

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von Pentraxin 3 und Interleukin-6-Transsignaling im
Rahmen des Polytraumas

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christopher Alexander Becker

aus Schweich bei Trier

Datum der Promotion: 11.12.2015

meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

AIS	Abbreviated Injury Scale
APACHE II	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATLS®	Advanced Trauma Life Support
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
CD	Cluster of Differentiation
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CRP	C-reaktive Protein
CT	Computertomographie
DCO	Damage Control Orthopaedics
DCS	Damage Control Surgery
DGU	Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ETC	Early Total Care
gp	Glykoprotein
HNO	Hals-Nasen-Ohrenarzt
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleukin
ISS	Injury Severity Score
ITLS	International Trauma Life Support
JAK	Janus-Kinase
kDa	kilo-Dalton
LIF	Leukemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid
mg/L	Milligramm/ Liter
MHC	Major Histocompatibility Complex
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MOV	Multiorganversagen
ng/ml	Nanogramm/ Milliliter
NISS	New Injury Severity Score
nm	Nanometer

PCT	Procalcitonin
pg/ml	Pikogramm/ Milliliter
PHTLS®	Prehospital Trauma Life Support
Prä-mRNA	prä-messenger Ribonukleinsäure
PTS	Hannoveraner Polytraumaschlüssel
PTX3	Pentraxin 3
RISC	Revised Injury Severity Classification
RNA	Ribonukleinsäure
SAP	Serum Amyloid P
SAPS II	Simplified Acute Physiology Score II
sIL-6R	löslicher Interleukin-6-Rezeptor
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TSR	Transsignaling-Ratio
TYK	Tyrosinkinase
VCAM	Vascular Cell Adhesion Protein-
WHO	World Health Organisation

Inhaltsverzeichnis

0. Zusammenfassungen	1
0.1 Zusammenfassung Deutsch.....	1
0.2 Abstract English.....	3
1. Einleitung	5
1.1 Das Polytrauma: Definition & Epidemiologie.....	5
1.2 SIRS / Sepsis und CARS beim Polytrauma.....	10
1.3 Early Total Care vs. Damage Control Surgery beim Polytrauma.....	13
1.4 Zentrale Rolle der IL-6-Zytokinfamilie und der Akut-Phase-Reaktion... 17	
1.4.1 Der IL-6-Rezeptor.....	18
1.4.2 Der lösliche IL-6-Rezeptor (sIL-6R).....	21
1.4.3 Interleukin-6-Transsignaling.....	22
1.5 Pentraxine in der Akut-Phase-Reaktion.....	25
1.5.1 Die Familie der Pentraxine.....	25
1.5.2 CRP.....	26
1.5.3 PTX3.....	27
1.6 Fragestellungen der Dissertation.....	29
2. Material und Methoden	31
2.1 Studiendesign.....	31
2.2 Ein-, Ausschlusskriterien und Gruppenverteilung.....	32
2.3 Screening, Einschluss & Blutproben.....	33
2.4 Klinische Daten.....	34
2.5 ELISA.....	35
2.5.1 sIL-6R & PTX3.....	35
2.6 Statistik.....	42
3. Ergebnisse	43
3.1 Charakteristika.....	43
3.2 IL-6.....	44
3.3 sIL-6R.....	49
3.4 PTX3.....	51

3.5 PCT, CRP und Leukozytenzahl.....	54
3.6 Transsignaling-Ratio (TSR).....	57
3.7 SIRS.....	62
4. Diskussion.....	63
4.1 Kinetik immunologischer Parameter beim Polytrauma.....	64
4.1.1 IL-6 und sIL-6R.....	64
4.1.2 PTX3.....	67
4.1.3 Transsignaling.....	69
4.2 Frühe Marker zur Beurteilung der immunolog. Verletzungsschwere....	72
4.3 Zusammenfassende Beantwortung der Fragestellungen.....	73
4.4 Limitationen.....	75
4.5 Ausblick.....	76
5. Literaturverzeichnis.....	78
6. Eidesstattliche Versicherung.....	93
7. Lebenslauf.....	95
8. Komplette Publikationsliste.....	99
8.1 Zeitschriftenartikel.....	99
8.2 Konressbeiträge.....	100
9. Danksagung.....	101

0. Zusammenfassungen

0.1 Zusammenfassung deutsch

Die Rolle von Pentraxin 3 und Interleukin-6-Transsignaling im Rahmen des Polytraumas

Einleitung:

Die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine mit systemischer Entzündungsreaktion und Störung der Mikrozirkulation ist für die Entwicklung von Organversagen und letztendlich für das Überleben nach Polytrauma verantwortlich. Komplikationen wie MOV und Sepsis stellen eine der Haupttodesursachen dar, welche bezüglich der Mortalität des Polytraumapatienten schon bei der Wahl der initialen Versorgungsstrategie (Damage Control vs. Early Total Care) mitbedacht werden sollten.

Interleukin-6 zählt zu den am besten untersuchten Zytokinen der posttraumatischen Immunantwort und nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation der posttraumatischen systemischen Entzündungsreaktion ein. Der lösliche IL-6-Rezeptor (sIL-6R), sowie das IL-6-Transsignaling, welches bei diversen inflammatorischen Krankheitsbildern wie z.B. Sepsis eine Rolle spielt, wurde noch nicht bzgl. der posttraumatischen Akut-Phase-Reaktion untersucht.

Das neue Akut-Phase-Protein PTX3, welches ebenfalls posttraumatisch bei unterschiedlichsten Verletzungsbildern exprimiert wird, wurde ebenfalls noch nicht bzgl. der Vorhersagekraft inflammatorischer Komplikationen wie SIRS und Organversagen nach Trauma untersucht.

Methodik:

In der vorgelegten Dissertation analysierten wir die Serumkonzentrationen von Pentraxin 3 und des IL-6-Transsignalings (IL-6, sIL-6R) bzgl. deren Expression, temporalem Profil und einer etwaigen Vorhersagekraft inflammatorischer Komplikationen nach Polytrauma. Insgesamt wurden 74 Probanden eingeschlossen: 58 Patienten mit schwerem Polytrauma (Gruppe I, ISS > 25 Punkte), 6 Traumapatienten (Gruppe II, ISS < 15 Punkte) und 10 gesunde Probanden (Gruppe III).

Ergebnisse:

Der mittlere ISS-Score in Gruppe I betrug 43 Punkte und der mittlere PTS-Score 59 Punkte. 46% entwickelten ein Organversagen, 67% ein SIRS und 38% eine Sepsis. Die

mittleren sIL-6R-Serumspiegel waren bei den schwer polytraumatisierten Patienten initial niedrig und die IL-6-Werte gleichzeitig stark erhöht. Weiterhin war die von uns erstmals beschriebene „Transsignaling-Ratio“ ($TSR=IL-6/sIL-6R$) ebenfalls nach 6h erhöht, welches wiederum signifikant mit einer erhöhten Mortalität assoziiert war. Eine nach 48h erhöhte TSR zeigte eine signifikant höhere Inzidenz eines Multiorganversagens.

Die mittleren Serumspiegel von PTX3 waren zu allen Untersuchungszeitpunkten beim schwer polytraumatisierten Patienten erhöht und hatten ihren Maximalwert zwischen 24 - 48h nach Aufnahme, welches mit einer erhöhten Mortalität korrelierte. Die PTX3 Serumkonzentrationen korrelierten signifikant mit der, anhand des ISS und PTS gemessenen, anatomischen Verletzungsschwere direkt nach Aufnahme.

Diskussion:

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Parameter PTX3 und die Transsignaling-Ratio (TSR) potentielle Marker zur frühen Einschätzung der posttraumatischen Immunantwort und Prädiktion des Organversagens sowie der Mortalität darstellen. Die Kinetik dieser immunologischen Parameter hat das Potential initiale Therapiekonzepte des Polytraumamanagements (ETC vs.DCO) auf die individuelle Immunantwort mit Gefahr der Entwicklung sekundärer Komplikationen des Patienten abzustimmen.

Weiterhin könnte der Transsignaling- Mechanismus ein potentielles Ziel der in vivo-Immunmodulation darstellen.

0.2 Abstract English

The role of pentraxin 3 and interleukine-6-transsignaling in polytrauma.

Introduction:

The activation of proinflammatory cytokines with systemic inflammatory response and disturbance of microcirculation are responsible for the development of organ failure and the survival after trauma. Complications such as MOV and sepsis are one of the major causes of death, which has to be considered already in the choice of initial treatment strategy (Damage Control vs. Early Total Care), to prevent an increase of mortality of the polytrauma patient.

Interleukin-6 is one of the most studied cytokines after trauma. It plays an important role in regulating the systemic post-traumatic inflammatory response.

The soluble IL-6 receptor (sIL-6R), as well as the IL-6-transsignaling which play a major role in various inflammatory diseases such as sepsis, has not been investigated for the post-traumatic acute phase response. The peripheral acute phase protein PTX3, which is also involved in a wide range of injuries, has not yet regard concerning the predictive power of inflammatory complications such as SIRS and organ failure after trauma.

Methods:

In our study we investigated the serum concentrations of pentraxin 3 and IL-6 transsignaling (IL-6, IL-6R) regarding their expression, temporal profile and the predictive power of inflammatory complications after polytrauma.

We enrolled 74 subjects. 58 patients with severe multiple trauma (Group I, ISS > 25 points), 6 trauma patients (group II, ISS < 15 points) and 10 healthy subjects (group III).

Results:

The average ISS score in group I was 43 points and the average PTS score 59 points. 46% developed organ failure, 67% SIRS and 38% sepsis.

We could show that the mean sIL-6R serum levels were initially low in the severe polytrauma patients and the IL-6 levels greatly increased at the same time.

Furthermore, the first time we have described "transsignaling ratio" (TSR = IL-6/sIL-6R) was also increased after 6h, which in turn was significantly associated with increased mortality. Patients with elevated TSR after 48h showed a significantly increased

incidence of multi organ failure.

The mean serum levels of PTX3 were increased at all times in severe polytrauma patients and had its peak between 24 - 48 hours after admission, which was associated with increased mortality. The PTX3 concentrations were significantly correlated with the anatomic injury severity, measured by ISS and PTS, immediately after admission.

Discussion:

Our results show that the parameters PTX3, and the transsignaling ratio (TSR) are potential markers for early assessment of post-traumatic immune response, the prediction of organ failure and the mortality. The kinetics of these immunological parameters has the potential to get involved in the initial phase of polytrauma-treatment and to get synchronized with the individual inflammatory status of the patient with the aim to prevent secondary complications.

Furthermore, the Transsignaling-mechanism could be a potential target of in vivo-immunomodulation.

1. Einleitung

1.1 Das Polytrauma: Definition & Epidemiologie

Trauma und speziell Polytrauma stellt eine der Haupttodesursachen des Menschen unter 40 Jahren dar [1,2]. In der Statistik aller Todesursachen in Deutschland belegt das schwere Trauma den 5. Platz, wobei es an 1. Stelle beim mittleren Verlust von Lebensjahren, noch vor bösartigen Neubildungen und Herz-Kreislaufkrankungen steht [3,4].

Gleichwohl hat sich die Patientenversorgung seit den 1970er Jahren stark verbessert, welches sich in einer deutlichen Reduktion der Trauma-Letalitätsrate widerspiegelt. So lag die Letalität des Polytraumas nach Aufnahme in eine Klinik anhand von Daten des TraumaRegisters der deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) im Jahre 2013 bei 10%, wohingegen sie in den 1970er Jahren noch bei ca. 40% lag [5,6].

Auch Änderungen der politischen Rahmenbedingungen und Unfallprävention wie die Einführung der Gurtpflicht für PKW-/LKW-Fahrer, Geschwindigkeitsbegrenzungen, Ausbau der Fußgänger- und Fahrradwege oder Helmpflicht für Motorradfahrer, trugen zur Senkung der Sterberate nach Trauma bei [7]. Neben Prävention war auch die Etablierung eines flächendeckenden Notarztsystems, gemeinsam mit der Gründung der Luftrettung in den 1970iger Jahren, an der Verbesserung der Überlebensraten nach Polytrauma beteiligt [8]. Durch große Fortschritte in der präklinischen und klinischen Versorgung von Traumapatienten durch standardisierte Algorithmen wie z.B. PHTLS[®] (Prehospital Trauma Life Support), ITLS, Trauma-Management[®], sowie prioritätenorientierte klinische Algorithmen wie z.B. ATLS[®] (Advanced Trauma Life Support) und eine verbesserte intensivmedizinische Versorgung mit Etablierung von Organersatzverfahren und Zunahme des pathophysiologischen Verständnisses des Polytraumas als eigenständige „Erkrankung“, reduzierte sich stetig die Letalitätsrate polytraumatisierter Patienten [9,10].

Dies wird auch durch die geänderte zeitliche Verteilung der Traumasterblichkeit von heute im Vergleich zu den 1980er Jahren deutlich [11].

In den 1980er Jahren postulierten Trunkey et al. eine trimodale Verteilung von traumatischen Todesursachen: Als Erstes der unmittelbare Tod infolge Trauma, als

Zweites eine frühe Letalität innerhalb von 1-4h und als Drittes die späte Letalität nach mehr als einer Woche nach Unfall [11,12].

Eine aktuelle Studie unserer Arbeitsgruppe konnte eine neue bimodale Verteilung der Traumaletalität mit nur noch zwei Gipfeln binnen 1h und 4-48h nach Trauma nachweisen. Zum einen in der frühen präklinischen Phase und zum anderen in der Phase der intensivmedizinischen Behandlung des Traumapatienten [11]. Für das Versterben polytraumatisierter Patienten im späteren Verlauf sind, abhängig von Art und Schwere der Verletzungen, in erster Linie das inflammatorisch getriggerte Multiorganversagen durch das Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) und septische Komplikationen ursächlich [11,13-15].

Ein Großteil der Verletzungen, die definitionsgemäß als Polytrauma bezeichnet werden, ereignen sich im Straßenverkehr, hierbei sind sowohl Fußgänger, als auch Motorradfahrer und LKW- oder PKW-Fahrer betroffen [16]. Beachtlich sind die Unterschiede in den Verletzungsmustern, die bei den verschiedenen Kategorien der Unfallbeteiligten auftreten [16]. Bei Fahrradfahrern dominiert trotz einer gestiegenen Quote der Helmtragenden das Schädel-Hirn-Trauma als führende Verletzung [17]. Motorradfahrer verletzen sich in den meisten Fällen an der unteren Extremität, wobei hier Unterschenkel-, sowie Femurfrakturen führend sind. PKW-Fahrer sind für Verletzungen von Abdomen und Thorax sowie des Beckens prädestiniert und Höhenstürze sind sehr oft mit Frakturen im Bereich der Wirbelsäule assoziiert [16-21]. Durch die Vielzahl an unterschiedlichen Verletzungen, die je nach Unfallmechanismus bzw. Art des Unfalls auftreten, wird das Klinikpersonal vor große Herausforderungen gestellt. Je nach betroffener Körperregion muss ein Traumazentrum verschiedene Fachdisziplinen in interdisziplinärer Zusammenarbeit vorhalten.

Im Weißbuch Schwerverletztenversorgung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) wird je nach Versorgungsstufe des Traumazentrums (lokal, regional, überregional) die Art der vorzuhaltenden Fachdisziplinen definiert [4]. In einem überregionalen Traumazentrum muss 24h, 365 Tage pro Jahr ein Facharzt aller chirurgischen Disziplinen einschließlich Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, sowie Fachärzte für HNO, Augenheilkunde und Urologie innerhalb von 20-30 Minuten anwesend sein [4]. Dies stellt sowohl hohe logistische, als auch personelle Ansprüche an die jeweiligen Kliniken, da von den chirurgischen Disziplinen mindestens ein Facharztstandard

gefordert wird und der Unfallchirurg (Traumaleader) ein im ATLS®-Konzept erfahrener Facharzt sein muss [4]. Ein überregionales Traumazentrum hat darüber hinaus die Verpflichtung zur Mit- und Weiterbehandlung von Traumapatienten aller Art innerhalb des jeweiligen Traumanetzwerkes. Eine Beteiligung am Katastrophenschutz ist genauso obligat, wie die Behandlung komplexer Patienten mit Rückenmarkverletzungen oder Amputationen. Apparative Voraussetzungen sind z.B. eine Notaufnahme mit Schockraum, CT, Notfall-OP und eine speziell ausgestattete Intensivstation [4].

Neben des hohen logistischen, personellen und damit verbundenen finanziellen Aufwandes der Polytraumaversorgung, besitzt das Polytrauma auch eine große sozio-ökonomische Bedeutung.

So beziffern die Autoren unterschiedlicher Studien die durchschnittlichen Behandlungskosten pro Patient auf ca. 12.000 € bis über 50.000 € [22-24].

Regel et al. berechnen die Gesamtkosten eines Polytraumas mit ca. 500.000 €, wobei die Folgekosten hierbei meist etwa 250.000 € betragen. Somit entstehen durch Verkehrsunfälle in Deutschland enorme volkswirtschaftliche Kosten, welche pro Jahr auf über 11 Mrd. Euro geschätzt werden [25]. Hierbei sind nicht nur die Behandlungskosten in Betracht zu ziehen, sondern auch Kosten für soziale Unterstützung des Patienten, Rehabilitation und Berentung [25].

In einer Studie aus dem Jahre 1993 zeigte sich dass 8% der nachuntersuchten Polytraumapatienten 2-4 Jahre nach dem Unfall berentet waren und mehr als jeder vierte Patient seinen Arbeitsplatz aufgeben bzw. eine Umschulung vornehmen musste [26,27].

