnittlähmung. Nach Anwendung der Eignungskriterien wurden 2.089 Patienten der Schweregrade AIS A bis D in die Analyse eingeschlossen. Komplette querschnittgelähmte Patienten AIS A hatten zu 42,8% eine Pneumonie und/oder eine post-operative Wundinfektion (Pn/Wi). Motorisch komplett, sensibel inkomplett gelähmte Patienten AIS B hatten zu 32,8% eine Pn/Wi. Die Häufigkeit nahm mit geringerer Schwere weiter ab und lag bei inkomplett verletzten Patienten mit geringer motorischer Restfunktion AIS C bei 22% und bei Patienten mit überwiegend erhaltener motorischer Funktion AIS D bei 13,1%.¹³

Patienten der Schweregrade AIS C und D wurden aufgrund zu erwartender *Ceiling*-Effekte im *ASIA motor score* von der Analyse der neurologischen Erholung im Verlauf ausgeschlossen. Von den 1.436 Patienten AIS A und B in der Analyse-Population fielen 855 Patienten in die Gruppe ohne dokumentierte Pn/Wi und 581 in die Gruppe mit Pn/Wi. Über 90% der Infektionen waren Pneumonien. Die Infektionen traten in ca. 70% der Fälle während der stationären Akutversorgung und in etwa 25% der Fälle zuerst während der stationären Rehabilitation auf. Nur knapp 5% der Infektionen wurden erstmals im Verlauf des ersten Jahres nach Entlassung dokumentiert. Die Gruppen mit und ohne Infektion waren hinsichtlich epidemiologischer Faktoren, wie Alter, Geschlecht und ethnische Gruppe, vergleichbar. Auch die Rate penetrierender Rückenmarkverletzungen war nicht signifikant verschieden. Differenzen zwischen den Gruppen bestanden in der Verteilung des AIS, der neurologischen Läsionshöhe sowie der Häufigkeit mechanischer Beatmung und der stationären Wiederaufnahme.¹³

Die Zeitpunkte der Einschluss- und Verlaufsuntersuchungen [Median und Interquartilsabstand (IQR)] waren die Aufnahme in die Akutversorgung innerhalb von Tag 1 (0-2), die Aufnahme in die stationäre Rehabilitation an Tag 15 (8-25), die Entlassung aus der stationären Rehabilitation an Tag 62 (42-98), sowie die Nachuntersuchung nach einem Jahr an Tag 365 (304-408) nach Rückenmarkverletzung.¹³

Eine Konversion im AIS hin zu einem geringeren Schweregrad nach einem Jahr fand bei Patienten, die anfänglich Schweregrad AIS A aufwiesen, in der Gruppe mit Pn/Wi (n = 326) in nur 17,2% der Fälle statt, in der Gruppe ohne Pn/Wi (n = 394) hingegen in 23,9% der Fälle (p = 0,03). Bei Patienten mit anfänglichem Schweregrad

AIS B verbesserten sich in der Gruppe mit Pn/Wi (n = 70) 57,1%, in der Gruppe ohne Pn/Wi (n = 146) hingegen 74,7% der Patienten ($p = 0,009$). Zur Adjustierung für die obengenannten epidemiologischen und klinischen Variablen wurde ein multiples logistisches Regressionsmodell mit der AIS-Konversion nach einem Jahr als abhängige Variable gerechnet (n = 931). Innerhalb des Modells wurde das Vorliegen von Pn/Wi als ein unabhängiger Risikofaktor für das Ausbleiben einer Verbesserung im AIS mit einer Odds Ratio von 1,89 [95% Konfidenzintervall (KI): 1,36–2,63, $p < 0,0005$] identifiziert. Zur Korrektur für fehlende Werte wurde die Analyse nach Multipler Imputation wiederholt (n = 1428) und ergab für Pn/Wi eine Odds Ratio von 1,47 (95% KI: 1,06–2,04, $p = 0,02$).¹³

Die Erholung der motorischen neurologischen Restfunktion wurde anhand der Differenzen vom Ausgangswert im *ASIA motor score* untersucht. Der *ASIA motor score* fasst Kraftgrade von insgesamt 20 Kennmuskeln der oberen und unteren Extremitäten zusammen. Der Gesamtscore kann Werte von 0 bis 100 annehmen. Da der *ASIA motor score* – mit Ausnahme von Th1 – die thorakalen Segmente des Rückenmarks nicht abbildet, wurden nur Patienten mit zervikaler Läsionshöhe in die Analyse eingeschlossen (n = 603). Bei Aufnahme in die Rehabilitation bestanden keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen mit und ohne Pn/Wi. Im Verlauf eines Jahres wurden signifikante Unterschiede sichtbar, zunächst bei Patienten AIS B zum Zeitpunkt der Entlassung aus der Rehabilitation. Hier betrug die Veränderung im *ASIA motor score* [median (IQR)], 8 (1,5–27,5) versus 22 (9,5–45) Punkte ($p = 0,001$). Zum Zeitpunkt eines Jahres nach Rückenmarkverletzung betrug die Veränderung im *ASIA motor score* bei AIS A Patienten mit Pn/Wi 8 (4–12) Punkte versus 10 (5–17) Punkte ohne Pn/Wi ($p = 0,01$). Patienten AIS B mit Pn/Wi verbesserten sich um 19,5 (8–53,5) Punkte verglichen mit 42 (20,5–64) Punkten bei Patienten ohne Pn/Wi ($p = 0,03$). Innerhalb eines multiplen linearen Regressionsmodells mit der Differenz zum Ausgangswert im *ASIA motor score* nach einem Jahr als abhängige Variable (n = 336) konnte eine unabhängige Assoziation von Pn/Wi mit geringerer motorischer Erholung gezeigt werden [Regressionskoeffizient: - 8,21 (95% KI: -12,29 bis -4,14); $p < 0,0005$]. Auch für den *ASIA motor score* wurde das Regressionsmodell nach Multipler Imputation wiederholt (n = 603). Auch hier bestätigte das Ergebnis für Pn/Wi nach Imputation [Regressionskoeffizient: - 4,96 (95% KI: -8,85 bis -1,07); $p = 0,01$] die Analyse der vollständigen Datensätze.¹³

In der Auswertung der Veränderungen des motorischen und sensiblen neurologischen Niveaus wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen bei Patienten AIS A sichtbar. In der Gruppe mit Pn/Wi (n = 143) war, verglichen mit Patienten ohne Pn/Wi (n = 117), seltener ein Gewinn einer motorischen Funktionsstufe zu beobachten (21,7% versus 33,3%; p = 0,04). Ein ähnliches Bild ergab sich für die sensible Funktionsstufe, hier verbesserten sich Patienten mit Pn/Wi (n = 135) seltener als es bei Patienten ohne Pn/Wi (n = 102) der Fall war (24,4%, versus 37,3%; p = 0,03). Bei Patienten AIS B war keine statistisch signifikante Assoziation von Veränderungen des neurologischen Niveaus mit Infektionen darstellbar.¹³

Die *SCIntinel*-Studie zur Charakterisierung der Immundepression nach Rückenmarkverletzung (SCI-IDS) benötigt gemäß der Fallzahlplanung zum Erreichen einer Teststärke von 80% eine Fallzahl von 118 Patienten einschließlich einer geschätzten Rate von 50% für fehlende Werte. In der Berechnung wurde zusätzlich die natürlicherweise asymmetrische Verteilung des neurologischen Niveaus¹⁸ berücksichtigt. Es resultieren – basierend auf der Pilotstudie – ungleiche Größen der Vergleichsgruppen: (I) n = 48 Patienten mit Rückenmarkverletzung der neurologischen Läsionshöhe Th4 oder darüber, das entspricht 41% der Gesamtzahl; (II) n = 31 Patienten mit Rückenmarkverletzung der neurologischen Läsionshöhe Th5 oder darunter, das entspricht 26% der Gesamtzahl; (III) n = 39 Patienten mit Wirbelkörperfraktur ohne Querschnittsyndrom, das entspricht 33% der Gesamtzahl.¹⁴

Die administrative Zwischenauswertung wurde durchgeführt, als mit n = 60 für die *Per-Protocol*-Population rekrutierten und nachbeobachteten Patienten etwa 50% der berechneten Fallzahl erreicht war. In die einzelnen Gruppen wurde folgende Anzahl von Patienten eingeschlossen: (I) n = 28; (II) n = 11; (III) n = 17. Vier Patienten fielen aufgrund nachträglich aufgetretener Ausschlusskriterien aus der *Per-Protocol*-Population heraus. Das entspricht einer Ausfallrate von 7%. Gesondert in die Studie eingeschlossen wurden n = 4 Patienten, die hochdosiert Methylprednisolon erhalten hatten. Die Vollständigkeit der Hauptlaborparameter war für die Studienvisiten eins bis vier mit Werten von 57% bis 78% ausreichend bis zufriedenstellend. Eine mit nur 45% unzureichende Vollständigkeit war für die Visite fünf zum Zeitpunkt von 10 Wochen nach Rückenmarkverletzung zu verzeichnen.¹⁴

Diskussion

Nach akuten ZNS-Verletzungen, beispielsweise nach Schlaganfall oder Schädel-Hirn-Trauma (SHT), wurde eine schnell einsetzende Immundepression mit erhöhter Infektanfälligkeit unter dem Begriff *Central Nervous System Injury-induced Immune Deficiency Syndrome (CIDS)* beschrieben.⁶ Das Syndrom der Immundepression nach Rückenmarkverletzung, das SCI-IDS⁹, ist eine spezifische Variante des CIDS. Im Gegensatz zur Immundepression nach Schlaganfall oder SHT, zeichnet sich das SCI-IDS durch anatomische Besonderheiten, wie die intakte Funktion des Nervus vagus und die Läsionshöhenabhängigkeit der Störung des sympathischen Nervensystems, aus.

Als grundlegend für die neurogene Immundepression werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Das Immunsystem und das ZNS kommunizieren wechselseitig über das sympathische und parasympathische Nervensystem durch Neurotransmitter wie Noradrenalin bzw. Acetylcholin. Subpopulationen von Leukozyten besitzen Rezeptoren für Katecholamine, so zum Beispiel T-Helfer-Zellen den β 2-Adrenorezeptor oder Macrophagen den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor, beide vermitteln überwiegend antiinflammatorische Effekte. Afferente Fasern des Nervus vagus sind mit Zytokinrezeptoren, wie dem IL-1 Rezeptor, ausgestattet und können damit Informationen über eine systemische Entzündungsantwort an das ZNS weitergeben. Darüber hinaus besitzt das ZNS in bestimmten Regionen, wie den zirkumventrikulären Organen, ebenfalls Rezeptoren, die aufgrund der in diesen Regionen durchlässigen Blut-Hirn-Schranke Zytokine im Blutstrom detektieren können.⁶ Ein anderer Mechanismus der Beeinflussung des Immunsystems durch das ZNS ist eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse), die letztlich durch gesteigerte Produktion von Glucocorticoiden antiinflammatorisch wirkt. Die Aktivierung der HHN-Achse wie auch des sympathischen Nervensystems erfolgt nicht nur im Rahmen einer allgemeinen Stressantwort, sondern kann auch durch die Gegenwart von proinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin-1 β , im ZNS-Kompartiment ausgelöst werden.⁶

Neurogene Mechanismen, die dem SCI-IDS zugrunde liegen, sind zum einen die Störung des Gleichgewichts der autonomen Innervation von Immunorganen nach Schädigung der Leitungsbahnen und zum anderen die Entzündung im ZNS nach Rückenmarkverletzung. Letztere ist möglicherweise Ausgangspunkt für eine antientzündliche Gegenregulation im Sinne eines dem *Compensatory Anti-inflammatory-Response-*

Syndrom (CARS) ähnlichen Syndroms. Das CARS ist als homöostatische Reaktion auf das *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) beschrieben und wird außer über antiinflammatorische Zytokine auch über die HHN-Achse vermittelt.⁶

Die Entzündungsreaktion im ZNS folgt aufgrund des Immunprivilegs mit Besonderheiten, wie der fehlenden lymphatischen Drainage,¹⁹ einem anderen Verlauf, als ihn Entzündungen peripherer Organe zeigen, und ist durch langanhaltende Präsenz von Entzündungszellen im Gewebe, also durch ein Resolutionsdefizit, gekennzeichnet. Neben Effekten der verlängerten Entzündungsreaktion auf Prozesse der Wiederherstellung oder Vernarbung von Gewebe ist auch eine Persistenz proinflammatorischer Stimuli zu erwarten, die möglicherweise zur Chronifizierung eines SCI-IDS beitragen.