Oben genannte Faktoren verdeutlichen die nicht nur medizinische, sondern auch hohe gesundheitspolitische und sozioökonomische Bedeutung des Polytraumas.

Aufgrund der vielfältigen Verletzungen und Kombinationen dieser Verletzungen, stellt die Definition des Polytraumas eine Herausforderung dar. Dies spiegelt sich in einer international uneinheitlichen Definition des Polytraumas wider und erschwert die Bewertung und Vergleichbarkeit von Studien und damit den wissenschaftlichen Fortschritt zu diesem Thema [28].

Aktuell existieren u.a. nachfolgende in Deutschland häufig eingesetzte Definitionen:

1. Definition nach Tscherne: Verletzung mehrerer Körperregionen oder von Organsystemen, wobei wenigstens eine Verletzung oder die Kombination mehrerer Verletzungen vital bedrohlich ist [29].
2. Definition anhand des Injury Severity Score (ISS): Ein Polytrauma liegt bei einem ISS-Score von ≥ 16 -25 Punkten vor [30,31].
3. Definition mittels Hannoveraner Polytraumaschlüssel (PTS): verschiedene Einzelverletzungen werden berücksichtigt [32-34].
Unterteilung in 4 Schweregrade: PTS-Gruppe I: 1-11 Punkte, PTS-Gruppe II: 12-30 Punkte, PTS-Gruppe III: 31-49 Punkte und PTS-Gruppe IV: ≥ 50 Punkte.

Die Definition mittels ISS-Score hat den Vorteil, dass die errechneten Zahlen mit der Verletzungsschwere korrelieren [35]. Der Nachteil liegt jedoch darin, dass vor allem schwere Traumata erfasst werden, aber keine weiteren aus anderen Körperregionen [35]. Lebensbedrohliche Mono-Verletzungen werden besser durch den ISS abgebildet [35]. Der neu eingeführte New ISS (NISS) sollte dieses Problem lösen, indem die 3 höchsten Quadrate des NISS unabhängig von der Körperregion addiert werden [36]. Der von Oestern, Tscherne, Sturm und Nerlich entwickelte Hannoveraner Polytraumaschlüssel (PTS) hingegen berücksichtigt die Anzahl der Einzelverletzungen und dessen Einfluss auf die Gesamtverletzungsschwere besser als der ISS [37]. Neben diesen anatomischen Scores fließt hier auch das prognostisch relevante Alter des Patienten mit in die Bewertung ein. Schwächen des PTS liegen in der Unterrepräsentanz des Schädel-Hirn-Traumas, des Thoraxtraumas und lebensbedrohlicher Einzelverletzungen wie z.B. der Aortenruptur [37]. Zur Lösung des Problems der uneinheitlichen Definition des Begriffs Polytrauma, hat sich 2010-2014 eine internationale Konsensusgruppe mit einer Neudefinition des Polytraumas beschäftigt. Diese definiert das Polytrauma im Rahmen der „Berlin definition“ als:

AIS > 2 von min. 2 Körperregionen und 1. Alter > 70 Jahre, oder 2. Hypotension (RRsys < 90 mmHg), oder 3. GCS ≤ 8 am Unfallort, oder 4. Azidose (BE ≤ -6), oder 5. Koagulopathie (PTT ≥ 40 sec., INR $\geq 1,4$) [38].

In dieser neuen Definition werden erstmals evidenzbasierte, Outcome relevante physiologische und anatomische Parameter berücksichtigt und miteinander kombiniert [38].

Wie wichtig die Erfassung physiologischer Parameter beim Polytrauma ist, zeigt die Einschätzung, dass bis zu 9% der Patienten nach schwerem Trauma ein Multiorganversagen infolge einer Sepsis bzw. eines SIRS erleiden [39].

1.1 SIRS / Sepsis und CARS beim Polytrauma

Das SIRS bezeichnet eine überschießende Immunreaktion, welche zum Beispiel durch organentzündliche Prozesse wie Pankreatitis, Ischämien aber auch Unfall hervorgerufen werden kann. Trauma gehört ebenso wie größere Operationen, z.B. aortokoronare Bypass-Operationen, zu den Auslösern eines SIRS [40]. Michalopoulos et al. berichten über eine Studie an Patienten nach koronaren Bypass-Operationen, die zeigte, dass 100% der Studienpopulation (n= 2615) nach 12h postoperativ klinische Zeichen eines SIRS aufwiesen [41]. Diese hohe Inzidenz des SIRS wird auch durch eine noch unveröffentlichte Studie unserer Arbeitsgruppe bestätigt, in der gezeigt werden konnte, dass 79% der Traumapatienten mit ISS ≥ 9 , Alter ≥ 18 Jahre, und ≥ 5 d Intensivtherapie, mindestens einmalig ein SIRS mit einem Peak am Unfalltag erlitten [42].

Weitere Studien zeigen, dass etwa 3% bis 17% aller Traumapatienten im Laufe der stationären Versorgung ein/e SIRS/Sepsis und bis zu 9% ein Multiorganversagen auf Grund eines schweren Traumas entwickeln [39]. Andere Autoren beschreiben, dass bis zu 45% der Tode nach Trauma von einem Multiorganversagen, ARDS oder schwerem Schädel-Hirn-Trauma herrühren [43,44].

Zur Beurteilung der klinischen Zeichen eines SIRS wurden im Jahre 1992 von der Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians bzw. der Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) vier Kriterien herausgearbeitet, von denen mindestens 2 erfüllt sein müssen, damit von einem SIRS gesprochen werden kann [45]:

1. Körpertemperatur $> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$
2. Herzfrequenz > 90 Schläge/ Min.
3. Atemfrequenz > 20 Atemzüge/ Min.
4. Leukozytenzahl $> 12 \times 10^9/\text{L}$ oder $< 4 \times 10^9/\text{L}$

Die Akut-Phase-Reaktion gilt als sofort auftretende unspezifische Entzündungsreaktion, wobei es durch Trauma („First Hit“) zu einer unspezifischen Freisetzung von DNA- und RNA-Fragmenten, sowie von Matrix- und Membranproteinen kommt, die als Autoantigene bzw. Aktivatoren der Komplementkaskade und der Akut-Phase-Reaktion dienen [46-49].

Im Einzelnen werden durch Verletzungen des Gewebes sowohl systemisch, als auch lokal pro-inflammatorische Zytokine und Phospholipide ausgeschüttet [50-52]. Hyperakut wirkende Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β , die einen schnellen Effekt haben sind ebenso wie die subakut wirkenden Zytokine IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 u.a. wichtig für die Steuerung des Ablaufs der Akut-Phase-Reaktion [50-52]. Weiterhin sind freie Sauerstoffradikale und heat-shock-Proteine an der systemischen Immunreaktion mit konsekutivem interstitiellem Ödem durch das sog. „Capillary Leak“ und gestörter Mikrozirkulation beteiligt [48,52-55]. Diese erste hyperinflammatorische Phase liegt in einer Zeitspanne von bis zu 48h nach Trauma, ist jedoch bei jedem Patienten individuell und abhängig von der Verletzungsschwere. Verantwortlich für die hyperinflammatorische Phase sind vor allem die proinflammatorisch wirkenden Zytokine wie IL-6 und IL-8 [56]. Beim sog. „First Hit“ kommt es somit je nach Schwere der Verletzung zu einer hyperinflammatorischen Immunreaktion. Dieser ersten hyperinflammatorischen Phase steht eine kompensatorische anti-inflammatorische Phase namens CARS (Compensatory Anti-Inflammatory Response) gegenüber (siehe hierzu: Seite 24). Hierbei kommt es durch Freisetzung anti-inflammatorisch wirkender Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF- β zu einer kompensatorischen Immunsuppression mit Prädisposition für septische Komplikationen [56].

Durch die unterschiedliche Differenzierung von T-Helferzellen (CD4⁺ T-Lymphozyten) in TH1-Lymphozyten und TH2-Lymphozyten werden auch die hyperinflammatorischen und antiinflammatorischen Phasen induziert [52]. Dabei sind die TH1-Zellen in erster Linie für die Sekretion hyperinflammatorischer Zytokine und die TH2-Zellen zur Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine verantwortlich [52]. IL-12, welches von Monozyten und Makrophagen freigesetzt wird, trägt zur Differenzierung der TH1-Lymphozyten bei, daher ist ein Mangel an IL-12, welcher nach schwerem Trauma vorkommt, auch mit einem Wechsel der hyperinflammatorischen Reaktion hin zur antiinflammatorischen Phase assoziiert [52,57].

Beim CARS werden anti-inflammatorisch wirkende Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- β abhängig von der Verletzungsschwere freigesetzt und einige Stunden nach Trauma sind bereits anti-inflammatorisch wirkende Zytokine wie IL-10 im Serum von Traumapatienten nachweisbar [52]. Offensichtlich versucht das Immunsystem der hyperinflammatorischen Situation entgegen zu wirken, um etwaige Organschäden zu

vermeiden. Beispielsweise induziert das CARS die sog. „Endotoxin-Toleranz“ [52,58]. Der genaue Mechanismus hierfür ist immer noch unklar, jedoch kommt es nach Trauma zu einer Reduktion des CD14-Rezeptors aus Monozyten, welcher für die Erkennung von Lipopolysaccharid (LPS) und damit bakteriellen Mikroorganismen verantwortlich ist [52,58]. Diese Tatsache zeigt, dass auch dadurch das Immunsystem nach schwerem Trauma weiter geschwächt wird und es somit für septische Komplikationen mit konsekutivem Multiorganversagen prädisponiert [52,59].

Im Rahmen des CARS findet eine Suppression der MHC-II-Expression zur Reduktion der T-Lymphozyten-Proliferation statt [60]. Invers wird aber auch wieder eine proinflammatorische Antwort verstärkt, indem im Knochenmark die Bildung von Monozyten stimuliert wird, welche die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α sezernieren [60].

Die Frage, ob es bestimmte spezifische zeitliche Profile unterschiedlicher Zytokine gibt, die eventuell sensitiver sind, die immunologische Situation des Traumapatienten (SIRS vs. CARS) zu beurteilen oder vorherzusagen und ob neue Moleküle wie z.B. Pentraxin 3 und der Transsignaling-Mechanismus ggf. das Potential dazu haben, ist Gegenstand dieser Dissertation.

In Anbetracht der posttraumatischen Immunantwort mit Induktion eines MOV und der Erkenntnis, dass die Dauer und das Ausmaß des operativen Eingriffes den Verlauf der proinflammatorischen Immunantwort beeinflussen kann, führte zur Weiterentwicklung der Versorgungsstrategien im Rahmen des Notfallmanagements des Polytraumas.

1.3 Early Total Care vs. Damage Control Surgery beim Polytrauma

Der Begriff Early Total Care (ETC) beschreibt die Versorgungsstrategie einer frühen bzw. sofortigen definitiven osteosynthetischen Versorgung beim Polytraumapatienten. Dieser Ansatz war der Goldstandard in den 1980er und 1990er Jahren, da sich anfangs zeigte dass eine sofortige definitive Versorgung postoperative Komplikationen wie Dauer des Krankenhausaufenthaltes, pulmonale Komplikationen, Lungenarterienembolie und Thrombosen reduzierte [14,15]. Später, in den 1990er Jahren, tauchten jedoch immer mehr Arbeiten auf, welche sowohl anhand klinischer als auch tierexperimenteller Studien nachwiesen, dass sofortige definitive Osteosynthesen (beispielsweise mittels aufgebohrtem Femurmarknagel) nach schwerem Trauma das Risiko postoperativer Komplikationen, wie ARDS und Multiorganversagen erhöhen [61,62]. Stübiger et al. diskutierten Studien, die eine Minimierung des Infektionsrisikos und der Morbidität nach ETC beschreiben. Weiterhin existieren mehrere Studien, die einen Anstieg vor allem pulmonaler Komplikationen nach Schädel-Hirn- und Thoraxverletzungen zeigen [63].

Weitere Forschungsergebnisse zeigten, dass eine hohe initiale Traumalast („First Hit“) auch eine hohe systemische inflammatorische Reaktion nach sich zieht, welche durch ausgedehnte frühe Osteosynthesen („Second Hit“) verstärkt werden kann und in einem SIRS endet [14,15]. Durch den „First Hit“ kann ein Priming von neutrophilen Granulozyten verursacht werden, welche dann im Zuge eines „Second Hit“ leichter aktiviert werden können und somit die „zweite Entzündungsreaktion“ beschleunigen [64]. Genau dies soll durch das klinische Behandlungsprinzip des Damage-Control-Surgery (DCS) vermieden werden.

Damage-Control-Surgery bzw. Damage-Control-Orthopaedics (DCO) hingegen beschreibt eine andere Managementstrategie des Polytraumas, da sich diese Patienten oft in pathologischen Kreislauf- und immunologischen Zuständen durch beispielsweise Blutung, Azidose und Koagulopathie befinden [14,65]. Das Damage Control Surgery-Prinzip kam in der Unfallchirurgie in den frühen 1970er Jahren erstmals auf, da sich zeigte dass eine sofortige Stabilisation einer Femurfraktur mittels Fixateur externe postoperative Probleme wie Lungenversagen stark reduzieren konnte [15]. Demnach

verfolgt dieses Konzept die primäre Stabilisierung des Patienten indem beispielsweise Blutungen gestoppt werden und gleichzeitig eine temporäre externe Fixation der Frakturen vorgenommen wird. Ursprünglich aus der Viszeralchirurgie stammend, konnte das Damage-Control-Prinzip schrittweise auf die Unfallchirurgie übertragen werden. Bereits ab dem 18. Jahrhundert beschreiben französische Chirurgen eine sofortige Amputation eines Beines mit Schussverletzungen als vorrangige lebensrettende Maßnahme bzw. dass die ersten 24h nach Trauma die wichtigsten bezüglich der Entscheidungsfindung einer Versorgungsstrategie sind [66]. Im Jahre 1983 veröffentlichte Harlan Stone eine wegweisende Studie der Viszeralchirurgie [67]. Traumapatienten mit stumpfen oder penetrierenden Abdominalverletzungen, die zusätzlich ein Gerinnungsversagen erlitten, profitierten erheblich vom Damage-Control-Prinzip im Sinne einer sofortigen Laparotomie mit Behebung von lebensgefährlichen Blutungen. Ein „abdominal packing“ wurde durchgeführt und die definitive Versorgung der abdominalen Verletzungen (z.B. Reanastomosierungen, Drainagen, Stomata) in den darauffolgenden Tagen vollzogen. Eine programmierte Re-Exploration (Second Look) des Abdomens erfolgte geplant nach 15-69 Stunden. Durch dieses Vorgehen konnte die Mortalität der Traumapatienten drastisch von 93% auf 35% gesenkt werden [67] .

Letztlich in den klinischen Alltag der Polytraumaversorgung/ Notfallchirurgie wurde das Konzept erst in den 1990er Jahren etabliert [13,68]. Die oben beschriebenen pathophysiologischen Mechanismen führten beim ETC des schweren Polytraumas als „Second- Hit“ zur Steigerung der Letalitätsrate. DCO hingegen reduziert die Inzidenz eines Organversagens, verlängert jedoch die Hospitalisierungsphase, erhöht die Anzahl der Operationen insgesamt und ist mit höheren Kosten verbunden als das ETC-Konzept [15,48,63,69]. Der optimale Zeitpunkt der definitiven osteosynthetischen Versorgung wird in der Literatur kontrovers diskutiert [63]. Dieser Zeitpunkt ist immer individuell zu sehen und ist von der aktuellen physiologischen Situation des Patienten abhängig. Sowohl das ETC- als auch das DCO-Konzept haben Vor- und Nachteile. Demnach ist das Ziel den Patienten einer individuellen, bestmöglichen Therapie zuzuführen, welche sich nicht nur an anatomischen Verletzungen orientiert, sondern auch physiologische Parameter mit einbeziehen muss.

Polytraumatisierte Patienten können in die Subgruppen „stabil“, „borderline“, „instabil“ und „in extremis“ eingeteilt werden [15].

Beim stabilen Polytraumapatienten erscheint nach Risiko-/ Nutzenabwägung das Versorgungskonzept des ETC am besten geeignet [63,70]. Da diese Patienten keine Evidenz einer Koagulopathie oder eines derangierten Metabolismus mit Anomalitäten des Säure-Basen-Haushalt aufweisen und hämodynamisch stabil sind, profitieren sie bezogen auf Letalität und postoperative Komplikationen vom ETC-Ansatz [71].

Instabile Patienten (Polytrauma mit Thoraxtrauma und AIS Thorax > 2 Punkte und/ oder hämodynamisch instabil, AIS der Extremitäten III-IV, Becken-C-Verletzung, Hypothermie, Koagulopathie, Azidose) profitieren jedoch vom Damage Control Prinzip, da durch die Vermeidung des „Second Hit“ das Outcome des Patienten bezüglich Organversagen und Letalität verbessert wird [15,71]. Inwieweit Polytraumapatienten als stabil oder instabil betrachtet werden, wird aktuell noch kontrovers diskutiert. Außerdem unterliegt der Polytraumapatient einer Dynamik, welche eine ständige Re-Evaluation obligat werden lässt [14,63,72].