Mit der Arbeit zur Kinetik der Resolution im ZNS-Kompartiment⁴ wurden etablierte Indizes, wie das Resolutionsintervall (R_i), durch neue Definitionen, wie das Resolutionsplateau (R_p), ergänzt. Durch erstmalige Anwendung des Modells der Halbwertszeit-Kinetik wird das R_i mathematisch berechenbar, und zusätzlich kann das R_p als Maß für die residuale Entzündung vorhergesagt werden. Dadurch wird eine vergleichende Messung sowohl der Kinetik als auch der Vollständigkeit der Resolution ermöglicht. Das legt eine Anwendung des Modells in der Untersuchung sowohl resolutionshemmender Bedingungen als auch resolutionsfördernder Wirkstoffe nahe.^{4,15} Das für einzelne Leukozytensubpopulationen berechnete Modell zeigte, dass deutliche zelltypspezifische Unterschiede für R_i und R_p bestehen. Dabei verhalten sich R_i und R_p nicht immer kongruent. Während neutrophile Granulozyten und T-Zellen ein nahezu identisches R_i von 1,2 bzw. 1,5 Tagen aufweisen, ist deren R_p von 0% bzw. 10% des Maximums unterschiedlich. Macrophagen/Microglia haben mit 55 Tagen das längste R_i und ein R_p von 45%. In Zusammenhang mit der limitierten Beobachtungszeit von 70 Tagen wird besonders an dieser Zellpopulation eine Beschränkung des Modells deutlich. So ist das R_p eine mathematisch geschätzte Größe, die von den Daten aus dem Beobachtungszeitraum abhängt und sich bei dessen Verlängerung oder Verkürzung ändern kann.⁴

Mit dem Ziel einer ersten näheren Charakterisierung des R_p der Macrophagen/Microglia wurden außer morphologischen Kriterien auch einzelne immunhistochemische Marker für eine deskriptive Auswertung eingesetzt. Auch zu chronischen Zeitpunkten nach der Rückenmarkverletzung waren Anteile der Macrophagen/Microglia positiv für Marker überwiegend pro-inflammatorischer Phänotypen, wie CD86 oder

CD8.⁴ Es sind weitere Untersuchungen zur Differenzierung des zellulären entzündlichen Residuums erforderlich, um die Bedeutung dieser „immunologischen Narbe“ nach Rückenmarkverletzung in Hinblick auf Neurodegeneration und als möglichen Trigger für das SCI-IDS einordnen zu können.

Ein Zusammenhang von systemischen Infektionen mit einer schlechteren neurologischen Erholung konnte erstmals in einer großen Beobachtungsstudie nach Rückenmarkverletzung gezeigt werden.¹³ Patienten mit im Verlauf aufgetretenen Infektionen verbesserten sich weniger häufig im AIS und zeigten einen geringeren motorischen Funktionsgewinn als Patienten ohne Infektionen. Nach Adjustierung für demografische Faktoren, für Läsionshöhe und Schweregrad der Verletzung sowie für mechanische Beatmung wurden Infektionen als ein unabhängiger Risikofaktor für schlechtere neurologische Erholung bestätigt. Unterschiede in der deskriptiven *baseline*-adjustierten Analyse des *ASIA motor score*, im Sinne einer besseren Erholung bei Patienten ohne Infektionen, waren an frühen Beobachtungszeitpunkten nicht darstellbar, entwickelten sich jedoch im Verlauf eines Jahres deutlich. Diese Beobachtung stützt zusätzlich die Annahme, dass die beobachteten Differenzen eher auf den Einfluss der Infektionen als auf diskrete Unterschiede in der Verletzungsschwere zurückzuführen sind.

Eine Limitation der Arbeit ist der hohe Anteil fehlender Werte zum letzten Beobachtungszeitpunkt nach einem Jahr. Die Analyse fehlender Werte hatte zwar keine signifikanten Unterschiede in den neurologischen *Baseline*-Parametern zwischen Patienten mit fehlenden Werten und ohne fehlende Werte ergeben.¹³ Dennoch wurden zur Korrektur eines *Attrition-Bias* die Regressionsmodelle nach Multipler Imputation wiederholt. Die Ergebnisse bestätigten die Analyse der vollständigen Datensätze, so dass das Risiko einer Verzerrung durch fehlende Werte als gering einzuschätzen ist. Eine weitere Beschränkung der Arbeit liegt darin, dass in der Studie keine Harnwegsinfekte dokumentiert wurden und somit die Analyse auf Pneumonien und postoperative Wundinfektionen beschränkt blieb. Dadurch wurde möglicherweise die Größe der Auswirkung von Infektionen unterschätzt, da sehr wahrscheinlich auch Patienten in der Kontrollgruppe von Harnwegsinfekten betroffen waren.

Es sind weitere Studien mit engmaschiger Dokumentation eines breiteren Spektrums von Infektionen sowie Funktionsparametern erforderlich, um die Langzeitauswirkungen einzelner querschnittspezifischer Komplikationen auf das neurologische

Rehabilitationsergebnis und die Selbständigkeit der Patienten im Alltag differenzierter beurteilen zu können. Die Früherkennung von therapierbaren Infektionen stellt somit ein Mittel zum Schutz des ohnehin begrenzten Rehabilitationspotentials dar.

Das Ziel der *SClentineI*-Studie liegt in der genauen immunologischen Definition des SCI-IDS. Das Studiendesign beinhaltet drei Vergleichsgruppen. Innerhalb der Patienten mit einem Querschnittsyndrom wird zwischen der neurologischen Funktionsstufe Th4 oder höher und Th5 oder tiefer unterschieden. Das ermöglicht eine Untersuchung von Auswirkungen einer Störung der sympathischen Innervation immunrelevanter Organe, wie Milz, Leber und Nebenniere, als eine der diskutierten ursächlichen Mechanismen für das SCI-IDS. Die beschriebenen Organe werden durch den Nervus splanchnicus major innerviert, dessen Fasern von Th5 bis Th9 den Grenzstrang verlassen. Um für die Vollständigkeit der Unterbrechung der sympathischen Bahnen zu stratifizieren, kann zusätzlich zu der Läsionshöhe die Läsionsschwere herangezogen werden. Über diese kann auch auf das Ausmaß der Entzündungsantwort im ZNS als Faktor für eine kompensatorische CARS-ähnliche Gegenreaktion rückgeschlossen werden. Durch den Einschluss von Patienten mit Wirbelkörperfraktur ohne Querschnittsyndrom als dritte Gruppe kann das SCI-IDS von einer Immundepression abgegrenzt werden, die durch das Trauma und/oder die operative Therapie an sich bedingt ist.

Die administrative Zwischenauswertung der Studie belegte die Umsetzbarkeit des Studienprotokolls. Ein Problem stellt jedoch der letzte Beobachtungszeitpunkt nach 10 Wochen dar, bei dem ein hoher Anteil fehlender Werte vorlag. Aus Gründen der Machbarkeit war von Beginn an auf einen noch späteren Beobachtungspunkt, z.B. nach einem Jahr, verzichtet worden.

Die *SClentineI*-Studie ermöglicht die Bereitstellung prognostischer Parameter zur frühzeitigen Identifikation von Patienten mit hohem Risiko, Infektionen zu erleiden und in der Folge neurologische Erholung einzubüßen.¹³ Das ist klinisch hoch relevant, denn durch konsequente Vorbeugung und Behandlung von Infektionen kann die Querschnittlähmung als Krankheitsbild im Verlauf therapeutisch beeinflusst werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, da derzeit außerhalb einzelner Klinischer Studien keine etablierten pharmakologischen oder zellbasierten Therapien mit dem Ziel der Neuroprotektion, der Verbesserung neuronaler Plastizität oder Regeneration verfügbar sind.^{2,20}

Literaturverzeichnis

- 1 Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M, Wing PC. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord*. 2014;52:110-6.
- 2 Schwab JM, Brechtel K, Mueller CA, Failli V, Kaps HP, Tuli SK, Schliesener HJ. Experimental strategies to promote spinal cord regeneration--an integrative perspective. *Prog Neurobiol*. 2006;78:91-116.
- 3 McDonald JW, Sadowsky C. Spinal-cord injury. *Lancet*. 2002;359:417-25.
- 4 Prüss H, Kopp MA, Brommer B, Gatzemeier N, Laginha I, Dirnagl U, Schwab JM. Non-resolving aspects of acute inflammation after spinal cord injury (SCI): indices and resolution plateau. *Brain Pathol*. 2011;21:652-60.
- 5 Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:723-37.
- 6 Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U: Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:775-86.
- 7 Cruse JM, Lewis RE, Jr., Bishop GR, Kliesch WF, Gaitan E, Britt R: Decreased immune reactivity and neuroendocrine alterations related to chronic stress in spinal cord injury and stroke patients. *Pathobiology* 1993; 61: 183-92.
- 8 Campagnolo DI, Keller SE, DeLisa JA, Glick TJ, Sipski ML, Schleifer SJ: Alteration of immune system function in tetraplegics. A pilot study. *Am J Phys Med Rehabil* 1994; 73:387-93.
- 9 Riegger T, Conrad S, Schliesener HJ, Kaps HP, Badke A, Baron C, Gerstein J, Dietz K, Abdizahdeh M, Schwab JM: Immune depression syndrome following human spinal cord injury (SCI): a pilot study. *Neuroscience* 2009;158:1194-99
- 10 DeVivo MJ, Krause JS, Lammertse DP. Recent trends in mortality and causes of death among persons with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 1999;80:1411-9.
- 11 Moreno B, Jukes JP, Vergara-Irigaray N, Errea O, Villoslada P, Perry VH, Newman TA. Systemic inflammation induces axon injury during brain inflammation. *Ann Neurol*. 2011;70:932-42.

- 12 Finlayson O, Kapral M, Hall R, Asllani E, Selchen D, Saposnik G; Canadian Stroke Network; Stroke Outcome Research Canada (SORCan) Working Group. Risk factors, inpatient care, and outcomes of pneumonia after ischemic stroke. *Neurology*. 2011;77:1338-45.
- 13 Failli V, Kopp MA, Gericke C, Martus P, Klingbeil S, Brommer B, Laginha I, Chen Y, DeVivo MJ, Dirnagl U, Schwab JM. Functional neurological recovery after spinal cord injury is impaired in patients with infections. *Brain*. 2012;135:3238-50.
- 14 Kopp MA, Druschel C, Meisel C, Liebscher T, Prilipp E, Watzlawick R, Cinelli P, Niedeggen A, Schaser KD, Wanner GA, Curt A, Lindemann G, Nugaeva N, Fehlings MG, Vajkoczy P, Cabraja M, Dengler J, Ertel W, Ekkernkamp A, Martus P, Volk HD, Unterwalder N, Kölsch U, Brommer B, Hellmann RC, Ossami Saidi RR, Laginha I, Prüss H, Failli V, Dirnagl U, Schwab JM. The SCIentinel study - prospective multicenter study to define the spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS) - study protocol and interim feasibility data. *BMC Neurol*. 2013;13:168.
- 15 Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:349-61.
- 16 Marino RJ. International standards for neurological classification of spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 2003;26(Suppl 1):S50-6.
- 17 Strohmeyer JC, Blume C, Meisel C, Doecke WD, Hummel M, Hoeflich C, Thiele K, Unbehauen A, Hetzer R, Volk HD. Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients. *Cytometry B Clin Cytom*. 2003;53:54-62.
- 18 Marino RJ, Ditunno JF Jr, Donovan WH, Maynard F Jr: Neurologic recovery after traumatic spinal cord injury: data from the model spinal cord injury systems. *Arch Phys Med Rehabil* 1999;80:1391-96.
- 19 Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol*. 2007;28:12-8.
- 20 Dietz V, Curt A. Translating preclinical approaches into human application. *Handb Clin Neurol*. 2012;109:399-409.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marcel Alexander Kopp, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Entzündungsreaktion und Immundepression nach akuter traumatischer Rückenmarkverletzung – Charakterisierung der post-traumatischen Immunantwort und Auswirkungen von Infektionen auf die Erholung neurologischer Funktionen* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Marcel Alexander Kopp hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Prüss H*, Kopp MA*, Brommer B, Gatzemeier N, Laginha I, Dirnagl U, Schwab JM. Non-resolving aspects of acute inflammation after spinal cord injury (SCI): indices and resolution plateau. Brain Pathol. 2011.

*contributed equally as first author to this work.

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Planung der Immunhistochemischen Färbungen. Vollständige Durchführung der histologischen Auswertung, Planung und Durchführung der statistischen Analyse, wesentliche Mitarbeit bei Entwurf und Revision des Manuskripts und bei der Erstellung der Abbildungen und Legenden.

Publikation 2: Failli V*, Kopp MA*, Gericke C*, Martus P, Klingbeil S, Brommer B, Laginha I, Chen Y, DeVivo MJ, Dirnagl U, Schwab JM. Functional neurological recovery after spinal cord injury is impaired in patients with infections. Brain. 2012.

*contributed equally as first author to this work.

Beitrag im Einzelnen: Wesentliche Mitarbeit bei der Planung und Durchführung der

statistischen Analyse, bei Entwurf und Revision des Manuskripts und bei der Erstellung der Abbildungen und Legenden.

Publikation 3: Kopp MA*, Druschel C*, Meisel C*, Liebscher T*, Prilipp E*, Watzlawick R*, Cinelli P*, Niedeggen A, Schaser KD, Wanner GA, Curt A, Lindemann G, Nugaeva N, Fehlings MG, Vajkoczy P, Cabraja M, Dengler J, Ertel W, Ekkernkamp A, Martus P, Volk HD, Unterwalder N, Kölsch U, Brommer B, Hellmann RC, Ossami Saidi RR, Laginha I, Prüss H, Failli V, Dirnagl U, Schwab JM. The SCIntinel study - prospective multicenter study to define the spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS) - study protocol and interim feasibility data. *BMC Neurol.* 2013.

* contributed equally as first author to this work.

Beitrag im Einzelnen: Wesentliche Mitarbeit bei der Protokollerstellung, der Fallzahlplanung, der Koordination der Studie; Mitarbeit bei der Datenerhebung und Probengewinnung; vollständige Planung und Durchführung der administrativen Zwischenauswertung; wesentliche Mitarbeit bei Entwurf und Revision des Manuskripts und bei der Erstellung der Abbildungen und Legenden.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Publikation 1:

Prüss H*, Kopp MA*, Brommer B, Gatzemeier N, Laginha I, Dirnagl U, Schwab JM. Non-resolving aspects of acute inflammation after spinal cord injury (SCI): indices and resolution plateau. *Brain Pathol.* 2011;21:652-60.

IF 4.35

* contributed equally as first author to this work.

Publikation 2:

Failli V*, Kopp MA*, Gericke C*, Martus P, Klingbeil S, Brommer B, Laginha I, Chen Y, DeVivo MJ, Dirnagl U, Schwab JM. Functional neurological recovery after spinal cord injury is impaired in patients with infections. *Brain.* 2012;135:3238-50.

IF 10.23

* contributed equally as first author to this work.

Publikation 3:

Kopp MA*, Druschel C*, Meisel C*, Liebscher T*, Prilipp E*, Watzlawick R*, Cinelli P*, Niedeggen A, Schaser KD, Wanner GA, Curt A, Lindemann G, Nugaeva N, Fehlings MG, Vajkoczy P, Cabraja M, Dengler J, Ertel W, Ekkernkamp A, Martus P, Volk HD, Unterwalder N, Kölsch U, Brommer B, Hellmann RC, Ossami Saidi RR, Laginha I, Prüss H, Failli V, Dirnagl U, Schwab JM. The SCIntinel study - prospective multicenter study to define the spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS) - study protocol and interim feasibility data. *BMC Neurol.* 2013;13:168. *IF 2.49*

* contributed equally as first author to this work.

Publikation 1 – Prüss et al., 2011

Aufgrund von urheberrechtlichen Bestimmungen des Verlages kann die Druckversion des Artikels in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht werden.

Der Artikel

Prüss H, Kopp MA, Brommer B, Gatzemeier N, Laginha I, Dirnagl U, Schwab JM. Non-resolving aspects of acute inflammation after spinal cord injury (SCI): indices and resolution plateau. Brain Pathol. 2011 Nov;21(6):652-60

ist unter der folgenden DOI-Verlinkung erhältlich:

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3639.2011.00488.x>

Publikation 2 – Failli et al., 2012

Aufgrund von urheberrechtlichen Bestimmungen des Verlages kann die Druckversion des Artikels in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht werden.

Der Artikel

Failli V, Kopp MA, Gericke C, Martus P, Klingbeil S, Brommer B, Laginha I, Chen Y, DeVivo MJ, Dirnagl U, Schwab JM. Functional neurological recovery after spinal cord injury is impaired in patients with infections. *Brain*. 2012;135:3238-50.

ist unter der folgenden DOI-Verlinkung erhältlich:

<http://dx.doi.org/10.1093/brain/aws267>

Publikation 3 – Kopp et al., 2013

STUDY PROTOCOL

Open Access

The SClentinel study - prospective multicenter study to define the spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS) - study protocol and interim feasibility data

Marcel A Kopp^{1,2}, Claudia Druschel^{2,3†}, Christian Meisel^{4,5,6†}, Thomas Liebscher^{7†}, Erik Prilipp^{7†}, Ralf Watzlawick^{1,2†}, Paolo Cinelli^{8†}, Andreas Niedeggen⁷, Klaus-Dieter Schaser³, Guido A Wanner⁸, Armin Curt⁹, Gertraut Lindemann⁹, Natalia Nugaeva¹⁰, Michael G Fehlings¹⁰, Peter Vajkoczy¹¹, Mario Cabraja¹¹, Julius Dengler¹¹, Wolfgang Ertel¹², Axel Ekkernkamp¹³, Peter Martus¹⁴, Hans-Dieter Volk^{4,5}, Nadine Unterwalder⁵, Uwe Kölsch⁵, Benedikt Brommer^{1,2}, Rick C Hellmann^{1,2}, Ramin R Ossami Saidy^{1,2}, Ines Laginha^{1,2}, Harald Prüss^{1,15}, Vieri Failli^{1,2}, Ulrich Dirnagl^{1,15,16} and Jan M Schwab^{1,2,7*}

Abstract

Background: Infections are the leading cause of death in the acute phase following spinal cord injury and qualify as independent risk factor for poor neurological outcome (“disease modifying factor”). The enhanced susceptibility for infections is not stringently explained by the increased risk of aspiration in tetraplegic patients, neurogenic bladder dysfunction, or by high-dose methylprednisolone treatment. Experimental and clinical pilot data suggest that spinal cord injury disrupts the balanced interplay between the central nervous system and the immune system. The primary hypothesis is that the Spinal Cord Injury-induced Immune Depression Syndrome (SCI-IDS) is ‘neurogenic’ including deactivation of adaptive and innate immunity with decreased HLA-DR expression on monocytes as a key surrogate parameter. Secondary hypotheses are that the Immune Depression Syndrome is i) injury level- and ii) severity-dependent, iii) triggers transient lymphopenia, and iv) causes qualitative functional leukocyte deficits, which may endure the post-acute phase after spinal cord injury.

Methods/Design: SClentinel is a prospective, international, multicenter study aiming to recruit about 118 patients with acute spinal cord injury or control patients with acute vertebral fracture without neurological deficits scheduled for spinal surgery. The assessment points are: i) <31 hours, ii) 31–55 hours, iii) 7 days, iv) 14 days, and v) 10 weeks post-trauma. Assessment includes infections, concomitant injury, medication and neurological classification using American Spinal Injury Association impairment scale (AIS) and neurological level. Laboratory analyses comprise haematological profiling, immunophenotyping, including HLA-DR expression on monocytes, cytokines and gene expression of immune modulators. We provide an administrative interim analysis of the recruitment schedule of the trial.

(Continued on next page)

* Correspondence: jan.schwab@charite.de

†Equal contributors

¹Department of Neurology and Experimental Neurology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

²Clinical and Experimental Spinal Cord Injury Research (Neuroparaplegiology), Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

(Continued from previous page)

Discussion: The objectives are to characterize the dysfunction of the innate and adaptive immune system after spinal cord injury and to explore its proposed 'neurogenic' origin by analyzing its correlation with lesion height and severity. The trial protocol considers difficulties of enrolment in an acute setting, and loss to follow up. The administrative interim analysis confirmed the feasibility of the protocol. Better understanding of the SCI-IDS is crucial to reduce co-morbidities and thereby to attenuate the impact of disease modifying factors to protect neurological "outcome at risk". This putatively results in improved spinal cord injury medical care.

Trial registration: DRKS-ID: DRKS00000122 (German Clinical Trials Registry)

Keywords: Spinal cord injury, Immune paralysis, Lesion height dependency, High-dose methylprednisolone treatment, Infections

Background

The effective treatment of worldwide 2.5 million paralyzed, spinal cord injured patients represents an unmet medical need to date [1]. In addition, the numbers of non-traumatic cases (e.g. tumor, cervical spondylotic myelopathy) of spinal cord injury (SCI) are increasing. Infections, i.e. pneumonia and urinary tract infections are a leading cause of morbidity and mortality in patients with acute SCI [2,3]. However, attributing infections to motor-paralysis related dysfunction alone does not sufficiently explain the increased susceptibility to develop infections after SCI. Among others, dysphagia occurs also in healthy patients over night without causing pneumonia. Thus, higher rates of dysphagia in SCI patients with cervical lesions do not solely explain increased rates of pneumonia.

It has been elucidated recently that SCI might increase predisposition to infections by Central Nervous System (CNS)-specific mechanisms: CNS-injury induces a disturbance of the normally well-balanced interaction between the immune system and the CNS resulting in a Spinal Cord Injury-induced Immune Depression Syndrome (SCI-IDS) [4-9]. Presence of SCI-IDS has been verified independently after experimental [10] and human SCI [11]. In brief, SCI 'neurogenically' ablates the immune system and enhances susceptibility to develop infections, which in turn might cause a generalized wound healing impairment – also affecting wound-healing/repair of the spinal cord lesion itself. Of note, besides increasing the mortality, infections represent an independent risk factor for impaired functional neurological recovery e.g. by i) reducing the conversion rate from being 'completely' to 'incompletely' paralyzed and ii) impairing gain of American Spinal Injury Association (ASIA) motor scores [12].

Based on preclinical and first clinical observations within a pilot trial [5,6] we aim to develop prognostic surrogate parameters in order to predict and selectively identify patients 'at risk' to develop infections. Here, we propose to establish parameters after human SCI, which have been tested in other clinical paradigms of elevated infectious risk such as status post cardiopulmonary bypass [13] and after

ischemic CNS injury [14,15]. Therefore, we apply methods established in humans, such as human leukocyte antigen (HLA)-DR expression on monocytes [14] and Concanavalin A (ConA)-induced cytokine expression in whole blood samples, as surrogate markers of SCI-IDS. HLA-DR expression on monocytes serves as primary outcome measure. Moreover, a peripheral blood leukocyte mRNA expression profile encoding for immune modulatory proteins will be investigated to sense and therefore predict an evolving immune suppression as early as possible. Furthermore, we will measure the presence of individual predisposition for infections by assessing polymorphisms in coding areas of MHC-proteins, toll-like pattern-recognition receptors and selected cytokines [16].