Die sogenannten Borderline-Patienten werden als prinzipiell kardiopulmonal stabile Polytraumapatienten beschrieben, welche jedoch verschiedene Kriterien erfüllen müssen: ISS \geq 20 + Thoraxtrauma mit AIS \geq 2, Becken-C- oder B-Verletzung, Abdominaltrauma (Moore 3), hämorrhagischer Schock, ISS \geq 40 ohne zusätzliches Thoraxtrauma, beidseitige Lungenkontusion, initialer mittlerer pulmonalarterieller Druck von 24 mmHg). Es wird empfohlen die Versorgung nach den DCO-Prinzipien durchzuführen, wenn beim „borderline-Polytrauma“ ein o.g. Kriterium auf den Patienten zutrifft [15,63,70,71].

Die exakten physiologischen Zusammenhänge sind derzeit noch nicht vollständig entschlüsselt. Auch die Frage nach dem besten Operationszeitpunkt zur Vermeidung eines „Second Hit“ ist nicht abschließend geklärt.

Es ergibt sich die Notwendigkeit Patienten nicht nur entsprechend ihres inflammatorischen Status dem besten Operationsverfahren zuzuordnen, sondern auch die hämodynamische Situation und weitere physiologische Parameter wie Gerinnung, Körpertemperatur, Vorerkrankungen, etc. mit in die Entscheidungsfindung einzubeziehen. Rein physiologische oder anatomische Parameter werden diesem Anspruch und der Komplexität der „Erkrankung Polytrauma“ nicht gerecht. Hieraus

ergibt sich die Notwendigkeit der Etablierung und Integration immunologischer Parameter in das Management von Polytraumapatienten.

Gegenstand dieser Dissertation ist die Evaluation des PTX3 und IL-6-Transsignalings als potentielle frühe immunologische Marker zur Einschätzung des posttraumatischen immunologischen Status des Polytraumapatienten als potentielles Werkzeug für den Traumaleader das optimale OP-Verfahren und/ oder den optimalen Operationszeitpunkt in Zukunft ermitteln zu können.

1.4 Zentrale Rolle der IL-6-Zytokinfamilie und der Akut-Phase-Reaktion

Interleukin-6 wird als klassisches Zytokin der Akut-Phase-Reaktion von verschiedenen Zellen im menschlichen Körper gebildet. Zu diesen Zellen und Geweben gehören B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten, aber auch Mesangiumzellen in der Niere und diverse Tumore [73,74]. Physiologische Blutserumspiegel liegen normalerweise unter 10 pg/ml [75,76].

Diverse Krankheitsbilder wie u.a. verschiedene Tumore und Gefäßerkrankungen wie Atherosklerose sind mit einem Anstieg der IL-6-Serumkonzentration assoziiert [73,77,78].

Interessant ist, dass es auch beim Trauma, Weichteilverletzungen, knöchernen Verletzungen, postoperativ und nach Verbrennungen zu starken Anstiegen der IL-6-Konzentrationen mit vereinzelt erheblichen Schwankungen kommen kann [61,79-87]. In diversen Studien beschreiben die Autoren erhöhte IL-6-Konzentrationen nach Trauma als Auslöser posttraumatischer Komplikationen, wie dem Auftreten eines Multiorganversagens mit schlechtem klinischen Outcome [88,89]. Eine Massentransfusion von Erythrozytenkonzentraten beispielsweise, welche bei der Versorgung von schwerst polytraumatisierten Patienten häufiger zur Anwendung kommt, erhöht ebenfalls die IL-6-Konzentration des Patienten mit den o.g. Folgen bzgl. des Outcomes und ist demnach ein wichtiger physiologischer Parameter bezogen auf den immunologischen Status des Polytraumapatienten [88,90].

IL-6 ist in erster Linie ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin, welches jedoch auch einen anti-inflammatorischen Effekt durch u.a. Induktion der Synthese des TNF- α -Rezeptors, mit konsekutiver Inaktivierung des TNF- α , aufweist [52]. Es ist maßgeblich an der Differenzierung und somit Ausbildung der Immunkompetenz von zytotoxischen T-Zellen, Makrophagen, Megakaryozyten, jedoch auch Osteoklasten beteiligt. Auch Hepatozyten gehören zu den Zielzellen des IL-6-Zytokins, da sie auf den Stimulus von IL-6 hin, die Synthese von CRP und anderen Akut-Phase-Proteinen wie Fibrinogen, Serum Amyloid A, u.a. induzieren [74,76]. Ausgelöst durch TNF- α oder Interleukin-1, sowie generell durch Infektionen (hierbei z.B. durch bakterielles Lipopolysaccharid),

wird die Sekretion von IL-6 verstärkt [74].

Das ausgeschüttete IL-6 bindet sich dann an einen spezifischen Rezeptor, den IL-6-Rezeptor, welcher sowohl membrangebunden als auch als löslicher Rezeptor (sIL-6R) vorliegen kann (siehe 1.4.1 und 1.4.2).

Durch traumabedingte erhöhte Serumkonzentrationen von IL-6 kommt es zu immunologischen Komplikationen wie Multiorganversagen, ARDS und Sepsis mit nachfolgend schlechtem Outcome [52]. IL-6 korreliert zudem mit der Verletzungsschwere und Mortalität von Polytraumapatienten [91].

Die Akute-Phase-Reaktion, bzw. auch die Produktion der Akut-Phase-Proteine mit dem Zweck die Entzündungsreaktion einzuleiten, wird zentral durch IL-6 gesteuert und reguliert [47].

1.4.1 Der IL-6-Rezeptor

Der IL-6-Rezeptor selbst kann nur von seinem Liganden IL-6 gebunden werden, wobei dieser sowohl membranständig als auch in löslicher Form (sIL-6R) existiert, jedoch besitzen nur wenige Zellen wie Hepatozyten und Leukozyten (Monozyten, neutrophile Granulozyten, T- und B- Lymphozyten) den membranständigen IL-6-Rezeptor [76,92-94]. Der Interleukin-6-Rezeptor besteht aus zwei Polypeptidketten, dem eigentlichen IL-6-Rezeptor mit einer Molekülmasse von 80 kDa und dem Signalüberträger (signal transducer) gp130 mit einer Molekülmasse von 130 kDa [95]. Ligandenbindungsstelle ist der IL-6-Rezeptor (alpha-Untereinheit), nicht aber die gp130-Untereinheit (Abb. 1) [95,96].



Abb. 1: Molekülstrukturelle Darstellung des Interleukin-6-Rezeptorkomplexes, bestehend aus gp130 (grau) und alpha-Rezeptor (IL-6R) (pink). Zusätzlich wird IL-6 mit dargestellt (orange).

Quelle: mit Genehmigung von Fa. Novimmune SA, Genf, Schweiz.

Nach der Bindung von IL-6 an den Rezeptor (alpha-Untereinheit bzw. alpha-Rezeptor, IL-6R, CD126) bildet sich ein Komplex aus alpha-Rezeptor (IL-6R) und IL-6, welcher dann über den signal-transducer gp130 (CD130) die Signaltransduktion in der Zelle bewirkt [92,94,95]. Das aus 277 Aminosäuren bestehende gp130 wird auf nahezu allen Zellen in Organen des menschlichen Körper exprimiert. Analog zu IL-11, Oncostatin-M, CNTF, cardiotrophin-1, LIF, u.a. wird durch gp130 die Signaltransduktion auch beim IL-6-Rezeptor ausgelöst [94,97]. Wenn IL-6 nun an den IL-6-Rezeptor andockt, kommt es zu einer Konformationsänderung mit Homodimerisierung von gp130. Durch den JAK-STAT-Weg wird die Signaltransduktion mit nachfolgender Transkription verschiedener Gene der Akut-Phase-Reaktion ausgelöst [74]. Hierbei wird durch gp130 eine Aktivierung der Janus-Kinasen JAK1 und JAK2, sowie der Tyrosin-Kinase TYK2 induziert. Diese Kinasen induzieren dann u.a. die Phosphorylierung von STAT3, RAS und dem Phosphoprotein und Transkriptionsfaktor NF-IL6 [92,94,98,99]. Die phosphorylierten STAT-Proteine (insbesondere STAT1, STAT3 und STAT5) schließen sich zu einem Dimer zusammen, translozieren in den Zellkern, interagieren mit der DNA und wirken dort als Transkriptionsfaktor, indem sie sich an Erkennungssequenzen in den Promotorregionen binden, wodurch in der Folge die Transkription der Akut-Phase-

Proteine ausgelöst wird (Abb. 2) [99-101].

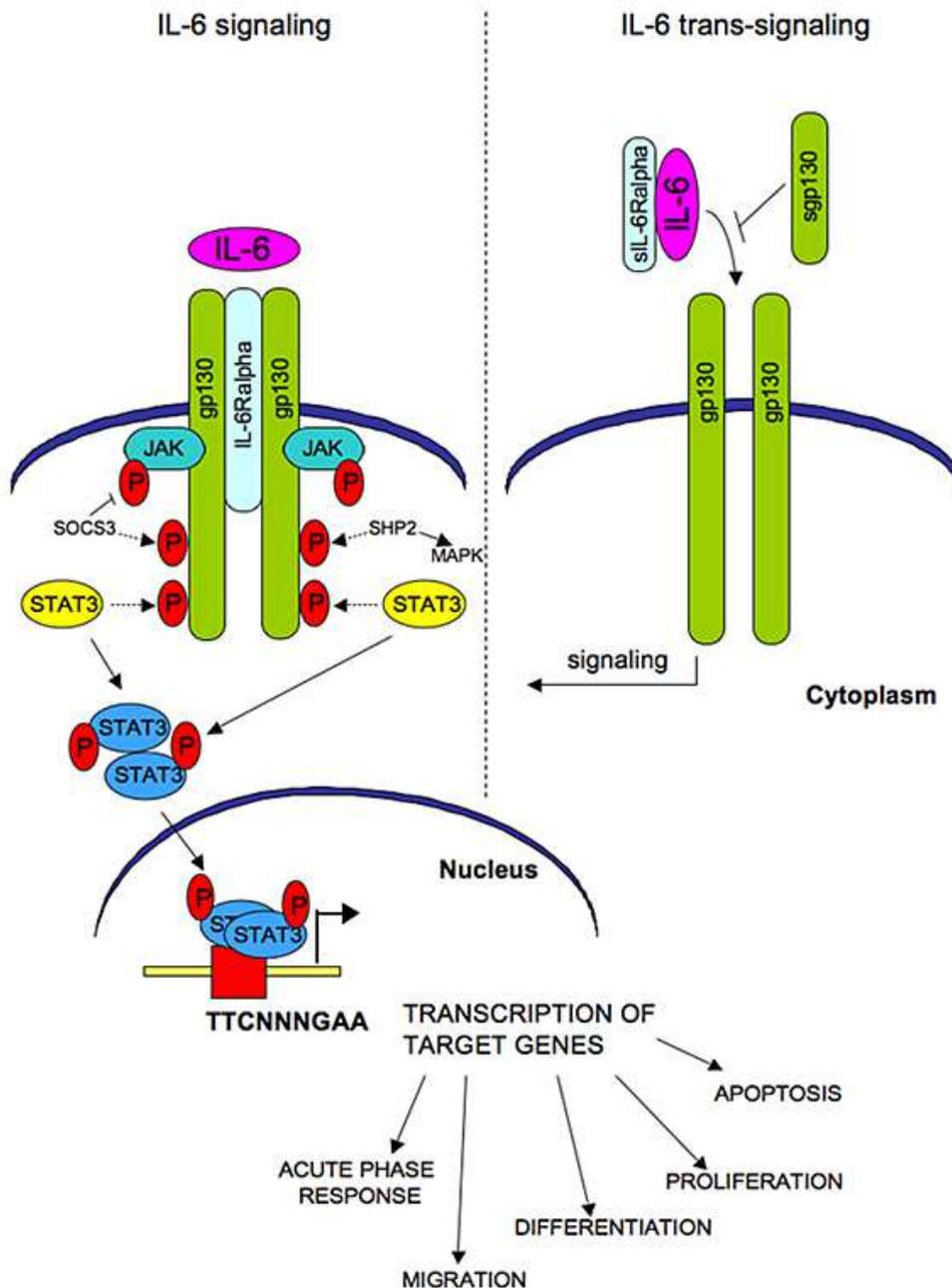


Abb. 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion des IL-6-Rezeptors und des IL-6-Transsignalings. Bindung von IL-6 an IL-6Ralpha, dadurch Signaltransduktion über gp130/ JAK-STAT. Transsignaling: gp130-Aktivierung durch IL-6/sIL-6R-Komplex und Blockade des Transsignalings durch sgp130.

Quelle: Camporeale und Poli (2012) [102], mit Genehmigung von Frontiers in Bioscience.

1.4.2 Der lösliche IL-6-Rezeptor (sIL-6R)

Im Gegensatz zum membranständigen Rezeptor existiert ebenfalls eine lösliche Form des IL-6R, der sog. soluble IL-6-receptor (sIL-6R). Unterschiedliche Zytokine besitzen neben ihrem membranständigen auch einen löslichen Rezeptor, jedoch ist der sIL-6R der einzige lösliche Rezeptor mit agonistischer Funktion, wobei der exakte Mechanismus der agonistischen Funktion Gegenstand aktueller Studien ist [48,103]. Im Gegensatz zu IL-1, dessen löslicher Rezeptor (sIL-1R) das IL-1 komplexiert und somit antagonistisch wirkt, wird durch das IL-6-Transsignaling eine ubiquitäre Aktivierung aller gp130-exprimierender Zellen (siehe 1.4.3) verursacht [94,104].

Derzeit sind zwei unterschiedliche Entstehungsmechanismen des löslichen IL-6-Rezeptors (sIL-6R), das Shedding und alternatives Splicing bekannt [105]. Beim Shedding kommt es zu einem proteolytischen Abspalten der extrazellulären Domäne des membranständigen Rezeptors, welches durch bakterielle Proteasen oder Metalloproteasen geschieht, wodurch der nun lösliche IL-6R (sIL-6R) freigesetzt wird [103,106-110].

Das alternative Splicing, welches beispielsweise bei der Proteinherstellung in Virusorganismen eine große Rolle spielt, läuft dann ab, wenn aus der prä-mRNA im Zellkern nicht nur Introns sondern auch Exons entfernt werden [100]. Diese Form des Entstehens des sIL-6R scheint zum überwiegenden Teil an der Bildung des löslichen Interleukin-6-Rezeptors verantwortlich zu sein [111-113].

Der agonistisch wirkende sIL-6R wurde bei gesunden Menschen im Blut und Urin nachgewiesen [114]. Eine Induktion des sIL-6R nach hämorrhagischem Schock infolge eines Polytraumas wurde nun erstmals von uns in einem neuartigen Polytrauma-Mausmodell nachgewiesen [115]. Hierdurch zeigt sich die grundlegende pathophysiologische Bedeutung des Transsignaling-Mechanismus im Rahmen der posttraumatischen Immunantwort.

Der sog. „Transsignaling-Mechanismus“ (siehe 1.4.3) und somit auch die Serumkonzentrationen von sIL-6R spielen bei mehreren Krankheitsbildern wie hämorrhagischem Schock, Sepsis, verschiedenen Krebsarten oder Autoimmunerkrankungen ebenfalls eine Rolle [48,116,117].

1.4.3 Interleukin-6-Transsignaling

Der Begriff Interleukin-6-Transsignaling beschreibt die Bindung des IL-6 an sIL-6R, wobei dieser Komplex in der Lage ist Zellen, welche gp130 exprimieren, zu aktivieren [118,119] (siehe auch: Seite 20). Dies sind Zellen nahezu aller Gewebe, wie beispielsweise Herz, Leber, Lunge, Milz oder Gehirn, welche beim Polytrauma auch eine große Rolle spielen [120].

Da nun auch Zellen die originär nicht IL-6-sensibel sind, bzw. keinen membranständigen IL-6-Rezeptor ausgebildet haben, vom IL-6/sIL-6R-Komplex aktiviert werden können, stellt sich die Frage welche Zellen davon im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion und posttraumatischen Entzündungsreaktion insbesondere betroffen sind bzw. reguliert werden.

IL-6-Transsignaling ist nicht nur an der Aktivierung diverser Zellen über gp130 beteiligt, sondern auch an der Immunmodulation, indem es zur Differenzierung und Aktivierung von regulatorischen T-, sowie TH-17-Zellen führt [105]. Weiterhin führt der IL-6/sIL-6R-Komplex zu einem Wachstum von Zelllinien wie hämatopoetischen Vorläuferzellen, Fibroblasten, Osteoklasten oder Neurone [94]. Auch die Regulation der Leukozyteninfiltration bei Entzündungen scheint vom Transsignaling mit reguliert zu werden. Hierbei kommt es in Endothelzellen durch gp130-Aktivierung zur Produktion verschiedener Chemokine wie (IL-8, MCP-1, MCP-3) und Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 [93,94]. Demnach kann die Hypothese aufgestellt werden, dass durch das Transsignaling die posttraumatische hyperinflammatorische Situation eines Polytraumas verstärkt wird.

Ob lokal erhöhte sIL-6R-Konzentrationen direkt mit der Leukozytenmigration in Zusammenhang stehen ist im Moment nicht abschließend geklärt [94].

Zudem wird der Transsignaling-Mechanismus durch die lösliche Form des gp130 (sgp130) reguliert, welches den Transsignaling-Prozess verhindern kann, indem sgp130 den IL-6-/sIL-6R-Komplex inaktiviert (siehe auch: Seite 20) [121-123].

Durch den Nachweis der Induktion der Akut-Phase-Reaktion durch das IL-6-Transsignaling, scheint dieser Mechanismus die Entzündungsreaktion zu beeinflussen [124,125].