The prevention of infections facilitated by the 'neurogenic' immune suppression syndrome (with its pronounced penetrance referred to as 'immune paralysis') aims to (i) decrease mortality, (ii) reduce expensive hospitalization time and, (iii) improve the functional outcome, since SCI patients suffering infections are prone to develop inferior neurological recovery [12]. Molecular treatment strategies aiming to foster axonal plasticity and repair might be complemented by approaches that intend to protect the intrinsic neurological recovery potential. Given a realistic therapeutic timeframe of opportunity after SCI, the early identification of SCI-patients 'at risk' would offer a 'preventive' option to treat infections earlier and thereby avoid their detrimental consequences. This protective strategy might save neurological function 'at risk' and thereby improve quality of life. In addition, it would be possible to unmask putative confounding factors that influence neurological outcome measures of relevance for interventional or rehabilitative trials [12].

A solid body of evidence demonstrates that SCI is associated with an early onset of immune suppression (SCI-IDS). Identification of SCI patients as immune compromised is a clinically relevant finding, yet widely underappreciated and warranting further analysis. In order to decipher the underlying mechanisms of SCI-IDS we are following-up on experimental results [5,7,10,17], clinical pilot trials

[6,8], and cohort studies [9,18,19] with the international SCIentinel trial. We outline the study protocol and design, define the main outcome parameters, and provide the results of an administrative interim analysis.

Methods/Design

Study design, study coordination, and participating centers

The “SCIentinel” trial is designed as a prospective multicenter study for the detailed evaluation of the SCI-IDS (Figure 1). The overall coordination is performed by the Department of Experimental Neurology, Clinical and Experimental Spinal Cord Injury Research (Neuroparaplegiology) at the Charité University Hospital, Campus Mitte, Berlin, Germany.

The study comprises seven recruiting trial centers with a specialization in SCI treatment: Treatment Center for Spinal Cord Injuries, Trauma Hospital Berlin, Germany; Center for Musculoskeletal Surgery (Campus Virchow Clinic); Department of Trauma and Reconstructive Surgery (Campus Benjamin Franklin); Department of Neurosurgery (Campus Virchow Clinic and Campus Benjamin Franklin), Charité University Hospital Berlin, Germany; Division of Trauma Surgery, University Hospital Zurich; Spinal Cord Injury Center, University Hospital Balgrist, Zurich, Switzerland, and the Department of Neurosurgery, Toronto Western Hospital, Toronto, Canada. The study investigators are physicians specialized and experienced in the treatment and rehabilitation of patients with SCI.

Duration

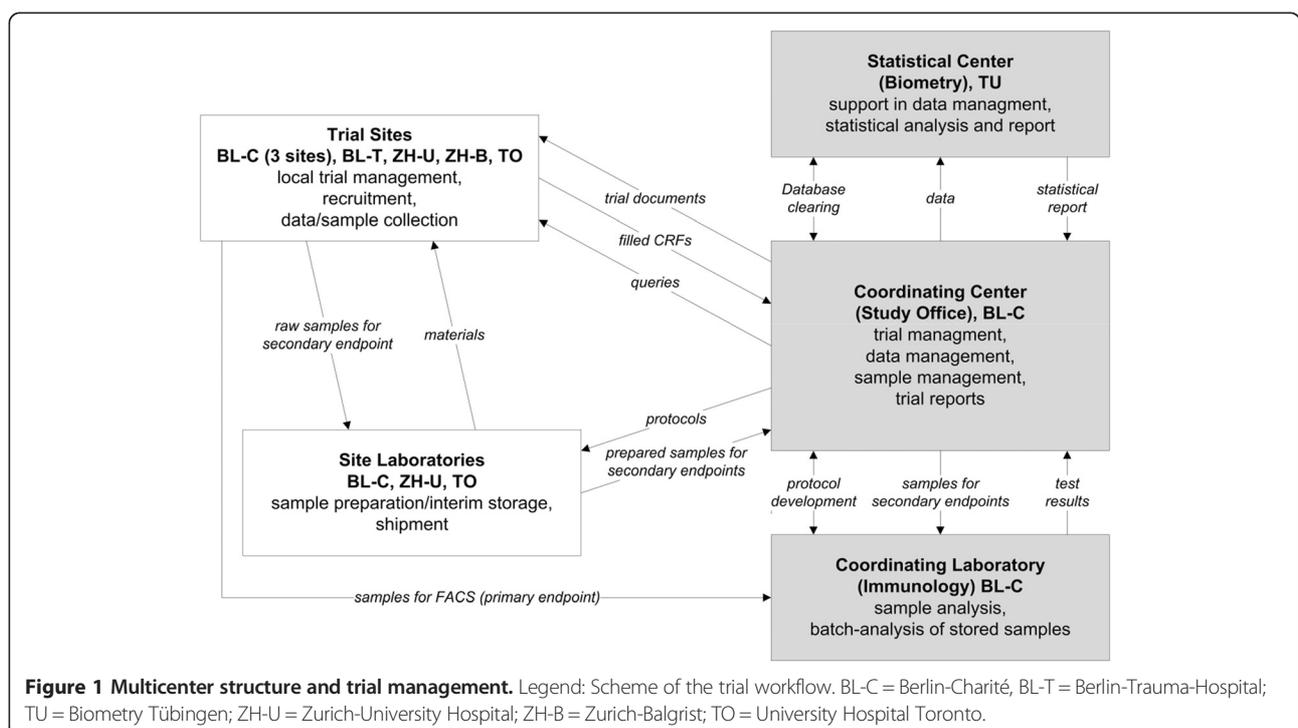
A recruitment period of 30 months is scheduled. Each patient will be followed-up to three months post-trauma. After completion of recruitment and follow-up, a further six months period is planned for the database clearing, the statistical evaluation and the preparation of the trial report. Enrolment has started in August 2011. Expected study completion date is the first quartile of 2014. Publication of the trial report is scheduled for the end of the year 2014.

Ethics

The protocol received approval by the local Ethics Committees: Ethical Committee of the Charite – Universitätsmedizin Berlin (EA1/001/09), University Health Network Research Ethics Board, Toronto (REB10-0384-AE), Cantonal Ethics Commission, Zurich (KEK-ZH-Nr. 2011-0059). Participants will be informed about the trial, orally and in written form, using patient’s information sheets and written informed consent will be obtained. This study complies with the Helsinki Declaration, the principles of Good Clinical Practice (GCP) and the Personal Data Protection Act. The study will also be carried out in keeping with local legal and regulatory requirements. The study has been registered in the German Clinical Trials Registry (DRKS-ID: DRKS00000122).

Participants

A number of 118 patients is planned to be allocated to the study for examination of the primary endpoint. In order to

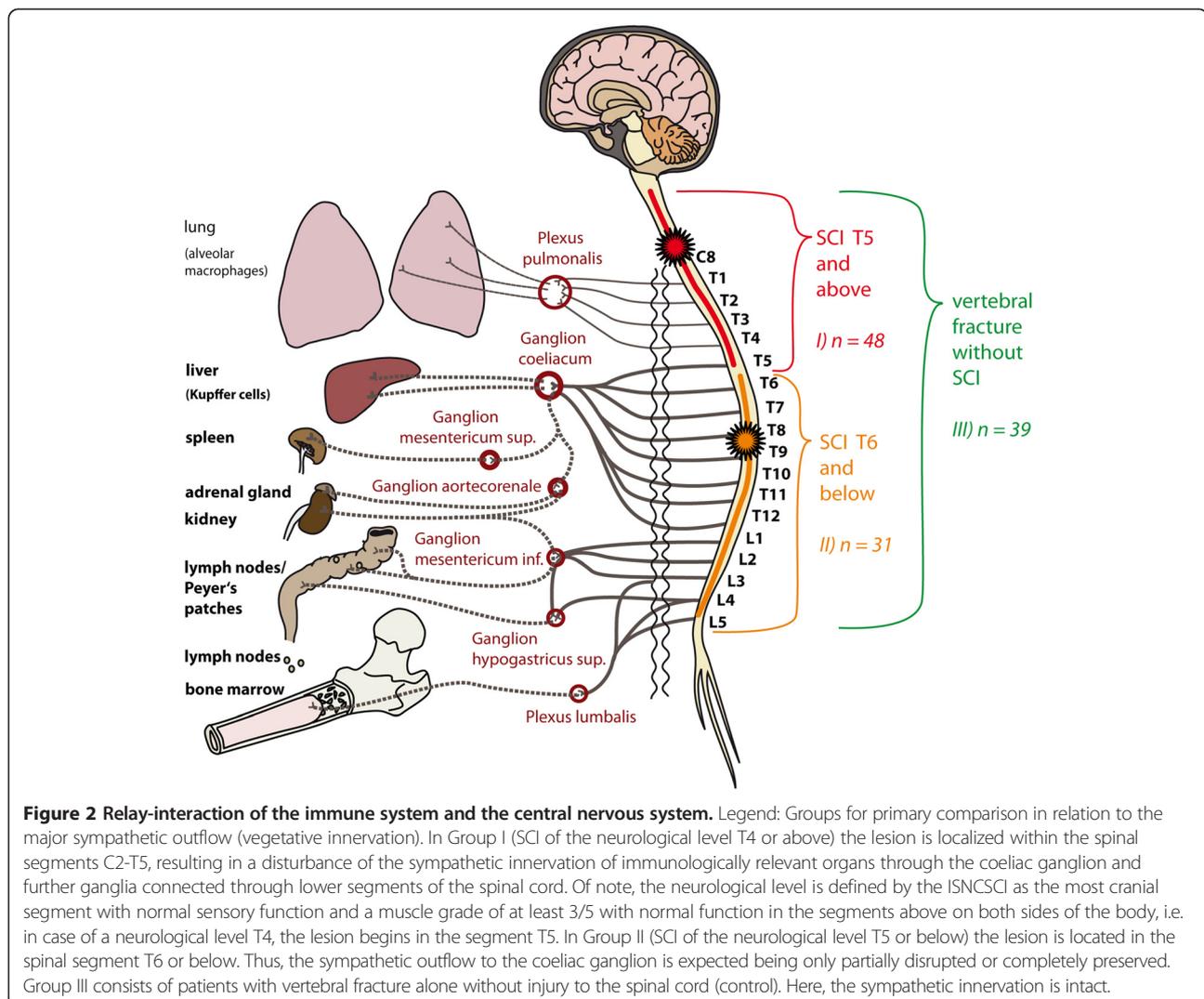


allow for investigation of the role of disturbed innervation of the major splanchnic nerve (T5-T9) as linked to alterations of the immune system function, we categorize SCI patients into lesions with the neurological level T4 or above versus lesions neurological level T5 or below. Therefore, the patients will be assigned to 3 groups: i) 48 SCI-patients with a neurological level T4 or above; ii) 31 patients with a neurological level T5 or below; iii) 39 patients with an acute vertebral fracture, but without SCI as control group (Figure 2).

The study will not interfere with methylprednisolone treatment per site regimens and patients will be also enrolled, but are excluded from the analysis of the primary endpoint. Based on experiences from the clinical practice in the recruiting trial centers the rate of cases treated with methylprednisolone is estimated to be 5-10%. Thus, up to 12 patients will additionally be included for explorative examination of methylprednisolone-related alterations of the immune system after SCI (Figure 2).

Sample size calculation

The primary endpoint is a difference in HLA-DR expression on monocytes exactly quantified by analysing antibody-binding molecules/cell within the first week (day 3–4) post-trauma. Numbers of patients to be enrolled were calculated on the basis of a pilot study ($n = 26$) [6]. The sample size calculation was performed for an effect size of 0.18. The type one error was set to 0.05 (two-sided); type two error was set to 0.2. The number of patients eligible for evaluation (for testing the hypothesis by the one way anova) is 56 in total (software nquery, version 7.0). Due to an expected rate of drop-outs/missing data of 50% and non-parametric testing, where applicable, the number of patients to be recruited increases to 118 in total. The expected rate of drop-outs/missing data relates to the structural conditions of acute SCI care in terms of i) delayed transfer to specialized SCI trial centers after primary care in external non-specialized centers and ii) loss to follow up due to discharge from inpatient rehabilitation,



particularly in the control group or in cases of mild incomplete SCI. Consequently, to allow for a completion of the study within a feasible time period consideration of missing values is unavoidable.

The sample size calculation was performed taking the asymmetric natural distribution of the neurological lesion level into account [20]. Injury to the cervical and high thoracic spinal cord has the highest incidence and represents the largest group of SCI patients. Thus, the relation of the 3 groups to each other was determined as follows based on the pilot trial data i) 41% (n = 48); ii) 26% (n = 31); iii) 33% (n = 39).

Enrolment and eligibility criteria

With the seven study centers treating 20 to 60 acute SCI patients admitted to the emergency ward of each center per year we estimate to screen about 200 SCI patients per year and about 40 of them are expected to meet eligibility criteria (Table 1).

Investigators will evaluate the patients after admission to the emergency ward for eligibility. Before final inclusion into the study the investigator will conduct an interview with the patients to verify the inclusion- and exclusion-criteria and obtain written informed consent.

Table 1 Eligibility criteria

Inclusion criteria	
(1)	Patients with acute isolated spinal cord injury (AIS A-D) planned for surgical stabilization and decompression, lesion may include more than 1 segment
(2)	Patients with acute isolated spinal fracture planned for surgical stabilization, lesion may include more than 1 segment
(3)	≥ 2 spinal cord or vertebral lesions definable one from another
(4)	Legal age of the patient
(5)	Documented informed consent of the patient
Exclusion criteria	
(1)	Non-traumatic spinal cord injury
(2)	2 or more spinal cord or vertebral lesions definable one from another
(3)	Severe polytrauma (<i>definition: patients with severe injuries of life-sustaining organ systems, which per se and in the acute phase are life-threatening (e.g., severe pelvic trauma, severe body cavity injuries)</i>)
(4)	Concomitant traumatic brain injury (TBI) (<i>definition: i) Patients with persisting neurological deficit in consequence of the TBI, ii) patient with severe TBI (Glasgow Coma Scale ≤ 8), and iii) patients with intracranial pressure monitoring sensors.</i>)
(5)	Neoplasia and/or antineoplastic therapy
(6)	Rheumatic disease, collagenosis, vasculitis or other autoimmune disease
(7)	Preexisting chronic infectious disease (before the injury)
(8)	Preexisting systemic steroid treatment
(9)	Severe alcohol or drug addiction
(10)	Pregnancy, lactation

Assessment time points

Measurements and observations are scheduled in all groups in the same manner (Figure 3). An inclusion assessment will be performed at the study entry and is documented in a case report form (CRF). The baseline CRF includes the neurological classification, assessment of injury date and time, medical history, concomitant injury, acute SCI therapy concerning high-dose methylprednisolone treatment as well as surgical intervention.

At the 5 study visits, equal blood samples and clinical data will be obtained. The clinical data comprise infections, medication, surgery, and blood transfusions. The first assessment should be completed as early as feasible after the injury, preferably before surgery, otherwise at least within 31 hours post-injury. The second assessment point refers to a time window of 31–55 hours post-injury. To ensure a sufficient time interval to the first assessment the second one should be performed on the following day at the earliest. This allows a better intra-individual analysis. The visits 3, 4 and 5 refer to day 7, 14 and to 10 weeks after injury, respectively. Blood withdrawals, except at time point 1 should be performed between 7:00 and 11:00 am. This setting determines the influence of the circadian rhythm to a minimum.

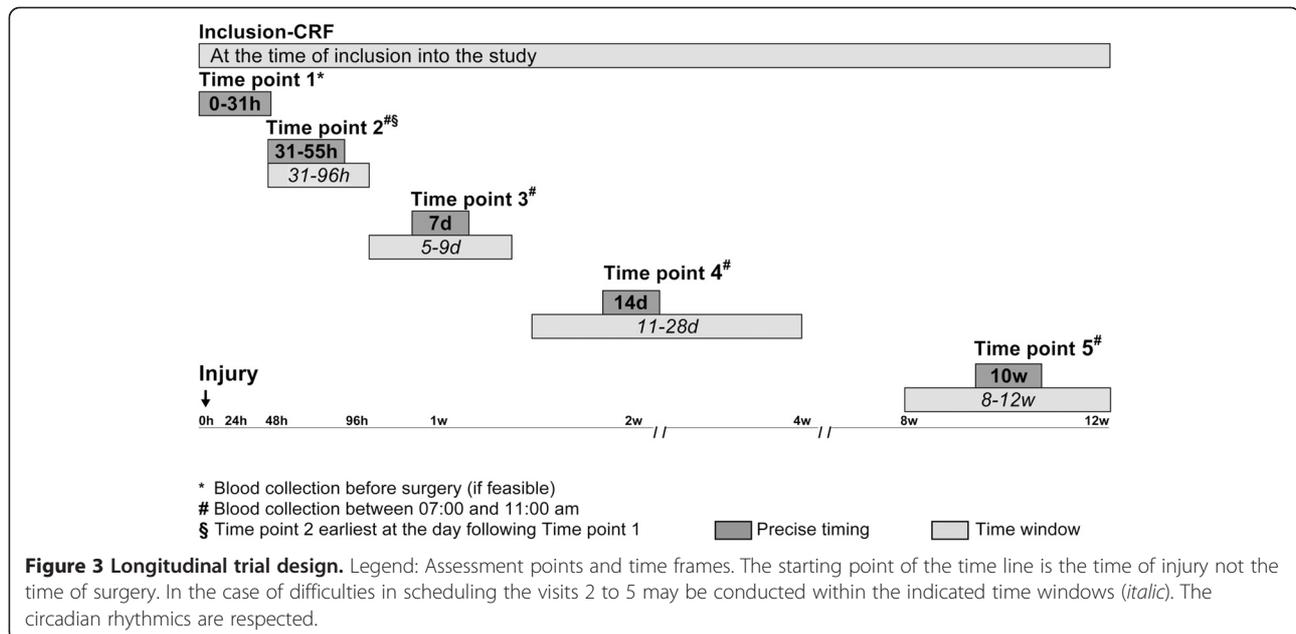
In the case, if it is unavoidable that a patient may be assigned to the study later as 31 hours (delayed recruitment) e.g., due to later admission or transfer to a study center (see also sample size calculation), study inclusion is tolerated at any later time point. In individual cases of delayed recruitment or patient's absence, documentation of visits 2–5 may be scheduled in extended time windows (Figure 3).

Definition of infections

The most prevalent infections after SCI, in detail chest infections and urinary tract infections, are diagnosed and documented in the study according to established definitions of disease to ensure a biometric comparability [15,21,22] (Table 2). Additionally, a distinction is made between non-symptomatic and symptomatic urinary tract infections, i.e. the latter are classified with regard to evidence of fever, increased spasticity, bladder spasm, supra-pubic or flank pain, autonomic hyperreflexia, malaise, or lethargy. All other infections are documented according to the usual diagnostic criteria of the participating centers.

Neurological classification

The neurological evaluation is performed according to the International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury (ISNCSCI), a revision of ASIA classification [23,24]. Within the ISNCSCI-regime the ASIA impairment scale (AIS) as a measure for completeness of the injury, and the single neurological level of the lesion are assessed.



Blood sample handling

Peripheral blood is collected under sterile conditions from each participant at each visit. All samples are labeled with a six-digit pseudonym and any personal information of the participants is removed. Overall, one 2 ml and one 6 ml Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) BD Vacutainer®, two 3 ml Heparin BD Vacutainer® and one 8.5 ml Serum BD Vacutainer® are needed. Furthermore one 5 ml Cyto-Chex® blood collection tube (BCT) and two 2.5 ml PAXgene™ RNA tubes are collected (Figure 4). Blood samples for flow cytometric analysis are analyzed as soon as possible, preferably within 24 hours latest within 48 hours. Preservation of intracellular and extracellular surface markers is ensured by using Cyto-Chex® BCT [25,26].

Supernatants from whole blood stimulation and further blood samples for secondary outcome measures are stored

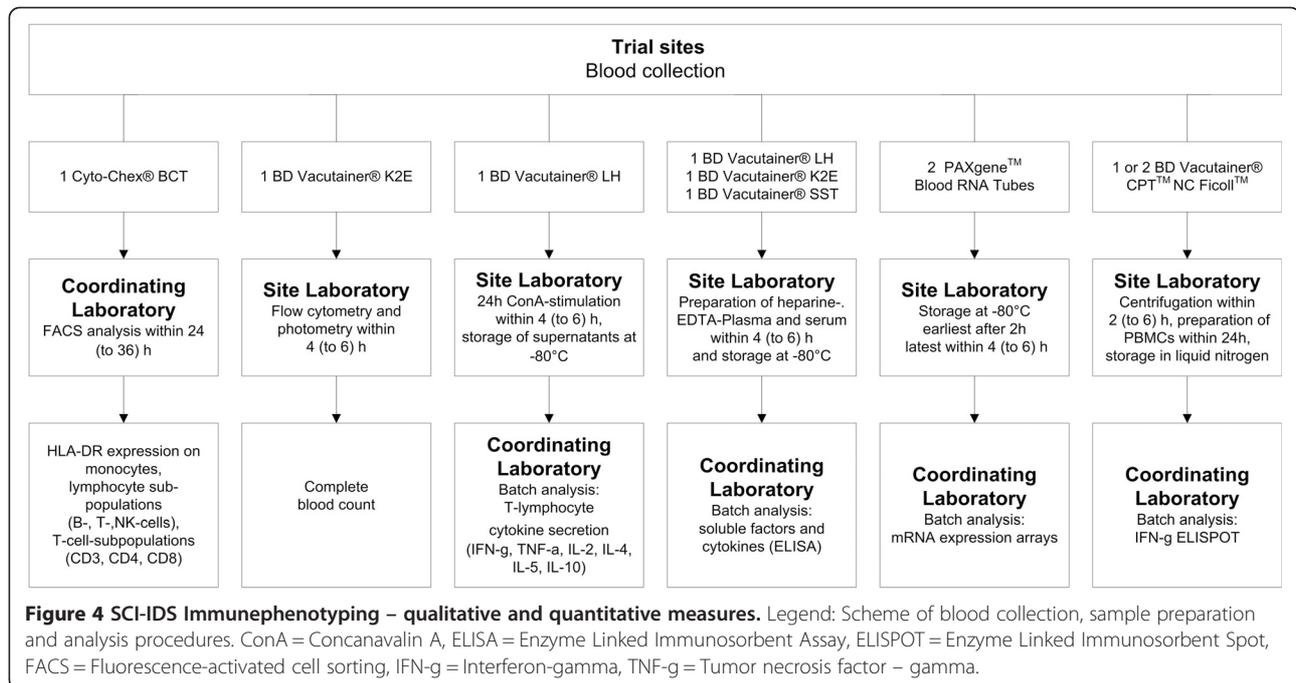
at -80°C for subsequent batch analysis (Figure 4). In the trial centers at Berlin and Zurich, one additional 8 ml BD Vacutainer® CPT™/Ficoll™ tube is collected for immediate preparation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) for storage in liquid nitrogen. The handling of samples follows identical standard operating procedures and checklists at all trial centers.