Die einzigartige agonistische Funktion des sIL-6R, welcher im Zusammenschluss mit IL-6 nun jegliche Zellen mit gp130-Exprimierung aktivieren kann, ohne dass diese einen membranständigen IL-6-Rezeptor originär besitzen müssen, weist darauf hin wie interessant dieser lösliche Rezeptor für die posttraumatische Entzündungsreaktion ist. Die Tatsache dass auch Zellen wie Neurone und Osteoklasten aktiviert werden, zeigt weiterhin, dass über die Immunologie hinaus auch weitere Parameter wie Frakturheilung und Regeneration nach Schädel-Hirn-Trauma durch das IL-6-Transsignaling beeinflusst werden könnten.

Der Transsignaling-Mechanismus könnte demnach eine Antwort auf die Frage der Ursache für die überschießende proinflammatorische, posttraumatische Immunantwort sein (Abb. 3) [48,126].

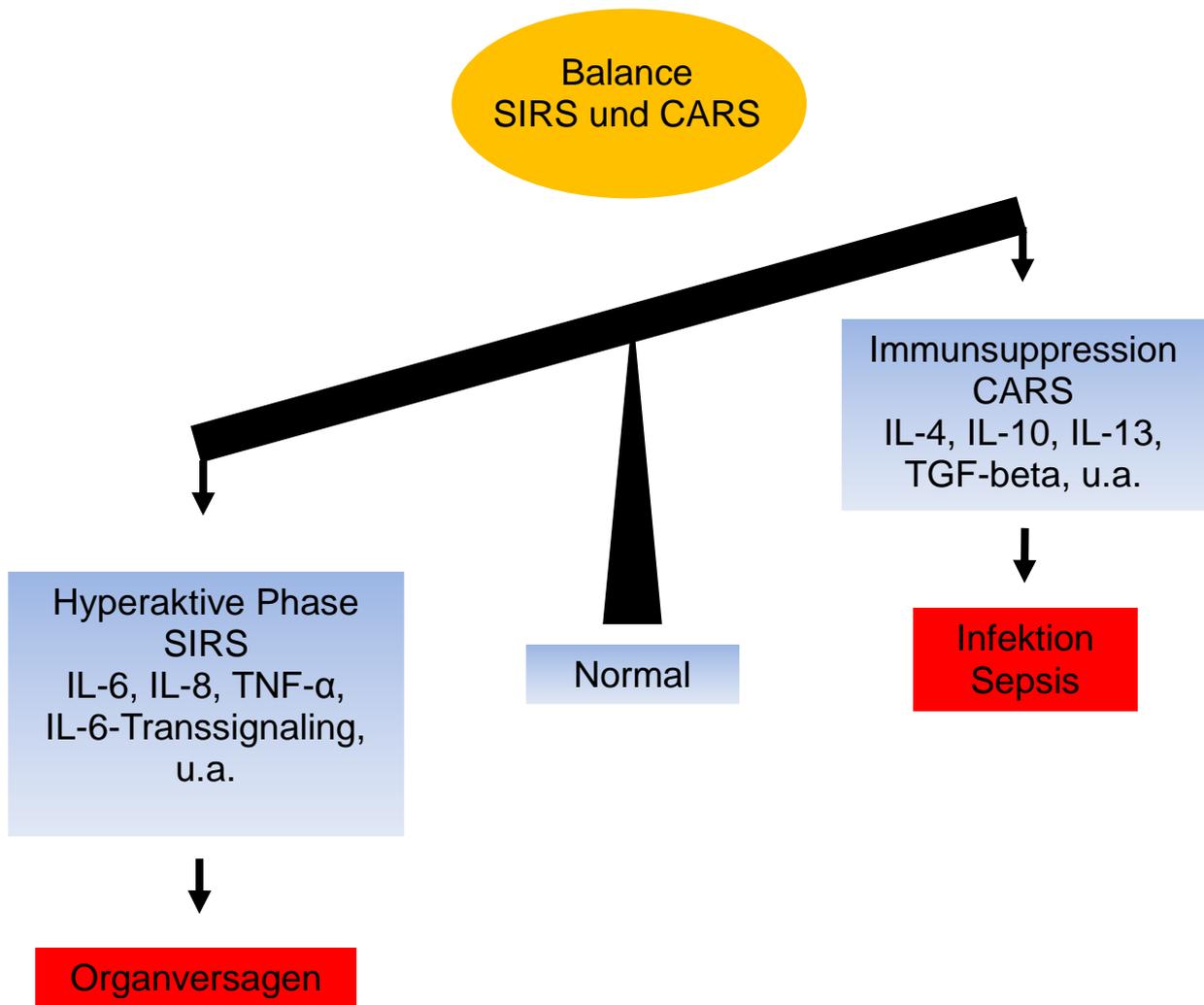


Abb. 3: Balance zwischen der hyperinflammatorischen und antiinflammatorischen immunologischen Situation des Traumapatienten. Überwiegen der hyperinflammatorischen Phase u.a. durch Transsignaling.

Quelle: © AG Polytrauma, CMSC, Charité – Universitätsmedizin Berlin

1.5 Pentraxine in der Akut-Phase-Reaktion

Ein weiteres interessantes Protein zur Evaluierung der posttraumatischen Entzündungsreaktion stellt potentiell das Pentraxin 3 (PTX3) dar. Als Akut-Phase-Protein wird es durch alle Trauma-relevanten Zytokine der posttraumatischen Immunantwort, wie IL-1, TNF- α und IL-6 induziert und außerdem extrahepatisch synthetisiert [127-129].

1.5.1 Die Familie der Pentraxine

Die Familie der Pentraxine wird in kurze und lange Pentraxine unterteilt wobei zu den klassischen Vertretern der kurzen Pentraxine die in der Leber synthetisierten Akut-Phase-Proteine CRP und Serum Amyloid P (SAP) gehören [127,130,131]. Pentraxine sind seit mehreren Millionen Jahren konservierte Proteine und molekular charakterisiert durch ihre spezifische carboxy-terminale Domäne, der sog. „Pentraxin-Domäne“ [127,130,131]. In den letzten Jahrzehnten wurden neue Vertreter der Pentraxine wie Pentraxin 3, neuronales Pentraxin 1 und neuronales Pentraxin 2 entdeckt und typisiert [132].

Pentraxin 3 hat sich in den letzten Jahren als interessantes extrahepatisch synthetisiertes Protein herausgestellt [133-135]. Die extrahepatische Synthese, beispielsweise aus Zellen des Muskel- und Bindegewebes, macht es auch für das Verständnis der Entzündungsreaktion nach Trauma attraktiv, da es von nahezu allen Akut-Phase-Proteinen und Zytokinen der posttraumatischen Immunantwort induziert wird und somit ein immunologischer Marker der anatomischen Gesamtverletzungsschwere sein könnte.

Andere Pentraxine wie das kurze Pentraxin CRP sind lange bekannt und wichtige Regulatoren der Akut-Phase-Reaktion (siehe 1.5.2) [136].

1.5.2 CRP

Das klassische hepatisch synthetisierte Akut-Phase-Protein CRP wurde ursprünglich im Jahre 1930 erstmals von Tillet und Francis beschrieben [137].

Der Hauptinduktor für die CRP-Synthese in der Leber ist IL-6, welches sich an den membranständigen IL-6-Rezeptor an den Hepatozyten bindet und nachfolgend die Synthese von CRP induziert [138]. CRP ist mit seiner pentameren Struktur in der Lage sich an Polysaccharid-Strukturen von Mikroorganismen zu binden und somit den klassischen Weg des Komplementsystems mit zu aktivieren [138,139]. Dies geschieht über die Bindung an C1q mit der kalziumunabhängigen Bindungsseite des CRP [140]. Phosphorylcholin als Bestandteil von Biomembranen kann von CRP kalziumabhängig gebunden werden, wobei durch diesen Prozess die Opsonierung von Bakterien, anderen Mikroorganismen oder nekrotischen bzw. apoptotischen Zellen ausgelöst wird [140-142].

Die Serumkonzentration von CRP ist bei viralen und bakteriellen Infektionen erhöht, es kann jedoch auch bei anderen Erkrankungen wie Atherosklerose und auch posttraumatisch und postoperativ zu teilweise beträchtlich hohen Serumspiegeln kommen [132,139,143].

Stark erhöhte CRP-Konzentrationen von 40-100 mg/L scheinen bei passenden klinischen Parametern auch sensitiv und spezifisch für Patienten mit Sepsis zu sein, wobei CRP bezogen auf die Früherkennung einer Sepsis anderen Markern wie PCT und IL-6 jedoch deutlich unterlegen ist [139]. Ein weiterer Nachteil des CRP ist die fehlende Spezifität bei viralen und bakteriellen Erkrankungen, ebenso wie bei febrilen Patienten [139].

Die Tatsache dass sich CRP auf Grund der unspezifisch erhöhten Serumkonzentrationen postoperativ und posttraumatisch nur bedingt als frühzeitiger Marker für SIRS und Sepsis eignet, zeigt die Notwendigkeit der Untersuchung anderer früher Marker zur Evaluierung der posttraumatischen Entzündungsreaktion [64]. Dies ist besonders wichtig in der frühen Phase der Schockraumversorgung, in der es um die Entscheidungsfindung zwischen ETC und DCO geht. Ziel muss es sein Parameter zu finden, die am Ende traumarelevanter immunologischer Kaskaden stehen, um dann mittels weniger Parameter eine möglichst globale Aussage treffen zu können.

Einer dieser potenziellen Marker stellt das lange Pentraxin PTX3 dar.

1.5.3 PTX3

Das in den 1990er Jahren identifizierte lange Pentraxin PTX3 unterscheidet sich zu den kurzen Pentraxinen CRP und SAP durch die unterschiedliche Lokalisation der kodierenden Chromosomen und die Stimuli, welche zur Bildung von PTX3 führen [142]. Das *ptx3*-Gen ist beim Menschen auf Chromosom 3, q25 lokalisiert und codiert das insgesamt 381 Aminosäuren umfassende Protein, wodurch PTX3 eine Molekülmasse von 40,165 kDa aufweist [131,142,144]. Der Normalwert der PTX3-Serumkonzentration beim Gesunden liegt < 2 ng/ml [145].

Zu den PTX3-produzierenden Zellen gehören Endothelzellen, Muskelzellen, Adipozyten, Fibroblasten und dendritische Zellen, Makrophagen und auch Ovarien [98,132,144,146,147]. Die überwiegende Synthese von Pentraxin 3 erfolgt daher durch extrahepatische Zellen und Gewebe, wodurch erhöhte Konzentrationen direkt am Ort der Entzündung entstehen [148,149].

Ebenfalls interessant für die Rolle dieses Proteins im Rahmen der posttraumatischen Entzündungsreaktion, ist die Beteiligung von PTX3 bei Ischämie, Reperfusion, Sepsis, septischem Schock, Myokardinfarkt aber auch Lungenverletzungen [48,128,136,144,150,151]. Eine neuere Studie zeigt, dass die PTX3-Serumkonzentrationen mit der Schwere einer Sepsis bei kritisch kranken Patienten korrelieren, außerdem scheint eine erhöhte PTX3-Konzentration ein früher Marker bei schwerer Meningokokken-Sepsis zu sein [145].

Pentraxin 3 spielt zudem bei vielen weiteren inflammatorischen Erkrankungen, wie bei Atherosklerose, Vaskulitiden, rheumatoider Arthritis, Apoplex, Aortendissektionen, ARDS, Vorhofflimmern, akuter Pankreatitis und Angina pectoris eine wichtige Rolle [131,144,151-153].

Die Induktion zur PTX3-Synthese erfolgt überwiegend durch TNF- α , IL-1, durch mikrobielles LPS und toll-like-Rezeptorliganden über den NF- κ B-Promotor, wobei auch IL-6 in der Lage ist die PTX3-Produktion zu stimulieren [131,142,144]. Andere Liganden

für PTX3 sind beispielsweise die Zellmembranen diverser Mikroorganismen wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, u.a. welche wahrscheinlich über das outer membrane protein A (OmpA) an PTX3 gebunden werden [144].

Die Konzentrationen von TNF- α werden durch PTX3 gesteigert, wodurch PTX3 selbst wieder den Kreislauf seiner eigenen Aktivierung aufrecht erhält und weiterhin auch die Produktion von antiinflammatorisch wirkendem IL-10 induzieren kann [127,151,154].

PTX3 aktiviert ähnlich wie CRP das Komplementsystem über die Bindung von C1q an die C-terminale Domäne [131,155]. Apoptotische und nekrotische Zellen werden, wie von CRP ebenfalls, durch PTX3 gebunden, dadurch opsoniert und letztlich phagozytiert, wobei ein wichtiger Unterschied zum CRP jedoch in der calcium-unabhängigen Bindung des PTX3 an apoptotische Zellen besteht [142,144,156].

Auf Grund der extrahepatischen Synthese von PTX3 und der Tatsache, dass es durch diverse Trauma-assoziierte Zytokine induziert wird, ist dieses Molekül interessant für die Erforschung der posttraumatischen immunologischen Mechanismen. Es könnte, wie oben bereits beschrieben, ebenfalls gut die physikalisch-anatomische Verletzungsschwere reflektieren. Die Funktion des PTX3 beim Polytrauma wurde bis jetzt noch nicht untersucht.

Anhand oben genannter pathophysiologischer Zusammenhänge ergeben sich die nachfolgenden Hypothesen bzw. Fragestellungen dieser Dissertation.

1.6 Fragestellungen der Dissertation

Interleukin-6 spielt eine zentrale Rolle in der posttraumatischen Akut-Phase-Reaktion und ist diesbezüglich schon seit langem Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Im Gegensatz zu IL-6 wurde das IL-6-Transsignaling noch nicht in Zusammenhang mit dem immunologischen Status des Patienten nach schwerem Trauma gebracht. Die Tatsache dass der lösliche IL-6-Rezeptor (sIL-6R) bzw. das Transsignaling in zahlreichen Studien bei diversen Krankheitsbildern wie hämorrhagischem Schock, Sepsis oder Autoimmunkrankheiten nachweislich die inflammatorische Reaktion moduliert, macht wahrscheinlich dass dieser Mechanismus auch posttraumatisch an der Entstehung eines SIRS oder einer Sepsis beteiligt ist.

IL-6 und das IL-6-Transsignaling bilden die sowohl inflammatorische als auch antiinflammatorische Reaktion des Organismus ab. Auf Grund der einzigartigen agonistischen Funktion des sIL-6R in Verbindung mit IL-6, wodurch eine Vielzahl von Zellen nun IL-6 responsiv werden, könnte dies die Ursache der überschießenden Immunreaktion nach schwerem Trauma sein. Darauf basierend formulierten wir folgende Fragen:

- I. Existiert eine Kinetik der immunologischen Parameter sIL-6R und TSR beim Polytrauma?
- II. Unterscheiden sich die Serumkonzentrationen von sIL-6R und IL-6 und der TSR-Quotient beim polytraumatisierten Patienten gegenüber Gesunden und weniger schwer verletzten Probanden?
- III. Gibt es einen Zusammenhang zwischen den immunologischen Profilen von sIL-6R, IL-6, TSR und Mortalität / Organversagen / SIRS und Sepsis beim Polytrauma?
- IV. Sind die Serumkonzentrationen des sIL-6R mit der Verletzungsschwere gemessen mit ISS und PTS assoziiert?

In Anlehnung an oben genannte pathophysiologische Zusammenhänge, besitzt Pentraxin 3 einen wichtigen Stellenwert im Verständnis der Akut-Phase-Reaktion und in der Entstehung und Aufrechterhaltung verschiedener Krankheitsbilder.

Auch bei diesem Akut-Phase-Protein existieren keine Studien zur Kinetik des PTX3 nach Trauma. Jedoch ist es außerordentlich interessant für diese Forschung, da es von mehreren Geweben außerhalb der Leber synthetisiert wird und somit einen peripheren Marker der Inflammation darstellen kann. Dadurch könnte es sich als Marker für die physikalisch-anatomische Verletzungsschwere etablieren. Zudem wird die Synthese von PTX3 durch IL-6 als zentrales Akut-Phase-Protein, welches hohe Serumspiegel nach Trauma erreicht, induziert [131,142,144]. Auf Grund dieser Überlegungen wurden folgende Fragen formuliert:

- V. Existiert eine Kinetik der PTX3 Serumkonzentration beim Polytrauma?
- VI. Unterscheiden sich die Serumkonzentrationen von PTX3 beim polytraumatisierten Patienten gegenüber Gesunden und weniger schwer verletzten Probanden?
- VII. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration von PTX3 und Mortalität / Organversagen / SIRS und Sepsis beim Polytrauma?
- VIII. Ist PTX3 mit der Verletzungsschwere gemessen mit ISS und PTS assoziiert?

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Im Rahmen einer prospektiven Observationsstudie (Ethikvotum: EA2/103/08 und EA2/40/11) untersuchten wir den Einfluss bzw. die Effekte von PTX3 und des IL-6-Transsignalings im Rahmen des Polytraumas.

Insgesamt wurden 74 Probanden in die Studie eingeschlossen. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich von April 2009 bis März 2012.