Immune profiling of SCI-IDS

The following investigations are performed to determine the immune status: i) immunophenotyping with lymphocyte subpopulations (B, T, NK cells), T cell subpopulation (CD3, CD4, CD8) and monocytic HLA-DR expression; ii) ex vivo T lymphocyte cytokine secretion such as ConA-induced IFN-g, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 secretion and staphylococcal enterotoxin B (SEB)-induced IL-17 production; iii) gene expression analysis for immune

Table 2 Diagnostic criteria for chest infection and urinary tract infection

Type of infection	Criteria
Chest infection, if ≥ 3 criteria apply	Temperature < 36.0°C or ≥ 37.5°C Putrid secretion Pathological respiration (rales, bronchial breathing, tachypnea > 22/min) Opacities in chest x ray (required for the diagnosis of pneumonia) Detection of pathogenic germs in sputum pO ₂ < 70 mmHg/O ₂ saturation < 93%
Urinary tract infection, if ≥ 1 criteria apply	Bacteriuria with bacterial count > 10 ⁵ cells/ml Leukocyturia ≥ 100 WBC/mm ³ , respectively 100.000 WBC/ml
Symptomatic urinary tract infection, if ≥ 1 criteria apply	≥ 1 criteria for urinary tract infection ≥ 1 of the following criteria: fever, suprapubic or flank discomfort, bladder spasm, increased spasticity, worsening dysreflexia



activation/deactivation related genes (mRNA expression); iv) circulating immune modulators: such as IL-6, epinephrine; v) indirect infection parameters: procalcitonin, C-reactive protein (CRP), LBP (lipopolysaccharide-binding protein).

Immunophenotyping using fluorescence-activated cell sorting (FACS) including quantitative measurement of monocytic HLA-DR expression as the primary outcome measure will be conducted according to standardized operation procedures established at the Institute of Medical Immunology (Charité - Universitätsmedizin Berlin, Germany) for clinical diagnostics of an immune suppression state [14]. HLA-DR belongs to the MHC class II molecules that are responsible for antigen presentation to CD4+ T-cells. Monocytic HLA-DR expression reflects the state of the adoptive immune competence as it is positively regulated by Th1 cytokines and negatively regulated by anti-inflammatory cytokines, stress hormones and some exogenous agents. Furthermore, monocytic HLA-DR expression is associated with the ability to produce pro-inflammatory mediators upon challenge by bacterial products such as lipopolysaccharides (LPS). Reduced monocytic HLA-DR expression has been established to correlate with an increased risk for infections in critically ill patients previously [14,27,28].

Quantitative measures of HLA-DR expression

In contrast to the pilot study that measured HLA-DR expression on different cell types [6], the SCIentinel study measures quantitatively the amount of HLA-DR molecules per monocyte (in estimated numbers per cell).

The reliability of the method has been previously approved in an inter-laboratory study [14].

The principle of the test is as follows. A mixture of Phycoerythrin (PE) beads conjugated with defined amounts of PE molecules is measured at the same instrument settings as the cells incubated with a mix consisting of anti-human HLA-DR-PE, anti-human CD14-PerCP-Cy5.5, and an inhibitor of HLA-DR turnover (BD Quantibrite™ HLA-DR/Monocyte reagent, BD Biosciences). The PE beads facilitate conversion of the FL2 axis into PE molecules bound per cell. The known ratio of PE to anti-HLA-DR antibody is used to convert the PE molecules per cell into antibodies per cell (AB/c). The anti-HLA-DR antibody, clone L243, reacts with a non-polymorphic HLA-DR epitope and is conjugated with PE molecules in a ratio of 1:1. The anti-CD14 antibody, clone MoP9, is conjugated with PerCP-Cy5.5. CD14 is expressed by the majority of monocytes. In addition, since the cyan dye component of PerCP-Cy5.5 binds to CD64, the anti-CD14 PerCP-Cy5.5 antibody detects all monocytes (CD14 brightly positive and weakly positive). The immunodiagnostic thresholds delineating a graded SCI-IDS penetrance are defined as indicated in Table 3 and were developed based on previous clinical trials after CNS injury [27].

Data management

Data are collected on a paper CRF (pCRF) basis. All patient's data are managed with a six-digit pseudonym. At the coordinating center personnel familiar with the trial protocol check the filled pCRFs for completeness and consistency. Implausible or missing data may be corrected

Table 3 Thresholds for the interpretation of the analysis of HLA-DR expression on monocytes

Antibodies/cell	Interpretation
> 15 000	Normal diagnostic findings
10 000 – 15 000	Immunodepression
5 000–10 000	Borderline immunoparalysis
< 5 000	Immunoparalysis

or added after consulting the investigator at the trial site through the study management (Queries). The corrected documents will be archived together with the completed CRFs. Data are entered and stored electronically in a database (Access) and are independently double-checked for correctness. The database has secured and restricted access centralized at IT-Center of Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany. Data backups are performed on a daily basis.

Interim evaluation of recruitment status

An administrative interim evaluation for control of the estimated recruitment schedule after enrolment and follow up of approximately 50% of the calculated sample size has been performed. Patients recruited until April 2013 and followed up to July 2013 were included. The groups for comparison were analyzed for their concordance with the estimated sample size (Table 4). Furthermore the completeness of data for the main laboratory outcome parameters (flow cytometry) at each time point was assessed within the ‘per protocol’ population (Table 5).

Statistical analysis

Data analysis of the primary endpoint consists of a comparison, between the 3 groups at the early and subsequent follow-up assessment points using one-way ANOVA or nonparametric tests, if appropriate. The analysis will be performed using the full dataset comprising all patients included according to the criteria as defined in the study protocol. In addition, in patients with complete intra-individual datasets also changes over time within the groups will be assessed with descriptive methods. Furthermore, in the case of a relevant amount of missing values, multiple imputation will be taken into consideration for verification of the analysis of the original data. Data

obtained from patients treated with methylprednisolone will be primarily analyzed in a casuistic manner.

The statistical analysis of the administrative interim evaluation has been performed using SPSS for Macintosh, Version 19.0.

Discussion

The SCIentinel trial aims to define SCI-IDS characteristics. We investigate the hypothesis that SCI-IDS is not restricted to quantitative immune suppression (cell depletion) [5-8], but also affects qualitative immune function of ‘spared’ immune cells. Qualitative dysfunction of immune cells translates into suppressed innate and adaptive immune cell function that finally leads to impaired host defense [29]. Qualitative effects may extend into chronic SCI [29] and therefore the identification of patients prone to develop infections is also relevant during long-term follow up. Moreover, according to the proposed ‘neurogenic’ origin of the SCI-IDS we suggest rostral and complete spinal cord lesions to be associated with a more severe immune depression syndrome compared to more caudal or incomplete lesions. Furthermore we intend to investigate a putative sustained extension into chronic disease phases after SCI. Together, this is embedded the longitudinal prospective trial design and in a power calculation that takes differences between rostral and caudal neurological levels into account. In addition, the impact of facultative co-treatment with high dose methylprednisolone, which may further aggravate SCI-IDS is accessible for descriptive analysis.

Spine trauma

In order to differentiate the SCI-related ‘neurogenic’ effect on the immune system from the ‘non-neurogenic’ effect of the surgical intervention/trauma itself (activation of the stress axis/post-aggression syndrome) the study protocol incorporates a control group of patients with isolated vertebral fracture without neurological deficit. Of note, this refinement of the control group definition by the SCIentinel trial overcomes a weakness of the pilot study where patients after smaller surgical interventions such as arthroscopy served as control group [6], which only insufficiently mimics the post-aggression syndrome caused by surgical stabilization of the spine.

Table 4 Administrative interim analysis of the recruitment status for patients without high-dose methylprednisolone treatment

Groups	Overall n (%)	SCI T4 and above n (%)	SCI T5 and below n (%)	Control group n (%)	Drop out n
Estimated sample size	118 (100)	48 (100)	31 (100)	39 (100)	n.a.
Enrolled patients	60 (51)	28 (58)	11 (35)	17 (44)	4

Legend: Sixty patients without high-dose methylprednisolone treatment were included into the SCIentinel trial from August 2011 to April 2013. The number of patients recruited into the group of SCI patients of the neurological level T5 or below was slightly smaller than expected. This does not match the natural distribution of the lesion level and seems to be random. In total, four patients (7%) dropped out of the interim analysis due to occurrence of exclusion criteria.

Table 5 Administrative interim analysis of the completeness of laboratory data (flow cytometry) for each visit relative to the number of enrolled patients feasible for 'per protocol' analysis

Groups		Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4	Visit 5
Overall n = 56	Complete data n	32	38	44	44	25
	(% of 'per protocol' population)	(57)	(68)	(79)	(79)	(45)
SCI T4 and above n = 28	Complete data n	17	20	22	22	16
	(% of 'per protocol' population)	(61)	(71)	(79)	(79)	(57)
SCI T5 and below n = 11	Complete data n	6	6	8	10	5
	(% of 'per protocol' population)	(55)	(55)	(73)	(91)	(45)
Control group n = 17	Complete data n	9	12	14	12	4
	(% of 'per protocol' population)	(53)	(71)	(82)	(71)	(24)

Legend: The completeness of the main laboratory data was calculated for the three groups relative to the number of enrolled patients feasible for 'per protocol' analysis. The sample size calculation takes a 50% rate of drop out or missing values into account. Considering the drop out rate < 10% at the current stage of the trial, a 60% rate of data completeness is acceptable. Critical rates of overall completeness are observed at visit 1 and visit 5 and relate mainly to the control group and to patients with neurological level T5 or below.

In order to evaluate the impact of the lesion height we assess differences between rostral and caudal spinal cord lesions. Consequently, SCI patients were divided into two groups with/without expected impairment of the major sympathetic outflow and compared with the controls applying a three-group strategy for analysis (Figure 1). To assess the effect of lesion severity, we compare complete (AIS A) with incomplete lesions (AIS B-D) in a descriptive sub-group analysis.

Eligibility criteria

We defined the eligibility criteria (Table 1) in order to minimize inclusion bias and to obtain 'representative' data. The definitions stipulated in the SCIentinel protocol are consistent with previously published studies [6,8,18,30]. It was necessary to exclude patients with severe, life threatening polytrauma or severe TBI in order to limit variability caused by concomitant injury. For detection of immune system functionality, it is furthermore essential to exclude all circumstances combined with pre-existing alterations in the immunological profile such as chronic autoimmune diseases and pre-existing systemic treatment with corticosteroids.

The administrative interim analysis of the SCIentinel trial has confirmed the feasibility of the eligibility criteria. From August 2011 to April 2013 n = 64 patients have been enrolled for the study which represent 37 patients per year. Thus, the enrolment status is within the expected range. Four of the 64 patients (6%) were treated with high-dose methylprednisolone. Therefore, those patients are to be excluded from the 'per protocol' analysis. However, casuistic studies on immunosuppressive effects of methylprednisolone treatment in the context of the SCI-IDS are enabled. The remaining 60 patients represent 51% of the estimated sample size (Table 4).

Observation period

Observational time points (Figure 2) range from acute to sub-acute stages after SCI comparable to the pilot study [6]. Here, the time schedule corresponded to the hallmarks of parenchymal inflammation following SCI. The implementation of sub-acute assessments is in line with previous trials that demonstrated mid- and long-term alterations of the immune system after SCI [8,18,19].

The setting of defined time corridors instead of time points provides a more complete tracking of the participants. In order to prevent a high amount of missing datasets due to loss to follow-up, the protocol allows an inclusion at each documentation time point.

The administrative interim analysis of data completeness for the main laboratory parameters indicates - depending on the group or visit - a completeness of data between 24% and 91% with critical rates of completeness at visit 1 and visit 5, particularly in the control group (Table 5). As a consequence, the recruiting centers have been requested to enroll the patients as soon as possible after injury. Additionally, we intend to address the challenge of loss to follow up by travelling to external rehabilitation centers or by phone calls to remind patients of their study visit at the outpatient clinic. The rate of complete longitudinal datasets ranges between 18% and 36% but is expected to increase during the further trial course since trial routines are better established. Noteworthy, the sample size calculation takes 50% of missing values into account and was performed for one-way ANOVA. Repeated measure analysis requires lower sample sizes. Therefore, it seems feasible that a relevant amount of complete longitudinal datasets can be achieved also for the description of the intra-individual course of the SCI-IDS. Pursuing this study concept, serial investigations on short- and mid-term changes of the immunological function are provided.

Clinical observations

For the clinical research, it is imperative to use reliable reproducible clinical tests. The ISNCSCI standards revised over the years to provide better, more specific definitions [23,24]. We incorporated the AIS and the single neurological level into the trial protocol for neurological baseline characterization of SCI patients.

The determination of infections is of crucial importance in this study. Prevailing infectious complications of SCI patients are pulmonary and urinary tract infections [4]. Cameron and colleagues recently provided a review consisting of 12 articles of urinary tract infection (UTI) screening for SCI [31]. Noteworthy, there is no universal definition of UTI used in the literature allowing substantial heterogeneity. The American Paraplegia Society (APS) recommends to base the diagnosis of UTI solely on bacteriuria, with a threshold of 10^2 colony-forming units (cfu)/mL for SCI patients [32]. However, up to 75% of samples taken from asymptomatic SCI male patients under intermittent catheterization contain $\geq 10^2$ cfu/mL [32]. Thus, a threshold of 10^2 cfu/mL is associated with low specificity, leading to an excess of treatment, with the risk of the emergence of resistant bacteria, adverse events, and unnecessary expense. In consequence, we defined according to the National group on urologic rehabilitation of paraplegics urinary tract infection as bacteriuria greater than 10^5 cells/ml or WBC count of more than $100/\text{mm}^3$ [21].

Regarding the development of chest infection criteria defined by Mann et al. were incorporated [22]. For the diagnosis of pneumonia the finding of infiltrates or opacity in chest X-ray will be required consistent with Haeusler et al. who used similar criteria in the analysis of cellular immunodepression preceding infectious complications after acute ischemic stroke [15].

In summary, the clinical assessments and definitions used in the SCIentinel study allow for collection of reliable and reproducible data.

Primary outcome measure

For meeting the purpose of a more comprehensive characterization of the SCI-IDS and establishing prognostic surrogate parameters, it is essential to implement specific parameters, readily validated in clinical immunology, robust and reproducible [14]. Quantification of immune cell populations in the blood using FACS is a clinically established and precise method that qualifies as primary outcome measure. Our primary measure is the determination of HLA-DR-molecules per monocyte. Alterations in HLA-DR expression on monocytes occur early enough to identify patients at high risk for relevant immune depression and consecutive development of infections. Significantly decreased monocytic HLA-DR levels have been observed as early as day one after acute cerebral ischemia in patients who developed infectious

complications in comparison to patients with an uncomplicated clinical course [27]. Furthermore, the method is already established and available in centralized immunological laboratories. It has sufficient diagnostic specificity as a basis for clinical decision-making and therefore is clinically highly relevant. Moreover, we implemented a large setting of secondary endpoints for the development of very early predictive parameters, for example on the level of mRNA expression.

Possible consequences

The objective of this study is the longitudinal characterization of immunological markers of the innate and acquired immune system after traumatic SCI. Furthermore, the aim is to detect diagnostic surrogate parameters for the clinical application after SCI. The characterization of a causative relationship between the lesion level and/or SCI severity and the type and/or extent of the immune response after SCI - including a critical characterization of the methylprednisolone effect - is essential for the implementation of therapeutic studies. Understanding and recognition of the immunological dysfunction and the altered susceptibility to infections may then assist in consecutive decision-making. This is relevant for the stratification of patients who are at high or low risk for infectious complications [33]. In addition, these findings may also hold the key for early therapeutic immunomodulation aiming to improve overall survival by anticipation and prevention of life-threatening infectious complications.

Abbreviations

ASIA: American Spinal Injury Association; AIS: ASIA impairment scale; BCT: Blood collection tube; CON A: Concanavalin A; CRF: Case report form; CRP: C-reactive protein; FACS: Fluorescence-activated cell sorting; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; GCP: Good clinical practice; HLA: Human leukocyte antigen; ISNCSCI: International standards for neurological classification of spinal cord injury; LPS: Lipopolysaccharides; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; PE: Phycoerythrin; SCI: Spinal cord injury; SCHDS: Spinal cord injury – induced immune depression syndrome; SEB: Staphylococcal enterotoxin B; TBI: Traumatic brain injury; UTI: Urinary tract infection.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MAK, CD, CM, JMS designed the trial protocol and wrote the first draft of the manuscript. TL, PC, AN, GAW, AC, GL, NN, MGF, PM, HDV, UD reviewed the trial protocol. All authors critically revised the manuscript draft for important intellectual content. MAK, CM, PC, HDV, BB, HP, VF, JMS contributed to the establishment of analytical methods. MAK, CD, TL, EP, RW, PC, AN, KDS, GAW, AC, GL, NN, MGF, PV, MC, JD, WE, AE, NU, UK, RH, RROS, IL, VF JMS substantially contributed to the sample and data acquisition. MAK, CD, HP, VF, JMS were responsible for overall trial coordination and supervision. MAK, CD, RW, PC, GL, NN, MC, BB, RCH, RROS, IL, VF were responsible for local trial management. CM, PC, MGF, PM, HDV, UD provided technical support. MAK, RW were responsible for data management. MK performed the interim feasibility analysis. JMS obtained funding. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We are thankful to all patients who gave their consent to participate in the trial during a critical period of their life. Furthermore, we would like to thank Susann Klingbeil for her contribution to the trial protocol development and Ricarda Locher, Daniel Peukert, and Vincent Prinz for their support in sample acquisition. We acknowledge Johanna Schöner for her contribution to the data management. The project has received funding from the German Research Council (DFG; Cluster of Excellence NeuroCure), the Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT Grant number 81717034) and the Wings for Life Spinal Cord Research Foundation (Grant Number WfL-DE-006/1). RCH receives funding from the Elsa-Neumann-Scholarship program (Grant Number H57021). RW is an awarded scholar of the 'Studienstiftung des deutschen Volkes' (Grant Number 186392).

Author details

¹Department of Neurology and Experimental Neurology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany. ²Clinical and Experimental Spinal Cord Injury Research (Neuroparaplegiologie), Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany. ³Department of Musculoskeletal Surgery, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. ⁴Institute of Medical Immunology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. ⁵Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT), Charité - Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. ⁶Department of Immunology, Labor Berlin - Charité Vivantes GmbH, Sylter Straße 2, 13353 Berlin, Germany. ⁷Treatment Centre for Spinal Cord Injuries, Trauma Hospital Berlin, Warener Straße 7, 12683 Berlin, Germany. ⁸Division of Trauma Surgery, University Hospital of Zürich, Sternwartstrasse 14, 8091 Zurich, Switzerland. ⁹Spinal Cord Injury Center, University Hospital Balgrist, Forchstrasse 340, 8008 Zurich, Switzerland. ¹⁰Department of Neurosurgery, University of Toronto, 399 Bathurst St, Toronto, ON M5T 2S8 Canada. ¹¹Department of Neurosurgery, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. ¹²Centre for Trauma- and Reconstructive Surgery, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin, Germany. ¹³Trauma Surgery and Orthopedics Clinic, Trauma Hospital Berlin, Warener Straße 7, 12683 Berlin, Germany. ¹⁴Department of Clinical Epidemiology and Applied Biostatistics, Eberhard Karls Universität Tübingen, Silcherstraße 5, 72076 Tübingen, Germany. ¹⁵German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), c/o Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany. ¹⁶Center for Stroke Research Berlin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany.

Received: 24 September 2013 Accepted: 31 October 2013

Published: 9 November 2013

References

1. Thuret S, Moon LD, Gage FH: **Therapeutic interventions after spinal cord injury.** *Nat Rev Neurosci* 2006, **7**(8):628–643.
2. DeVivo MJ, Kartus PL, Stover SL, Rutt RD, Fine PR: **Cause of death for patients with spinal cord injuries.** *Arch Intern Med* 1989, **149**(8):1761–1766.
3. Soden RJ, Walsh J, Middleton JW, Craven ML, Rutkowski SB, Yeo JD: **Causes of death after spinal cord injury.** *Spinal Cord* 2000, **38**(10):604–610.
4. Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U: **Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome.** *Nat Rev Neurosci* 2005, **6**(10):775–786.
5. Riegger T, Conrad S, Liu K, Schluessener HJ, Adibzadeh M, Schwab JM: **Spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS).** *Eur J Neurosci* 2007, **25**(6):1743–1747.
6. Riegger T, Conrad S, Schluessener HJ, Kaps HP, Badke A, Baron C, Gerstein J, Dietz K, Abdizadeh M, Schwab JM: **Immune depression syndrome following human spinal cord injury (SCI): a pilot study.** *Neuroscience* 2009, **158**(3):1194–1199.
7. Riegger T, Schluessener HJ, Kaps HP, Badke A, Baron C, Gerstein J, Dietz K, Abdizadeh M, Schwab JM: **Hematologic cellular inflammatory response following human spinal cord injury.** *Acta Neuropathol* 2003, **106**:392.
8. Campagnolo DI, Keller SE, DeLisa JA, Glick TJ, Sipski ML, Schleifer SJ: **Alteration of immune system function in tetraplegics. A pilot study.** *Am J Phys Med Rehabil* 1994, **73**(6):387–393.
9. Cruse JM, Lewis RE Jr, Bishop GR, Kliesch WF, Gaitan E, Britt R: **Decreased immune reactivity and neuroendocrine alterations related to chronic stress in spinal cord injury and stroke patients.** *Pathobiology* 1993, **61**(3–4):183–192.
10. Lucin KM, Sanders VM, Jones TB, Malarkey WB, Popovich PG: **Impaired antibody synthesis after spinal cord injury is level dependent and is due to sympathetic nervous system dysregulation.** *Exp Neuro* 2007, **207**(1):75–84.
11. Furlan JC, Krassioukov AV, Fehlings MG: **Hematologic abnormalities within the first week after acute isolated traumatic cervical spinal cord injury: a case-control cohort study.** *Spine (Phila Pa 1976)* 2006, **31**(23):2674–2683.
12. Failli V, Kopp MA, Gericke C, Martus P, Klingbeil S, Brommer B, Laginha I, Chen Y, DeVivo MJ, Dirnagl U, et al: **Functional neurological recovery after spinal cord injury is impaired in patients with infections.** *Brain* 2012, **135**(Pt 11):3238–3250.
13. Strohmeier JC, Blume C, Meisel C, Doecke WD, Hummel M, Hoefflich C, Thiele K, Unbehauen A, Hetzer R, Volk HD: **Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients.** *Cytometry B Clin Cytom* 2003, **53**(1):54–62.
14. Doecke WD, Hoefflich C, Davis KA, Rottgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P, et al: **Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study.** *Clin Chem* 2005, **51**(12):2341–2347.
15. Haeusler KG, Schmidt WU, Fohring F, Meisel C, Helms T, Jungehulsing GJ, Nolte CH, Schmolke K, Wegner B, Meisel A, et al: **Cellular immunodepression preceding infectious complications after acute ischemic stroke in humans.** *Cerebrovasc Dis* 2008, **25**(1–2):50–58.
16. Meisel C, Hoefflich C, Volk HD: **Immune monitoring in SIRS and sepsis based on the PIRO model.** *Dtsch Med Wochenschr* 2008, **133**(45):2332–2336.
17. Held KS, Steward O, Blanc C, Lane TE: **Impaired immune responses following spinal cord injury lead to reduced ability to control viral infection.** *Exp Neuro* 2010, **226**(1):242–253.
18. Campagnolo DI, Dixon D, Schwartz J, Bartlett JA, Keller SE: **Altered innate immunity following spinal cord injury.** *Spinal Cord* 2008, **46**(7):477–481.
19. Kliesch WF, Cruse JM, Lewis RE, Bishop GR, Brackin B, Lampton JA: **Restoration of depressed immune function in spinal cord injury patients receiving rehabilitation therapy.** *Paraplegia* 1996, **34**(2):82–90.
20. Marino RJ, Ditunno JF Jr, Donovan WH, Maynard F Jr: **Neurologic recovery after traumatic spinal cord injury: data from the model spinal cord injury systems.** *Arch Phys Med Rehabil* 1999, **80**(11):1391–1396.
21. Burgdörfer H, Heidler H, Madersbacher H, Kutzenberger J, Palmtag H, Pannek J, Sauerwein D, Stöhrer M, Arbeitskreis Urologische Rehabilitation Querschnittgelähmter, vol. 4: **Manual Neuro-Urologie und Querschnittlähmung. Leitlinien zur urologischen Betreuung Querschnittgelähmter.** In *Überarbeitete Auflage, 4, Überarbeitete Auflage*; 2007.
22. Mann G, Hankey GJ, Cameron D: **Swallowing function after stroke: prognosis and prognostic factors at 6 months.** *Stroke* 1999, **30**(4):744–748.
23. Marino RJ, Barros T, Biering-Sorensen F, Burns SP, Donovan WH, Graves DE, Haak M, Hudson LM, Priebe MM: **International standards for neurological classification of spinal cord injury.** *J Spinal Cord Med* 2003, **26**(Suppl 1):S50–S56.
24. Kirshblum SC, Waring W, Biering-Sorensen F, Burns SP, Johansen M, Schmidt-Read M, Donovan W, Graves D, Jha A, Jones L, et al: **Reference for the 2011 revision of the international standards for neurological classification of spinal cord injury.** *J Spinal Cord Med* 2011, **34**(6):547–554.
25. Davis C, Wu X, Li W, Fan H, Reddy M: **Stability of immunophenotypic markers in fixed peripheral blood for extended analysis using flow cytometry.** *J Immunol Methods* 2011, **363**(2):158–165.
26. Ng AA, Lee BT, Teo TS, Poidinger M, Connolly JE: **Optimal cellular preservation for high dimensional flow cytometric analysis of multicentre trials.** *J Immunol Methods* 2012, **385**(1–2):79–89.
27. Harms H, Prass K, Meisel C, Klehmet J, Rogge W, Drenckhahn C, Gohler J, Bereswill S, Gobel U, Wernecke KD, et al: **Preventive antibacterial therapy in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial.** *PLoS One* 2008, **3**(5):e2158.
28. Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohe J, Vanhems P, Monneret G: **Low monocytic human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock.** *Intensive Care Med* 2010, **36**(11):1859–1866.
29. Zhang Y, Guan Z, Reader B, Shawler T, Mandrekar-Colucci S, Huang K, Weil Z, Bratasz A, Well J, Powell ND, et al: **Autonomic dysreflexia causes chronic immune suppression after spinal cord injury.** *J Neurosci* 2013, **33**(32):12970–12981.