Zum Nachweis der unterschiedlichen Expressionsmuster der Zytokine bzw. des löslichen IL-6 Rezeptors wurden serielle Blutproben von Patienten auf sIL-6R und PTX3 mittels ELISA untersucht. Weiterhin wurden die Werte für IL-6, PCT, CRP (Heparinplasma / Serum) und die Leukozytenzahl (EDTA) im Zentrallabor des Campus Virchow Klinikum der Charité - Universitätsmedizin Berlin bestimmt und klinische Daten wie Alter, Geschlecht, ISS, PTS, RISC, SIRS, SOFA, SAPS II und APACHE II erhoben.

2.2 Ein-, Ausschlusskriterien und Gruppeneinteilung

Die Studienteilnehmer wurden in 3 Gruppen mit folgenden Einschlusskriterien unterteilt:

I. Gruppe (Polytrauma-Gruppe): Alter ≥ 18 Jahren, ISS-Score ≥ 25 , Aufnahme im Schockraum $< 2h$ und Zuverlegung $< 6h$ nach Trauma, therapiefreies Intervall von < 30 Min.

II. Gruppe (Trauma-Gruppe): Alter ≥ 18 Jahren, ISS-Score ≤ 15 , Aufnahme im Schockraum $< 2h$ und Zuverlegung $< 6h$ nach Trauma, therapiefreies Intervall von < 30 Min.

III. Gruppe (Gesunde): Alter ≥ 18 Jahre, keine Infektionskrankheit < 1 Monat.

Ausschlusskriterien definierten wir als:

- Alter < 18 Jahren,
- Aufnahme im Schockraum $\geq 2h$,
- Zuverlegung $\geq 6h$ nach Trauma und
- ein therapiefreies Intervall von mehr als 30 Minuten.

Polytraumapatienten wurden in Gruppe I und weniger schwer verletzte Patienten in Gruppe II eingruppiert. Die Gruppe III war die Vergleichsgruppe bestehend aus 10 gesunden Probanden.

Damit ein Vergleich mit weniger schwer verletzten Patienten vorgenommen werden konnte, wurden die gleichen Zytokine bzw. löslichen Rezeptoren auch bei jenen Probanden zu jeweils den gleichen Zeitpunkten gemessen. Gruppe III, die aus gesunden Probanden bestand lieferte die Standardwerte für IL-6, sIL-6R, Transsignaling-Ratio (TSR) und PTX3.

Die Verletzungsschwere der polytraumatisierten Patienten wurde anhand des Injury Severity Scores (ISS) und des Hannoveraner Polytrauma Schlüssels (PTS) berechnet [31,33].

2.3 Screening, Einschluss & Blutproben

Das Studienteam wurde via automatischem Sammelruf telefonisch zu jeder Tages- und Nachtzeit alarmiert, wenn ein polytraumatisierter Patient in den Schockraum des überregionalen Traumazentrums am Campus Virchow Klinikum der Charité - Universitätsmedizin Berlin eingeliefert wurde. Nach Aufnahme in den Schockraum wurden die Einschlusskriterien vom Studienteam verifiziert. Bei positiven Einschlusskriterien und fehlenden Ausschlusskriterien wurde den eingelieferten Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils eine Blutprobe entnommen. Bis zur schriftlichen Einwilligung des Patienten oder durch einen amtlich bestellten Betreuer verwendeten wir ausschließlich Restblut von Routineblutabnahmen. Wobei nach Einwilligungsfähigkeit des Patienten bzw. des gesetzlichen Betreuers die Einwilligung rückwirkend eingeholt und nachfolgend neben den Routine-Laborparametern eine zusätzliche Blutprobe (Serum-Röhrchen) entnommen wurde.

Die Zeitpunkte der Blutentnahmen in der Patientengruppe, in der sIL-6R und PTX3 gemessen wurden, waren nach Einlieferung (0h) folgende: 6, 24, 48, 72, 96 Stunden. Nach Entnahme der Blutproben wurden diese zentrifugiert und tiefgefroren (-80°C).

Die posttraumatischen IL-6-, PCT-, CRP- und Leukozytenkonzentrationen wurden ebenfalls zum Zeitpunkt 0h bei Aufnahme und nach 6, 24, 48, 72 und 96 Stunden durch das Routinelabor bestimmt.

2.4 Klinische Daten

Nachfolgende klinische Daten wurden von jedem Patienten einzeln dokumentiert und für die Analyse der Ergebnisse verwendet:

- Alter und Geschlecht
- Injury Severity Score (ISS) [30,31]
- Hannover Polytrauma Schlüssel (PTS) [32-34]
- Revised Injury Severity Classification (RISC) [157]
- zu erfüllende Kriterien eines SIRS/Sepsis mit septischen Fokus (ACCP/SCCM Consensus Conference Committee)
- Organversagen / Multiorganversagen
- Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II) [158]
- Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II (APACHE II) [159]
- Sepsis related Organ Failure Assessment (SOFA) [160]

Oben genannte Daten wurden prospektiv sowohl computerbasiert (SAP, COPRA) als auch durch Auswertung der Patientenakten akquiriert und mittels oben genannter, publizierter Formeln berechnet.

2.5 ELISA

2.5.1 sIL-6R & PTX3

Für die Quantifizierung von sIL-6R- und PTX3-Serumkonzentrationen wurden Enzym-Immunoassays mit rekombinanten Antikörpern (ELISA) verwendet.

Die Konzentrationen des löslichen Interleukin-6-Rezeptors (sIL-6R) wurde mit einer Verdünnung von 1:50 mit Quantikine[®] Human IL-6sR Immunoassay DR600, R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, UK und Pentraxin 3 (PTX3) mittels Quantikine[®] Human Pentraxin 3/ TSG-14 Immunoassay DPTX30; R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, UK bestimmt.

Die Validierung der ELISA wurde vor den Experimenten mittels Spike-/Recovery-Test vollzogen. Dieser Test ist obligat vor jeder Testreihe, da einige Komponenten des menschlichen Plasmas, vor allem Moleküle des Komplementsystems oder der Rheumafaktor die Messgenauigkeit des ELISA reduzieren können.

Beim Spike-Test wurde zunächst eine 10-fach über dem höchsten Standard konzentrierte Lösung (Spike) des zu messenden Proteins hergestellt. Danach musste mit der Spike-Lösung in einer 1:1-Verdünnung jeweils ein Proben-Spike und ein Kontroll-Spike hergestellt werden. In serieller Verdünnung (1:2, danach 1:4, danach 1:8, usw.) wurden dann Proben-Spike, Kontroll-Spike und Nicht-Spike-Probe (native Probe) auf die wells der ELISA-Platte aufgetragen und nach dem jeweiligen Protokoll gemessen. Die „Recovery“ (gemessene Konzentration des Probe-Spike) wurde im Anschluss folgendermaßen berechnet:

Recovery: $[(\text{Konzentration Proben-Spike} - \text{Konzentration native Probe}) / \text{Konzentration mit der die Spike-Probe hergestellt wurde}]$

Die Recovery von Proben-Spike und Kontroll-Spike sollte im Bereich von 80-120% liegen. In unserer Versuchsreihe lag die Recovery bei beiden ELISA bei 100%.

Verwendete Materialien der einzelnen ELISA-Kits:

sIL-6R [161]:

- sIL-6R-Mikrotiterplatte (insgesamt 96 wells, mit monoklonalem Antikörper gegen sIL-6R beschichtet)
- sIL-6R-Konjugat (21 ml polyklonaler Antikörper gegen sIL-6R, konjugiert mit Horseradishperoxidase)
- sIL-6R-Standard (10 ng rekombinanter humaner sIL-6R, lyophilisiert, proteingepuffert)
- Assay Diluent RD 1-1 (11 ml proteingepufferte Lösung) → Verdünnungspuffer
- Calibrator Diluent RD5C Concentrate (5X) (21 ml proteingepufferte Lösung) → Kalibrierungs-/ Verdünnungslösung
- Waschpuffer (21 ml 25-fach konzentrierte, gepufferte Tensidlösung)
- Color Reagent A (12,5 ml stabilisiertes Wasserstoffperoxid)
- Color Reagent B (12,5 ml stabilisiertes Tetramethylbenzidin)
- Stopp-Lösung (6 ml 2N-Schwefelsäure)
- Klebestreifen zum Abkleben der Mikrotiterplatte

PTX3 [162]:

- Streptavidin-Mikrotiterplatte (96 wells beschichtet mit Streptavidin)
- PTX3-biotinylierter Antikörper (21 ml monoklonaler Antikörper gegen PTX3, konjugiert mit Biotin)
- PTX3-Konjugat (21 ml monoklonaler Antikörper gegen PTX3, konjugiert mit Horseradishperoxidase)
- PTX3-Standard (200 ng rekombinanter humanes PTX3, lyophilisiert, proteingepuffert)
- Pretreatment D (1 ml Pretreatment-Lösung)
- Assay Diluent RD1-56 (17 ml proteingepufferte Lösung) → Verdünnungspuffer
- Calibrator Diluent RD5-24 (21 ml proteingepufferte Lösung) → Kalibrierungs-/ Verdünnungslösung
- Waschpuffer (42 ml 25-fach konzentrierte, gepufferte Tensidlösung)
- Color Reagent A (12,5 ml stabilisiertes Wasserstoffperoxid)

- Color Reagent B (12,5 ml stabilisiertes Tetramethylbenzidin)
- Stopp-Lösung (6 ml 2N-Schwefelsäure)
- Klebestreifen zum Abkleben der Mikrotiterplatte

Durch die kommerziell erhältlichen Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) ist es möglich innerhalb einer Zeitspanne von ca. 5-8h die Konzentrationen von sIL-6R und PTX3 zu erhalten.

Die von uns benutzten, oben beschriebenen ELISA funktionieren in der sogenannten Sandwich-ELISA-Technik. In den wells der Mikrotiterplatte ist ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen das zu untersuchende Protein (PTX3 oder sIL-6R) kovalent gebunden. Zuerst werden Standards, im Falle von sIL-6R, in den Verdünnungen von 2000 pg/ml bis hin zu 31,2 pg/ml, und im Falle von PTX3, in den Verdünnungen von 20 ng/ml bis hin zu 0,31 ng/ml, sowie eine Negativkontrolle (Blank) in die ersten wells in 3-fach-Bestimmung pipettiert. Daraufhin werden die zuvor verdünnten Serumproben, ebenfalls jeweils in 3-fach-Bestimmung in die einzelnen wells pipettiert (Abb. 4).

Im Falle des PTX3-ELISAs wird als erstes der PTX3-biotinylierte Antikörper auf die Mikrotiterplatte aufgebracht und 15-60 Minuten inkubiert. Während dieser Zeit werden sowohl die Standards, als auch die Proben jeweils mit dem PTX3-Pretreatment vermischt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std	Std	Std	1044	1044	1044	1045	1045	1045	1046	1046	1046
	2000	2000	2000	0h	0h	0h	24h	24h	24h	72h	72h	72h
B	Std	Std	Std	1044	1044	1044	1045	1045	1045	1046	1046	1046
	1000	1000	1000	24h	24h	24h	48h	48h	48h	96h	96h	96h
C	Std	Std	Std	1044	1044	1044	1045	1045	1045	1046	1046	1046
	500	500	500	48h	48h	48h	72h	72h	72h	10d	10d	10d
D	Std	Std	Std	1044	1044	1044	1045	1045	1045	1047	1047	1047
	250	250	250	72h	72h	72h	96h	96h	96h	0h	0h	0h
E	Std	Std	Std	1044	1044	1044	1045	1045	1045	1047	1047	1047
	125	125	125	96h	96h	96h	10d	10d	10d	24h	24h	24h
F	Std	Std	Std	1044	1044	1044	1046	1046	1046	1047	1047	1047
	62,5	62,5	62,5	120h	120h	120h	0h	0h	0h	48h	48h	48h
G	Std	Std	Std	1044	1044	1044	1046	1046	1046	1047	1047	1047
	31,25	31,25	31,25	10d	10d	10d	24h	24h	24h	72h	72h	72h
H	Blank	Blank	Blank	1045	1045	1045	1046	1046	1046	1047	1047	1047
				6h	6h	6h	48h	48h	48h	96h	96h	96h

Abb. 4: Exemplarische Plattenbelegung für sIL-6R-ELISA: Zu sehen sind die 3-fach-Bestimmung der Standards, des Blank und der Patientenproben (10xx= Probandennummer, x h z.B. 48h = 48h nach Klinikaufnahme).

Beim Vorhandensein eines löslichen Rezeptors in der Probe oder dem Standard, bindet dieser sich an den spezifischen monoklonalen Antikörper in der Mikrotiterplatte. Als nächstes werden alle ungebundenen Stoffe durch mehrere Waschschriffe entfernt. Ein enzymmarkierter polyklonaler Antikörper wird daraufhin hinzu pipettiert, sodass dieser sich mit dem zu untersuchenden Protein verbindet. Nach diesem Schritt werden

wiederum mehrere Waschschriffe vorgenommen, um Antikörper welche sich nicht gebunden haben, abzuwaschen. Die Substrate Solution wird danach zu den Proben und den Standards gegeben, um eine Färbung der Lösung in den wells proportional zur Konzentration der Proteine zu induzieren. 20 Minuten später wird eine Stopp-Lösung hinzu pipettiert, um die Färbereaktion der Substrate Solution zu beenden [162]. Die gefärbte Mikrotiterplatte muss danach innerhalb von 30 Minuten im Photometer (Microplate-Reader, Fa. Bio-Rad) gegen 450 nm und als Korrektur gegen 570 nm ausgelesen werden. Die Auswertung der vom Microplate-Reader erzeugten Daten erfolgte mit einer speziell dafür zugelassenen Software (Microplate-Manager 5.2, Fa. Bio-Rad).

Definierte Konzentrationen des löslichen Rezeptors werden mit den gemessenen Konzentrationen der Proben anhand einer Standardkurve verglichen (Abb. 5.1). Die Auswertung geschah bei einer Wellenlänge von 450 nm und jeweils einem Korrekturfilter von 540 nm und 570 nm. Die Standardproben, welche in die ersten wells der ELISA pipettiert wurden, dienen als Referenz für die gemessene Extinktion der Proben im Photometer (Abb. 5.2).

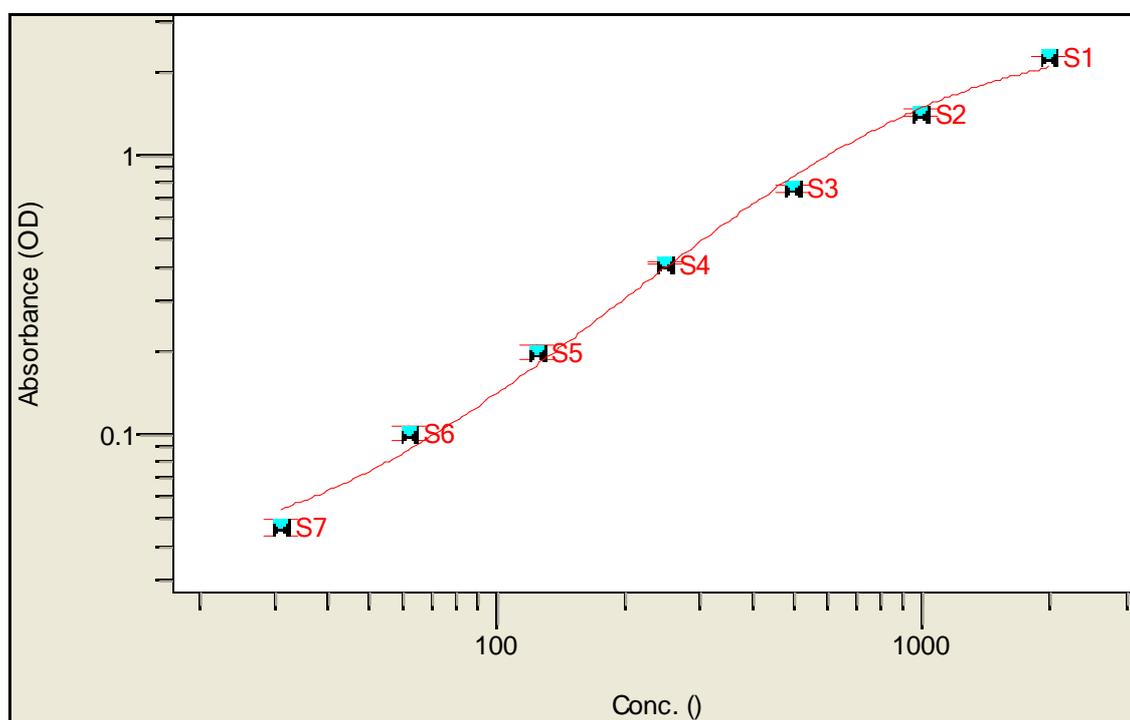


Abb. 5.1: Beispiel einer Standardkurve des sIL-6R-ELISA: Zu sehen sind nur minimal Abweichungen der einzelnen Standards gegenüber dem Graphen. x-Achse: Konzentration (log.), y-Achse: Absorption, S1-S7: gemessene Standards S1-S7.

Probe	Absorbance	Konzentrat. [pg/ml]	Verdünnungsfaktor
Standard 1	2,29	2000	
Standard 2	1,438	1000	1:2
Standard 3	0,7735	500	1:4
Standard 4	0,417	250	1:8
Standard 5	0,2005	125	1:16
Standard 6	0,1025	62,5	1:32
Standard 7	0,047	31,25	1:64

Abb. 5.2: Beispiel einer Absorption (Absorbance) mit den berechneten Konzentrationen der korrespondierenden Standardkurve.

Die unbekannt Konzentrationen der Proteine bzw. löslichen Rezeptoren wurden mit Hilfe des Analyseprogrammes (MicroPlate-Manager Vers. 5.2, Fa. Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) im „unknown concentration report“ erstellt. Um die Verdünnung heraus zu rechnen mussten die unbekannt Konzentrationen jeweils mit dem dazugehörigen Verdünnungsfaktor multipliziert werden (Abb. 6). Durch diesen letzten Schritt sind die finalen Konzentrationen berechnet wurden, welche als Grundlage zur weiteren statistischen Auswertung dienen.

Probe	Absorbance	Konzentrat. [pg/ml]	Verdünnungsfaktor
X1	0,894	528,202	01:50
X2	0,693	409,859	01:50
X3	0,69	408,167	01:50
X4	0,783	461,528	01:50
X5	0,7555	445,541	01:50
X6	0,8815	520,503	01:50
X7	0,7635	450,172	01:50
X8	0,855	504,351	01:50
X9	0,8875	524,192	01:50
X10	0,751	442,943	01:50
X11	0,691	408,731	01:50
X12	0,596	355,934	01:50
X13	0,9185	543,446	01:50
X14	0,709	418,914	01:50
X15	0,732	432,024	01:50
X16	0,7035	415,795	01:50
X17	0,7125	420,901	01:50
X18	0,835	492,306	01:50
X19	0,96	569,765	01:50
X20	0,4965	301,827	01:50

Abb. 6: Beispiel eines „unknown concentration report“ von sIL-6R: Absorption, Konzentrationen und mit einzubeziehender Verdünnungsfaktor der einzelnen Proben (X1-X20).

2.6 Statistik

Die Datenerhebung- und verarbeitung erfolgte durch Microsoft Excel[®] (© Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA; letztes installiertes Update 14.3.4) und die statistische Auswertung mittels IBM[®] SPSS[®] Statistics Version 20.0 (© IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Normalverteilte Daten wurden mittels Mittelwerten und Standardabweichungen (\pm), nicht-normalverteilte mittels Median und Inter-Quartilen-Abstand (IQR) dargestellt. Die deskriptive Statistik nicht-normalverteilter Daten wurde anhand des Mann-Whitney-U-Test für unabhängige und Wilcoxon-Test für abhängige Variablen (Kinetik sIL-6R, PTX3 und TSR) durchgeführt [163]. Der Qi-Quadrat Test wurde für nominale Daten angewandt. Dabei wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

Weiterhin wurde eine Korrelation der sIL-6R und PTX3 Serumkonzentration mit der anatomischen Verletzungsschwere durchgeführt und der Korrelationskoeffizient R^2 angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Charakteristika

Das Studienkollektiv bestand insgesamt aus 74 Probanden.

Gruppe I (Polytrauma-Gruppe) bestand aus 58 schwer polytraumatisierten Patienten. Die anatomische Verletzungsschwere wurde durch den ISS (43 ± 14 Punkten) und PTS-Score (52 ± 19 Punkten) erhoben. Die physiologische Verletzung wurde anhand etablierter intensivmedizinischer Scores nach 24h eingeschätzt: SOFA 8 ± 4 Punkte, SAPS II 39 ± 18 Punkte und APACHE II 20 ± 9 Punkte. Die Mortalitätsrate betrug 29%. Aus dieser Gruppe erlitten 46% eine Form von Organversagen (23% Nieren- oder ZNS-Versagen, 42% Multiorganversagen).

In Gruppe II (Trauma-Gruppe) wurden 6 leichter verletzte Patienten eingeschlossen. Der mittlere ISS betrug $9,5 \pm 2,6$ Punkte, der mittlere PTS $18,8 \pm 11,1$ Punkte und das mittlere Alter $53,2 \pm 28,7$ Jahre. 33,3% der Patienten waren Männer.

Alle Probanden aus Gruppe III waren gesunde Erwachsene, die keine Infektion jeglicher Art in den letzten 4 Wochen durchgemacht hatten. 10 Probanden konnten in diese Vergleichsgruppe eingeschlossen werden.

Das mittlere Alter betrug hier $37 \pm 18,2$ Jahre. 60% der Probanden waren Männer (Tab. 1).

	N=	Alter (Jahre)	Geschlecht (m/w in %)	ISS / PTS (Punkte)
Gruppe I	58	$48 \pm 19,3$	63,8 / 36,2	$43 \pm 14 /$ 52 ± 19
Gruppe II	6	$53,2 \pm 28,7$	33,3 / 66,7	$9,5 \pm 2,6 /$ $18,8 \pm 11,1$
Gruppe III	10	$37 \pm 18,2$	60 / 40	0 / 0

Tab. 1: Charakteristika der Studienpopulation: Anzahl, Durchschnittsalter, Geschlecht und Verletzungsschwere der Patienten in den unterschiedlichen Gruppen. Sehr hohe Verletzungsschwere in Gruppe I. Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.2 IL-6

In der Polytrauma-Gruppe (Gruppe I) wurden die maximalen IL-6- Serumspiegel 6h nach Aufnahme detektiert. In dieser Gruppe waren die IL-6-Werte zu allen Zeitpunkten erhöht (Abb. 7)

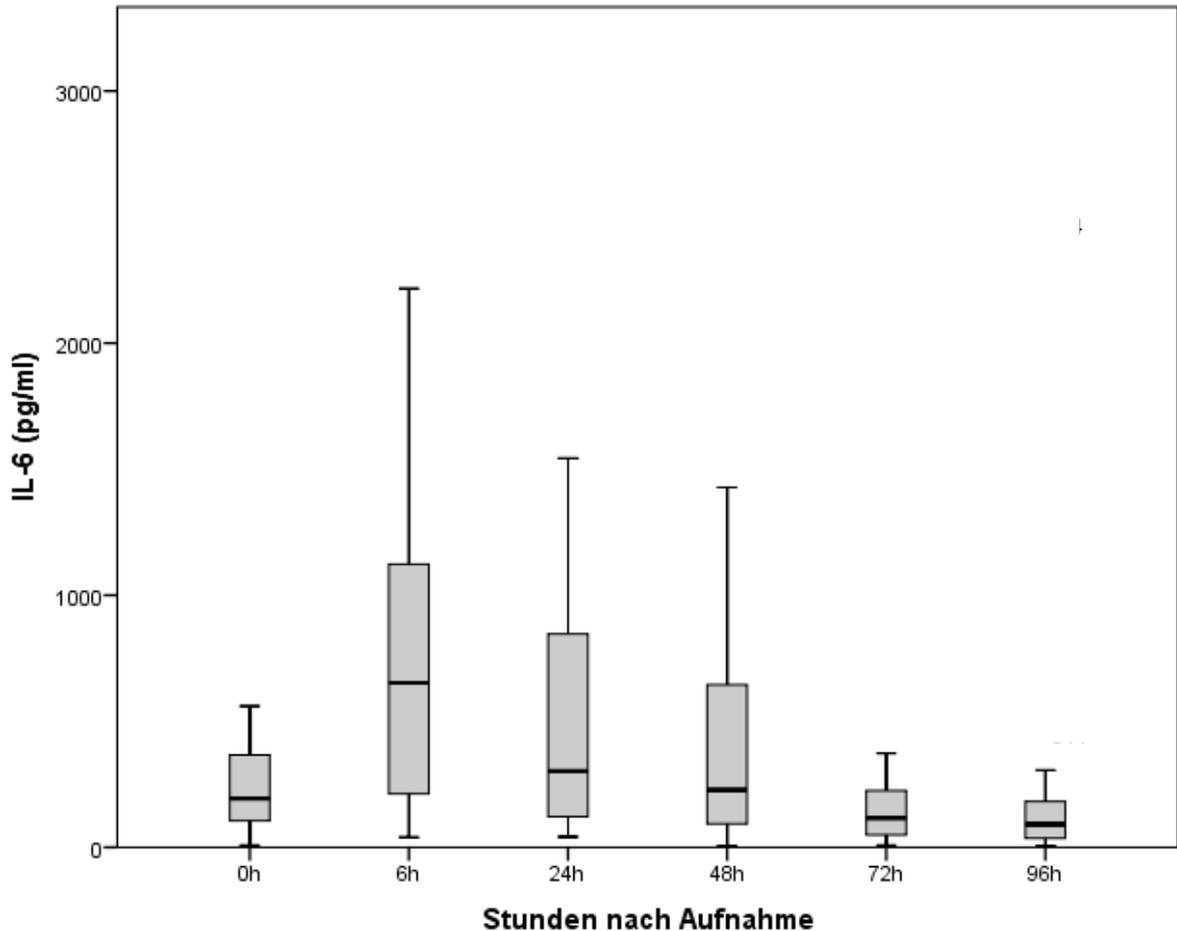


Abb. 7: Kinetik der IL-6 Serumkonzentrationen zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten in der Polytrauma-Gruppe (Gruppe I). Maximale Serumspiegel 6h nach Aufnahme des Patienten [48].

Im Gegensatz dazu konnten in der Trauma-Gruppe (Gruppe II) erwartungsgemäß durchgehend niedrigere Serumkonzentrationen von IL-6 detektiert werden. Der maximale Serumspiegel wurde 24h nach Aufnahme erreicht (Abb. 8 und 9).

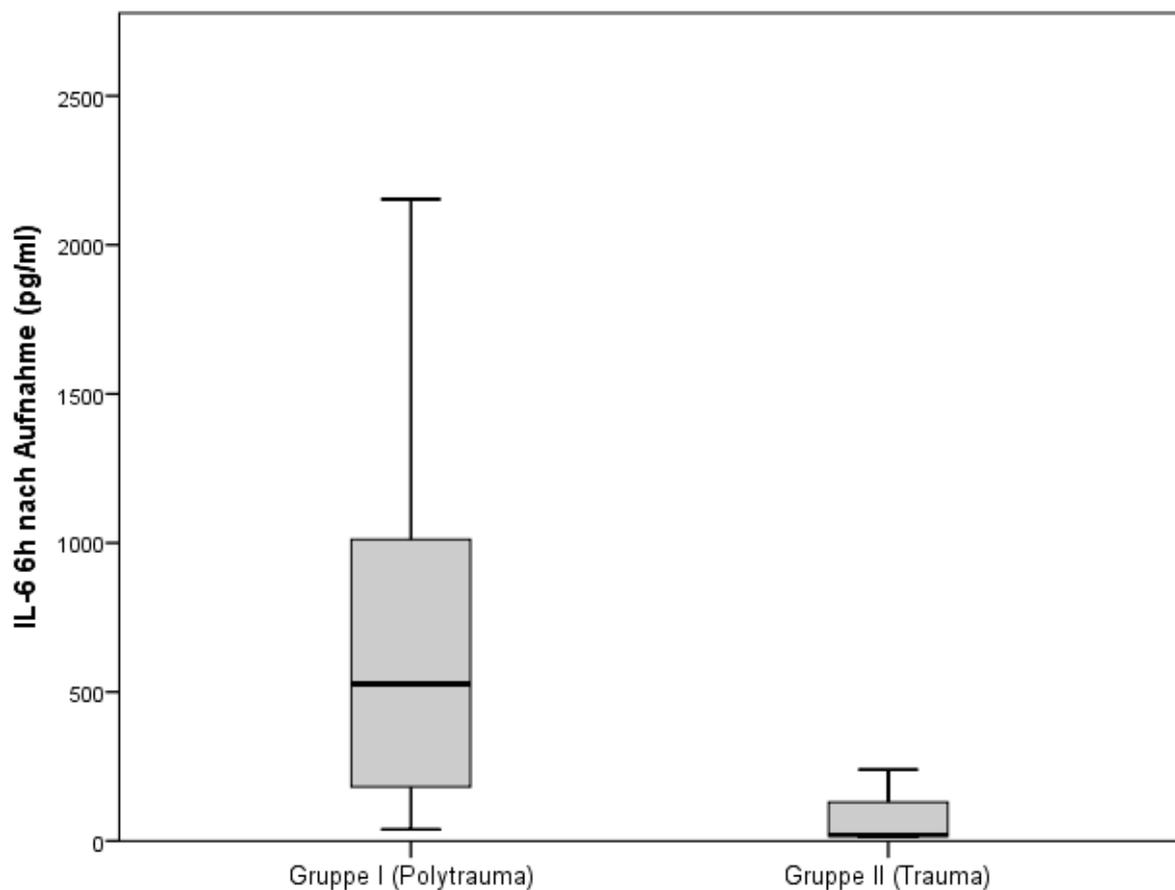


Abb. 8: IL-6-Konzentrationen 6h nach Klinikaufnahme in den Gruppen I und II. Hier ist eine deutlich höhere Konzentration von IL-6 in der Polytraumagruppe (Gruppe I) und der größte Unterschied bezüglich der unterschiedlichen Messzeitpunkte ersichtlich.

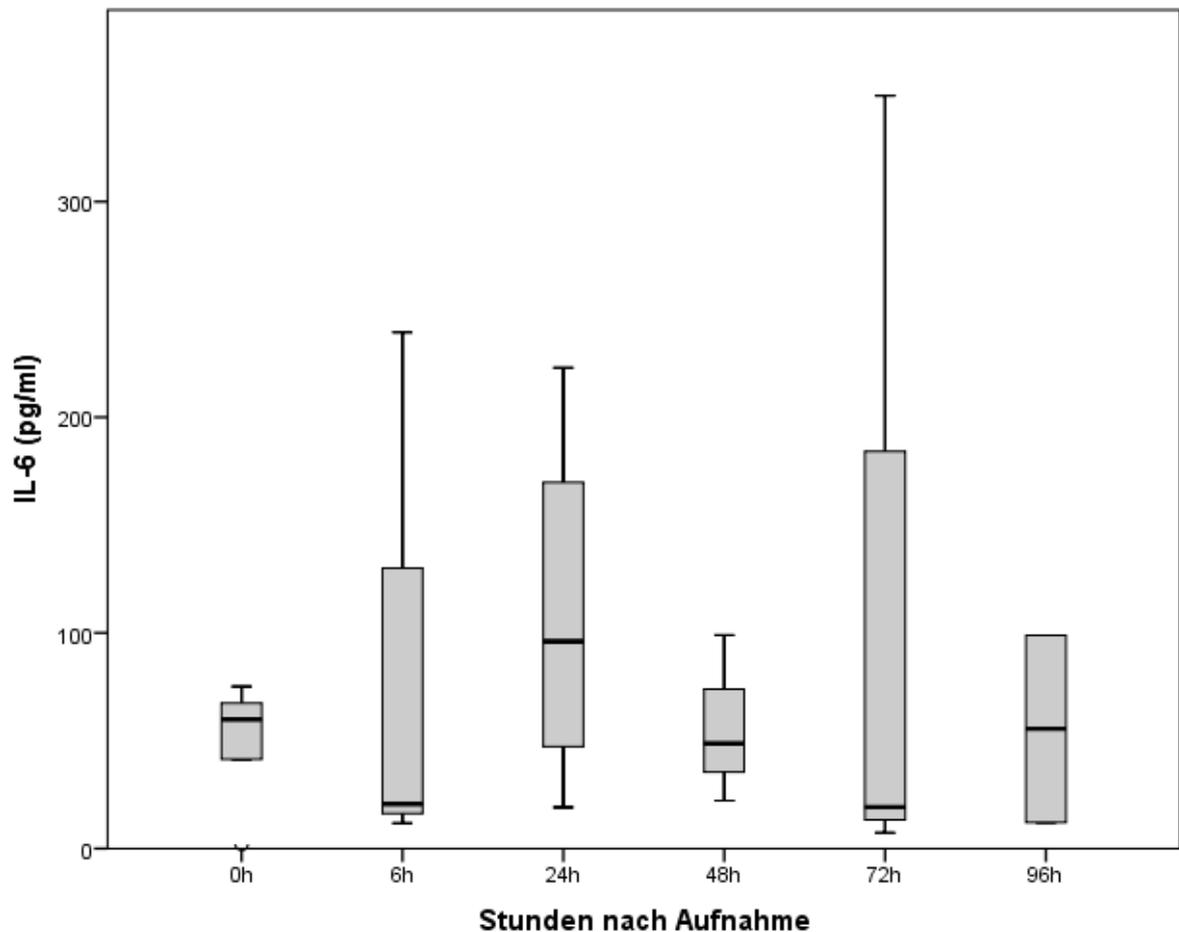


Abb. 9: Kinetik der IL-6 Konzentrationen zu den verschiedenen Messzeitpunkten in der Trauma-Gruppe (Gruppe II). Maximale Serumspiegel nach 24h nach Aufnahme des Patienten.

Erhöhte IL-6-Konzentrationen 24h und 48h nach Klinikaufnahme waren signifikant ($p = 0,03 / 0,02$) mit dem Auftreten eines Multiorganversagens in Gruppe I (Polytraumagruppe) assoziiert (Abb. 10 und 11).

Insgesamt erlitten in Gruppe I 42% und in Gruppe II 0% der Patienten ein Multiorganversagen.