30. Bao F, Bailey CS, Gurr KR, Bailey SI, Rosas-Arellano MP, Brown A, Dekaban GA, Weaver LC: **Human spinal cord injury causes specific increases in surface expression of beta integrins on leukocytes.** *J Neurotrauma* 2011, **28**(2):269–280.
31. Cameron AP, Rodriguez GM, Schomer KG: **Systematic review of urological followup after spinal cord injury.** *J Urol* 2012, **187**(2):391–397.
32. Ronco E, Denys P, Bernede-Bauduin C, Laffont I, Martel P, Salomon J, Bussel B, Guillemot D, Gaillard JL: **Diagnostic criteria of urinary tract infection in male patients with spinal cord injury.** *Neurorehabil Neural Repair* 2011, **25**(4):351–358.
33. Zorner B, Blanckenhorn WU, Dietz V, Group E-SS, Curt A: **Clinical algorithm for improved prediction of ambulation and patient stratification after incomplete spinal cord injury.** *J Neurotrauma* 2010, **27**(1):241–252.

doi:10.1186/1471-2377-13-168

Cite this article as: Kopp *et al.*: The SClentinel study - prospective multi-center study to define the spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS) - study protocol and interim feasibility data. *BMC Neurology* 2013 **13**:168.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Vollständige Publikationsliste

Schwab JM, Zhang Y, Kopp MA, Brommer B, Popovich PG. The paradox of chronic neuroinflammation, systemic immune suppression, autoimmunity after traumatic chronic spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2014;258C:121-29. *IF 4.62*.

Wengert O, Kopp M, Siebert E, Stenzel W, Hegasy G, Suttorp N, Stich A, Zoller T. Human African trypanosomiasis with 7-year incubation period: Clinical, laboratory and neuroimaging findings. *Parasitol Int*. 2014;63:557-60. *IF 2.11*.

Watzlawick R, Sena ES, Dirnagl U, Brommer B, Kopp MA, Macleod MR, Howells DW, Schwab JM. Effect and reporting bias of RhoA/ROCK-blockade intervention on locomotor recovery after spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Neurol*. 2014;71:91-9. *IF nicht verfügbar*.

Kopp MA*, Druschel C*, Meisel C*, Liebscher T*, Prilipp E*, Watzlawick R*, Cinelli P*, Niedeggen A, Schaser KD, Wanner GA, Curt A, Lindemann G, Nugaeva N, Fehlings MG, Vajkoczy P, Cabraja M, Dengler J, Ertel W, Ekkernkamp A, Martus P, Volk HD, Unterwalder N, Kölsch U, Brommer B, Hellmann RC, Ossami Saidi RR, Laginha I, Prüss H, Failli V, Dirnagl U, Schwab JM. The SCIntinel study - prospective multicenter study to define the spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS) - study protocol and interim feasibility data. *BMC Neurol*. 2013;13:168. *IF 2.49*. *contributed equally as first author.

Failli V*, Kopp MA*, Gericke C*, Martus P, Klingbeil S, Brommer B, Laginha I, Chen Y, DeVivo MJ, Dirnagl U, Schwab JM. Functional neurological recovery after spinal cord injury is impaired in patients with infections. *Brain*. 2012;135:3238-50. *IF 10.23*. *contributed equally as first author.

Kopp MA, Liebscher T, Niedeggen A, Laufer S, Brommer B, Jungehulsing GJ, Strittmatter SM, Dirnagl U, Schwab JM. Small-molecule-induced Rho-inhibition: NSAIDs after spinal cord injury. *Cell Tissue Res*. 2012;349:119-32. Review. *IF 3.33*.

Prüss H*, Kopp MA*, Brommer B, Gatzemeier N, Laginha I, Dirnagl U, Schwab JM. Non-resolving aspects of acute inflammation after spinal cord injury (SCI): indices and resolution plateau. *Brain Pathol*. 2011;21:652-60. *IF 4.35*. *contributed equally as first author.

Kopp MA*, Brommer B*, Gatzemeier N, Schwab JM, Prüss H. Spinal cord injury induces differential expression of the profibrotic semaphorin 7A in the developing and mature glial scar. *Glia*. 2010;58:1748-56. *IF 5.46*. *contributed equally as first author. *IF 4.35*.

Brommer, B., Kopp, M.A., Laginha, I., Schwab, J.M.: Secondary immunodeficiency (immune paralysis) following spinal cord injury. *e-Neuroforum*. 2010;1:43–51. *IF nicht verfügbar*

Baid-Agrawal S, Frei U, Reinke P, Schindler R, Kopp MA, Martus P, Berg T, Juergensen JS, Anker SD, Doehner W. Impaired insulin sensitivity as an underlying mechanism linking hepatitis C and posttransplant diabetes mellitus in kidney recipients. *Am J Transplant*. 2009;9:2777-84. *IF 6.19*.

Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Jan Schwab, dem Leiter der Arbeitsgruppe *Spinal Cord Injury Research*, für die Betreuung meiner Dissertation danken, insbesondere für den wissenschaftlichen Input durch seine konzeptbildende Arbeit auf dem Gebiet der Rückenmarkverletzung. Darüberhinaus danke ich Herrn Prof. Schwab für das Vertrauen und die Offenheit, mir – als einem in der vierten Lebensdekade frisch approbierten Mediziner – einen „Startplatz“ in seiner in Berlin neu gegründeten Arbeitsgruppe eingeräumt zu haben.

Gleichzeitig danke ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Dirnagl, dem Direktor der Abteilung für Experimentelle Neurologie der Charité, für die Unterstützung und kritische Begleitung meiner Arbeit, für die Bereitstellung der Rahmenbedingungen und ganz besonders für seine Förderung eines Klimas offenen wissenschaftlichen Austauschs.

Die Kolleginnen und Kollegen sowie Kooperationspartnerinnen und Kooperationspartner, die mit außergewöhnlicher Motivation, Kreativität, Kritik, Ideen und Durchhaltevermögen in besonderer Weise zu den hier zusammengefassten Publikationen beigetragen haben, sind Herr PD Dr. Harald Prüß, Herr Dr. Vieri Failli PhD., Herr Dr. Christian Meisel, Frau Dr. Claudia Druschel, Herr Dr. Thomas Liebscher, Frau Christine Gericke, Herr Erik Prilipp MD., Herr PD Dr. Paolo Cinelli PhD. und Herr Ralf Watzlawick, dem zusätzlich auch mein Dank für das Korrekturlesen der Arbeit gilt.

Ebenso danke ich den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und den internen und externen Kooperationspartnern, die auf verschiedene Weise jeweils maßgeblich zum Gelingen der Arbeit sowie als Ko-Autoren zu den Veröffentlichungen beigetragen haben. Dies sind Herr Dr. Benedikt Brommer, Herr Prof. Dr. Peter Martus, Herr Dr. Andreas Niedeggen, Herr Prof. Dr. Klaus-Dieter Schaser, Frau Prof. Yuying Chen MD. PhD., Herr Prof. Michael DeVivo DrPH., Herr Prof. Dr. Guido Wanner, Herr Prof. Dr. Armin Curt, Frau Dr. Gertraut Lindemann, Frau Inês Laginha MD., Herr Rick Hellmann, Herr Ramin Ossami Saidy, Frau Dr. Susann Klingbeil, Frau Nicole Gatzemeier, Herr Prof. Dr. Hans-Dieter Volk, Herr Prof. Dr. Axel Ekkernkamp, Herr Prof. Michael Fehlings MD. PhD., Frau Dr. Natalia Nugaeva PhD., Herr Prof. Dr. Peter Vajkoczy, Herr PD Dr. Mario Cabraja, Herr Dr. Julius Dengler, Herr Prof. Dr. Wolfgang Ertel, Frau Nadine Unterwalder und Herr Dr. Uwe Kölsch.

Ich möchte mich bei Frau Dr. Dorette Freyer, der stellvertretenden Abteilungsleiterin der experimentellen Neurologie, sowie bei Herrn Ingo Przesdzing und Frau Christa Josties aus dem Fachbereich Histologie für die wissenschaftlich-technische Unterstützung meiner Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Kathrin Kopp, meiner Frau, nicht nur für das mehrmalige Korrekturlesen dieser Arbeit, sondern auch für den wissenschaftlichen „Blick von außen“ auf meine Arbeit insgesamt. Ebenso danke ich Gisela Kopp, meiner Mutter, und Almuth Stumpf, meiner inzwischen verstorbenen Schwester, für die interessierte, offene und geduldige Unterstützung eines Bildungs- und Lebensweges, der gewiss nicht mit dem Lineal gezogen ist, mir jedoch oft richtig erschien und der ohne ihre Unterstützung so nicht möglich gewesen wäre.

Schließlich möchte mich bei allen bedanken, die zu so manchem Aspekt dieser Arbeit beigetragen haben, aber deren Nennung ich hier versäumt haben sollte.