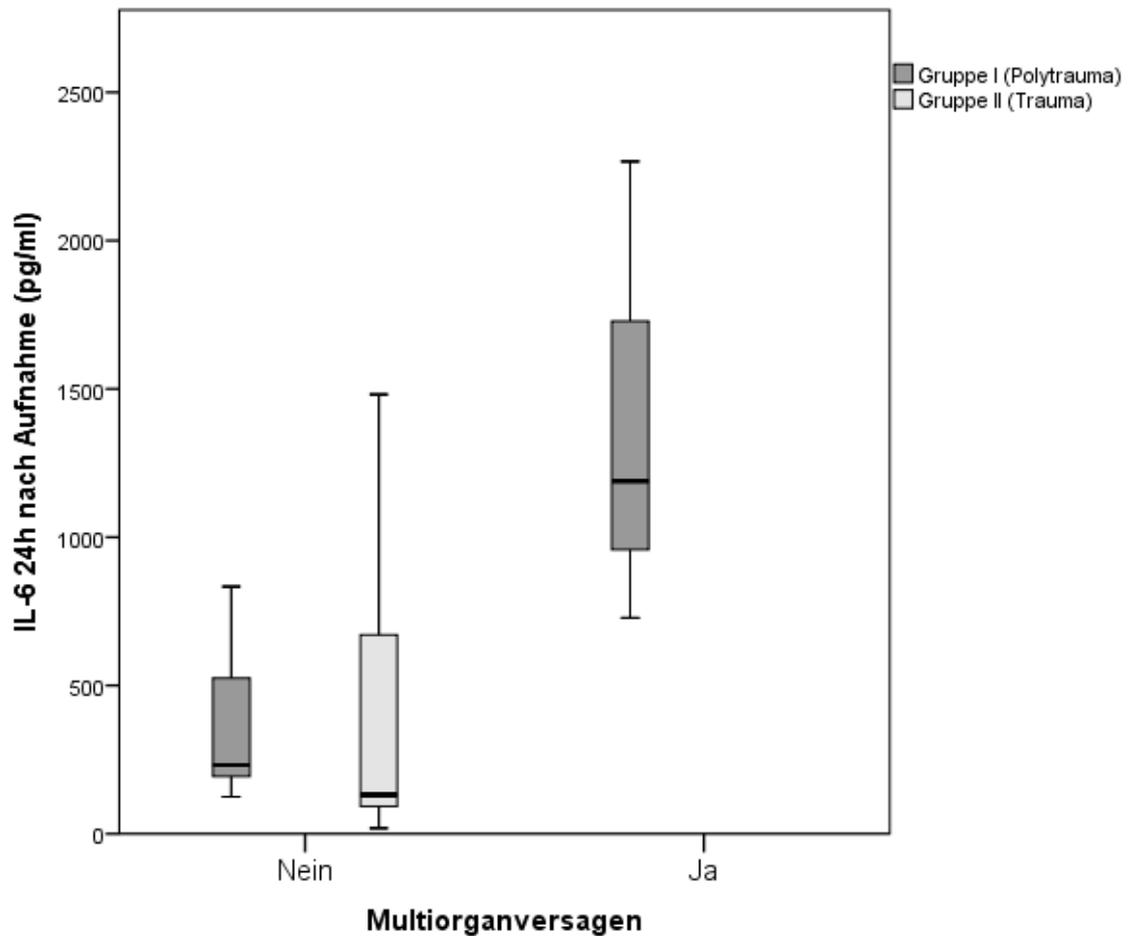


Abb. 10: IL-6-Konzentrationen 24h nach Klinikaufnahme der Gruppen I und II im Vergleich zum Auftreten eines Multiorganversagens. Signifikant höhere Inzidenz des Multiorganversagens in der Polytraumagruppe nach 24h, $p = 0,03$ (Gruppe I: 42%, Gruppe II: 0%).

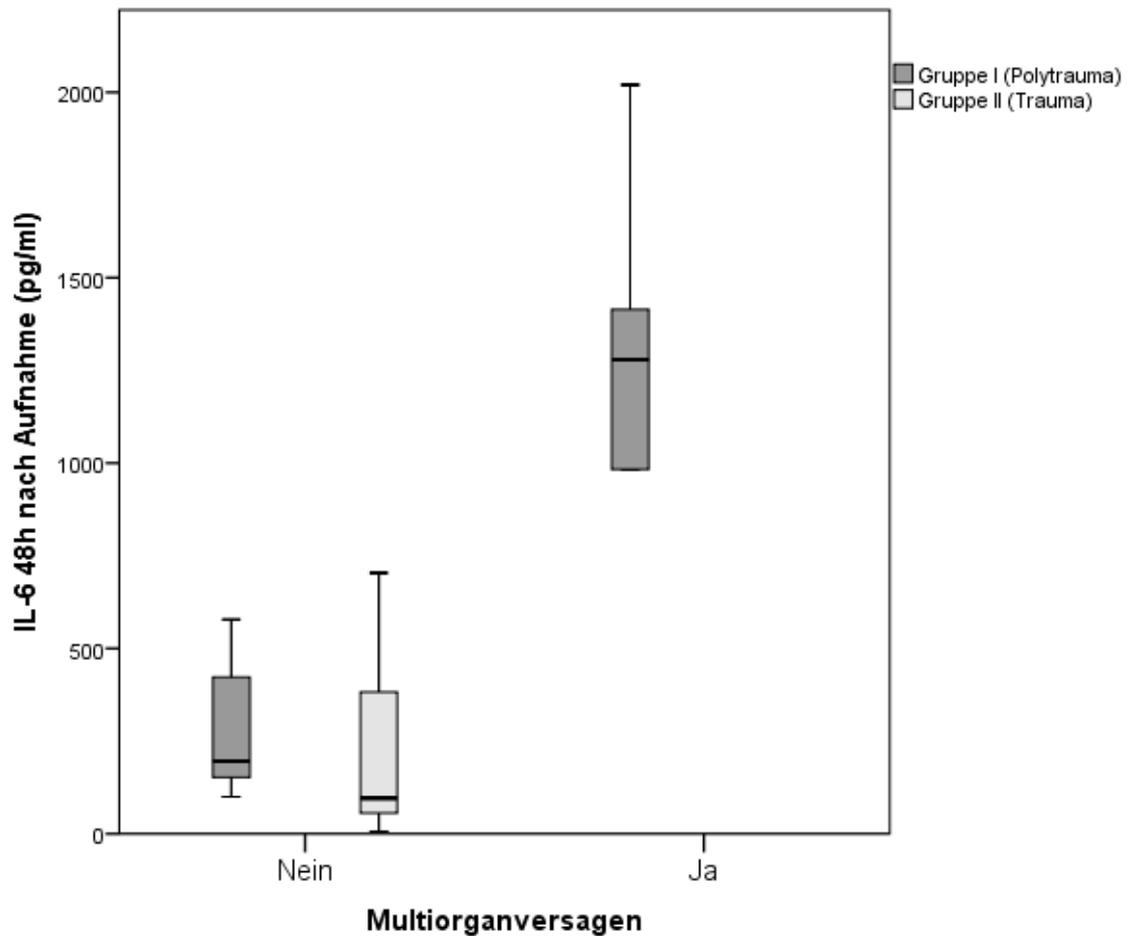


Abb. 11: IL-6-Konzentrationen 48h nach Klinikaufnahme der Gruppen I und II im Vergleich zum Auftreten eines Multiorganversagens. Signifikant höhere Inzidenz des Multiorganversagens in der Polytraumagruppe nach 48h, $p = 0,02$ (Gruppe I: 42%, Gruppe II: 0%).

3.3 sIL-6R

In Gruppe I (Polytrauma-Gruppe) waren die Messwerte für sIL-6R direkt nach Aufnahme niedriger, als in Gruppe II und Gruppe III (Gesunde → 80 ng/ml). Die sIL-6R-Werte in der Polytrauma-Gruppe blieben während des ganzen Untersuchungszeitraumes auf einem niedrigeren Niveau und ohne größere Abweichungen (Abb. 12, 13) verglichen mit den sIL-6R-Messwerten der Traumagruppe und Gruppe der gesunden Probanden. Die Serumkonzentrationen von sIL-6R waren im Vergleich zum Normalwert in Gruppe II immer noch erniedrigt, jedoch verglichen mit den Konzentrationen in Gruppe I leicht erhöht.

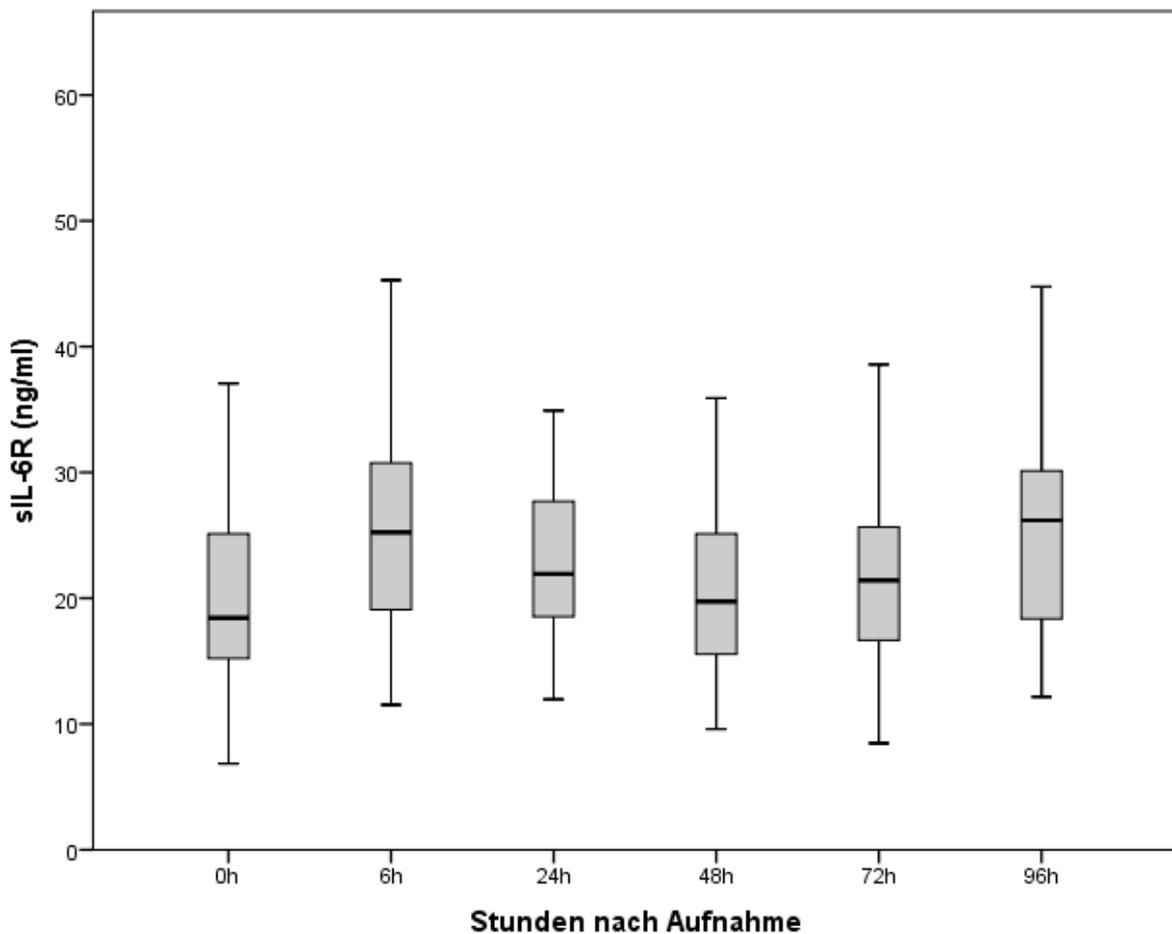


Abb. 12: Kinetik der sIL-6R-Serumkonzentrationen der Gruppe I (Polytrauma). Im Vergleich zu publizierten Normwerten zeigen sich niedrige sIL-6R-Konzentrationen während des gesamten Untersuchungszeitraumes [48].

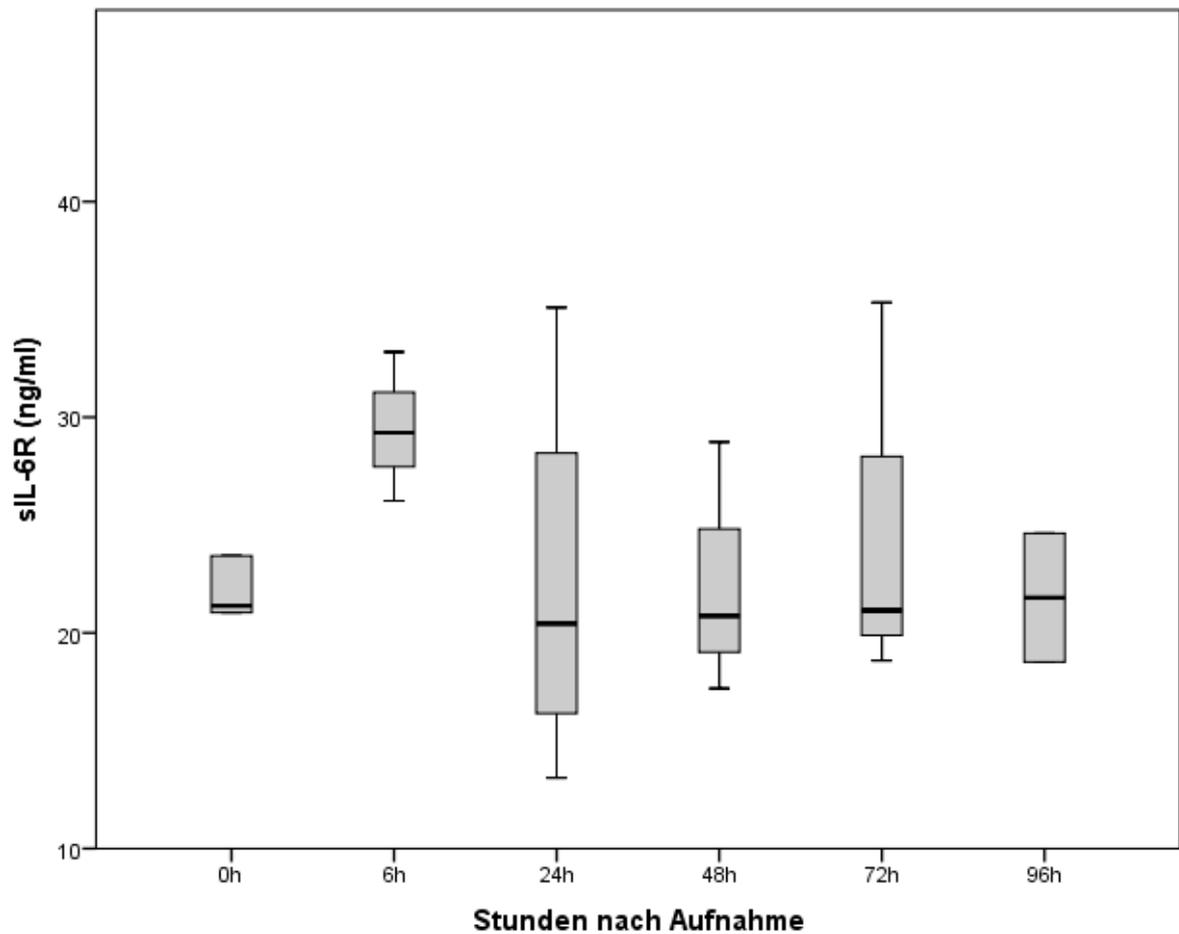


Abb. 13: Kinetik der sIL-6R-Serumkonzentrationen Gruppe II (Trauma). Hier zeigen sich im Vergleich zur Polytrauma-Gruppe (Gruppe I) höhere sIL-6R-Konzentrationen nach Klinikaufnahme mit Maximalwerten 6h nach Aufnahme.

3.4 PTX3

Die PTX3-Spitzenkonzentrationen wurden in der Polytraumagruppe zwischen 24 und 48h nach Aufnahme nachgewiesen. In Gruppe I zeigten sich über den gesamten Untersuchungszeitraum erhöhte Serumkonzentrationen mit einem starken Anstieg nach 24h. Erhöhte PTX3-Werte 24 und 48h in Gruppe I konnten in Gruppe II und III jeweils nicht nachgewiesen werden [48]. (Abb. 14, 15)

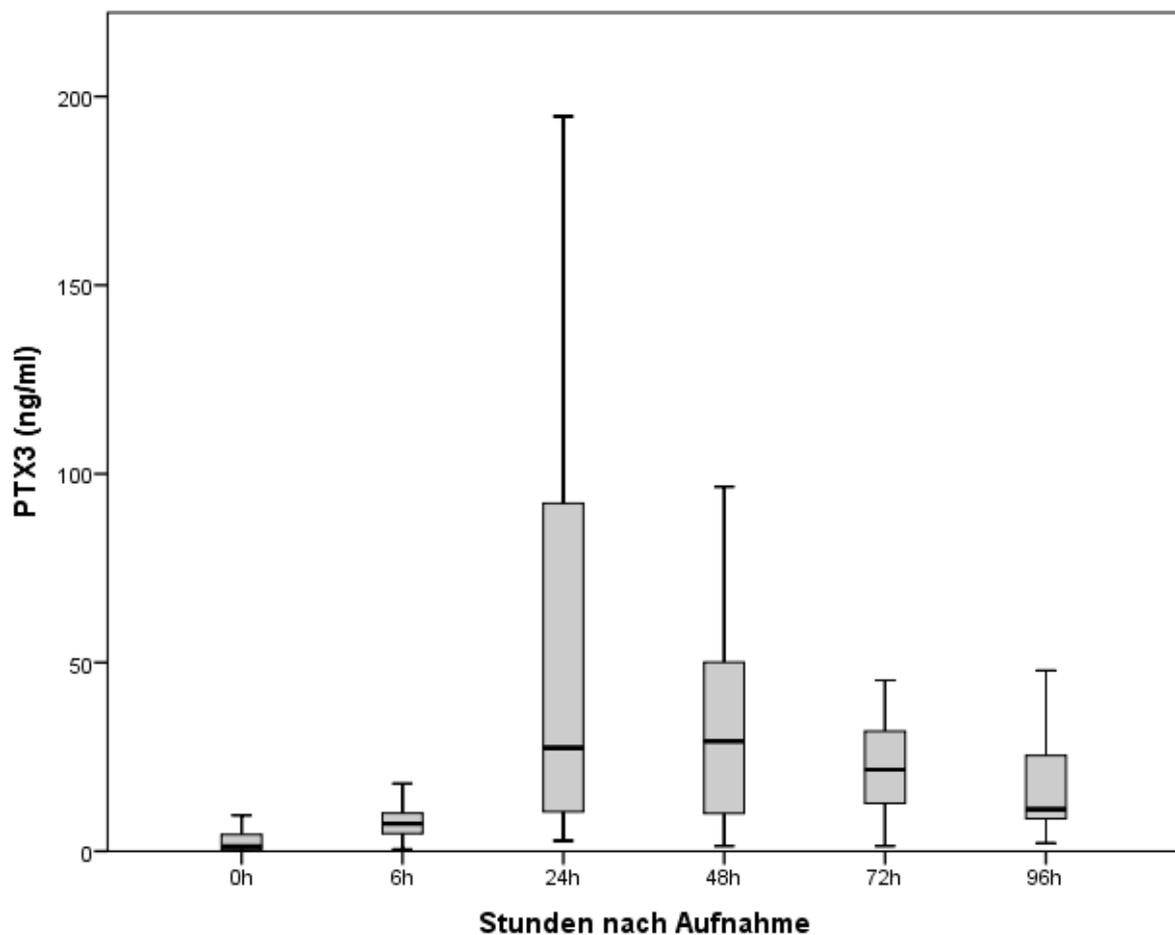


Abb. 14: Kinetik der PTX3-Serumkonzentrationen zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten in der Polytraumagruppe (Gruppe I). Maximalwerte nach 24h bzw. 48h nach Klinikaufnahme [48].

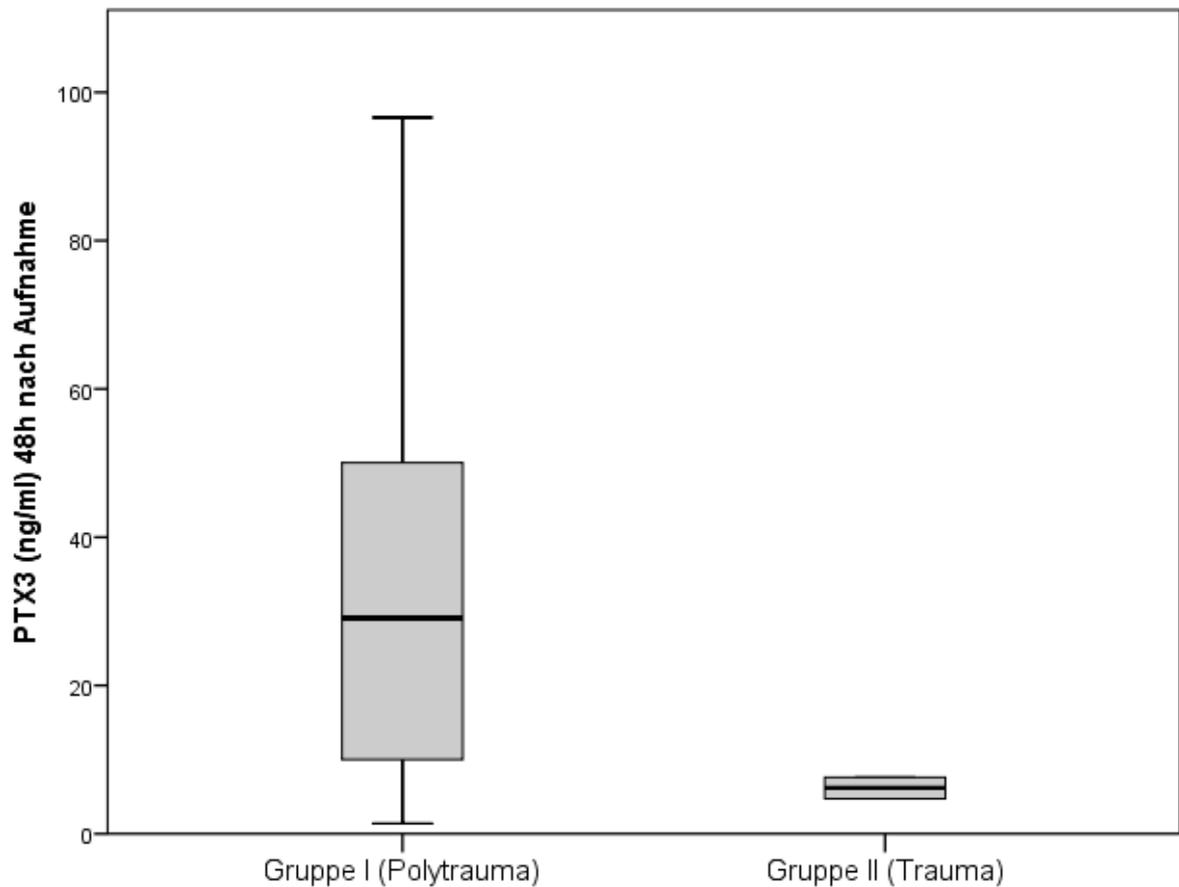


Abb. 15: PTX3-Konzentrationen 48h nach Klinikaufnahme in Gruppe I und II. Die PTX3-Serumkonzentrationen liegen in der Polytraumagruppe (Gruppe I) deutlich höher.

Höhere PTX3-Serumkonzentrationen 24h nach Trauma korrelierten signifikant mit einer erhöhten Mortalität, welche durch die Revised Injury Severity Classification (RISC) errechnet wurde ($R^2 = 0,542$; $p < 0,001$), (Abb. 16).

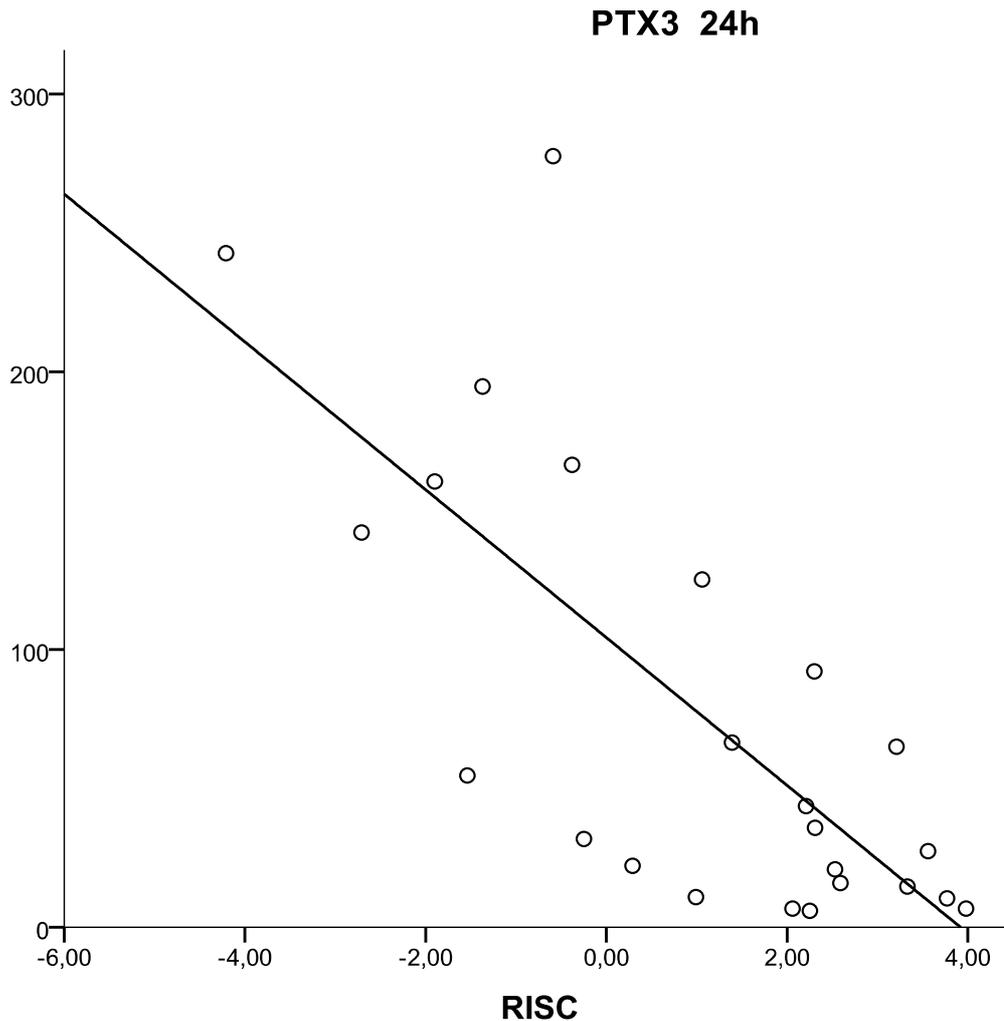


Abb. 16: Korrelation der PTX3-Serumkonzentrationen nach 24h und der errechneten Überlebenswahrscheinlichkeit anhand des RISC-Scores: Signifikante Korrelation der Höhe der PTX3-Serumkonzentrationen nach 24h mit Anstieg der Mortalität; $R^2 = 0,542$; $p < 0,001$; Linie: lineare Korrelation, Punkte: gemessene Daten.

Weiterhin zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang der Höhe der PTX3-Serumkonzentration bei Aufnahme (0h) und der anatomischen Verletzungsschwere des Patienten gemessen anhand des ISS- und PTS-Scores ($p < 0,001$).

3.5 PCT, CRP und Leukozytenanzahl

Die in der klinischen Routine etablierten inflammatorischen Parameter CRP, PCT und die Leukozytenanzahl sind Standardverfahren zum Monitoring diverser Entzündungen, speziell in der Intensivmedizin.

Wohingegen in dieser Studie die Messwerte von IL-6 nach 6h und PTX3 nach 24h nach Aufnahme des Patienten (in Gruppe I) ihren Maximalwert erreichten, konnte nachgewiesen werden, dass sowohl CRP als auch PCT ihre Maximalwerte erst später (48-72h nach Klinikaufnahme) erreichten (Tab. 2). Die Leukozytenanzahl fiel in Gruppe I und II anfangs von einem erhöhten Niveau auf ein konstant bleibendes hochnormales Niveau nach 24h in Gruppe I und ein normales Niveau in Gruppe II (Tab. 3).

Gruppe I	0h	6h	24h	48h	72h	96h
IL-6 (pg/ml)	376 ± 476	1336 ± 2902	642 ± 858	426 ± 462	210 ± 355	203 ± 419
sIL-6R (ng/ml)	21 ± 8	26 ± 9	23 ± 7	20 ± 6	20 ± 6	27 ± 11
PTX3 (ng/ml)	2 ± 3	9 ± 8	61 ± 69	33 ± 24	42 ± 105	44 ± 153
CRP (mg/dl)	0,5 ± 1	0,4 ± 0,4	5 ± 4	20 ± 8	20 ± 10	19 ± 10
PCT (µg/l)	0,4 ± 0,2	0,8 ± 1	5 ± 9	11 ± 25	11 ± 26	7 ± 10
Leukozyten (/nl)	15 ± 9	7 ± 4	9 ± 4	9 ± 5	9 ± 5	9 ± 4

Tab. 2: CRP, PCT und Leukozytenzahl im Vergleich zu IL-6, sIL-6R und PTX3 in Gruppe I. Späterer Konzentrationsanstieg von CRP und PCT im Vergleich zu IL-6 und PTX3. Mittelwerte ± Standardabweichung. [48]

Gruppe II	0h	6h	24h	48h	72h	96h
IL-6 (pg/ml)	49 ± 29	91 ± 129	109 ± 86	57 ± 39	125 ± 194	56 ± 61
sIL-6R (ng/ml)	27 ± 14	29 ± 4	22 ± 9	22 ± 6	25 ± 9	22 ± 4
PTX3 (ng/ml)	5 ± 4	7 ± 0	27 ± 11	6 ± 2	5 ± 3	6 ± 2
CRP (mg/dl)	0,2 ± 0,3	0,07	n.g.	0,9	5,9 ± 8,4	2,0 ± 1,7
PCT (µg/l)	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Leukozyten (/nl)	10 ± 4	11 ± 5	9 ± 4	6 ± 1	8 ± 2	6 ± 2

Tab. 3: CRP, PCT und Leukozytenzahl im Vergleich zu IL-6, sIL-6R und PTX3 in Gruppe II. Abfallen der Leukozytenzahl auf ein normales Niveau nach 24h. Mittelwerte ± Standardabweichung, n.g.: nicht gemessen. [48]

Im Gruppenvergleich I und II konnte bei CRP nach 72h eine höhere Konzentration in der Polytraumagruppe (Gruppe I) nachgewiesen werden, wodurch auch noch einmal die hohe Verletzungsschwere der Polytraumapatienten aus Gruppe I verdeutlicht wird (Abb. 17).

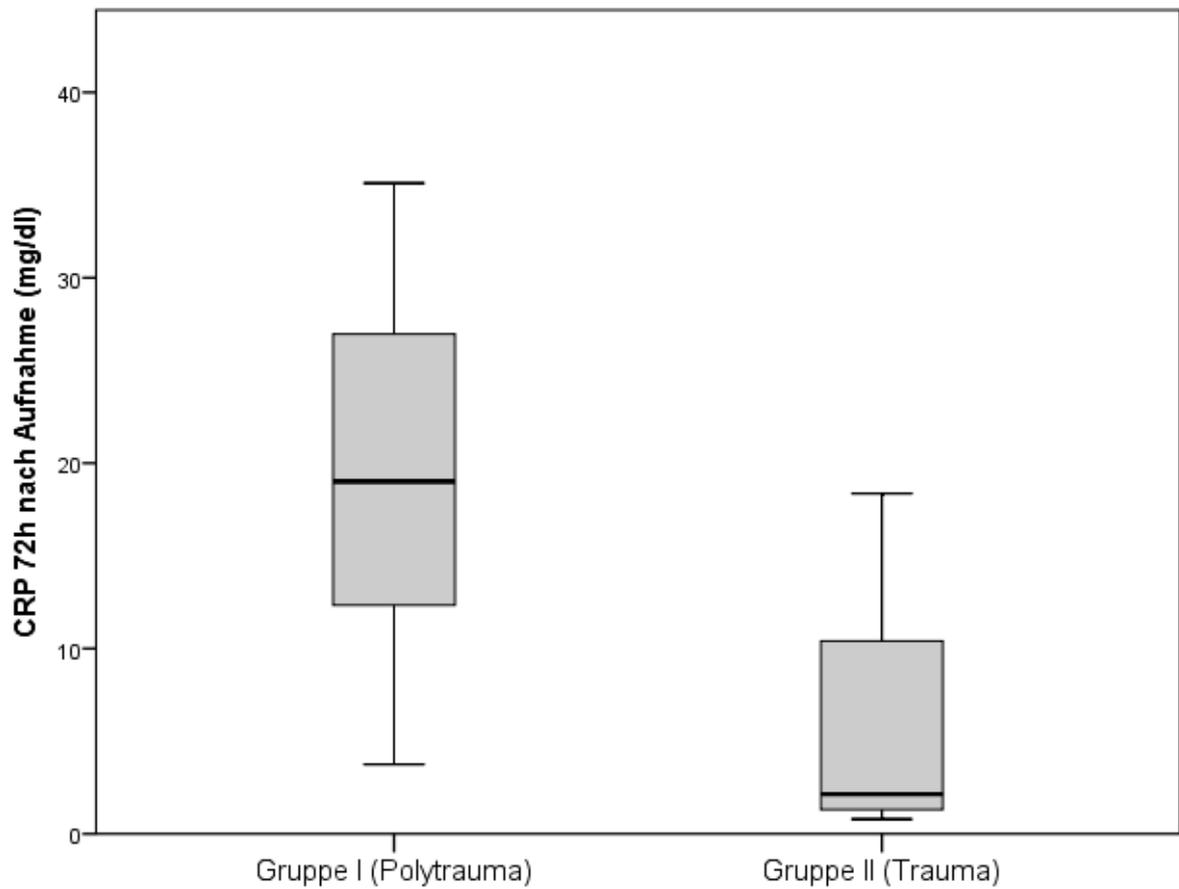


Abb. 17: CRP-Serumkonzentrationen 72h nach Klinikaufnahme in den Gruppen I und II. Deutlich ersichtlich ist hier die höhere CRP-Konzentration in der Gruppe I (Polytraumagruppe).

3.6 Transsignaling-Ratio (TSR)

Um die Abschätzung des Konzentrationsverhältnisses zwischen IL-6 und sIL-6R zu ermöglichen wurden beide Konzentrationen jeweils ins Verhältnis zueinander gesetzt. Die „Transsignaling-Ratio“ (TSR) wurde aus dem Quotient von IL-6 (ng/ml) und sIL-6R (ng/ml) für jeden gemessenen Zeitpunkt berechnet. Dieser Quotient spiegelt die Aktivität der Zytokine im Sinne eines Zusammenschlusses beider Moleküle bzw. konsekutive gp130-Aktivierung wider.

Der erstmals eingeführte Begriff der Transsignaling-Ratio ermöglicht eine bessere Abschätzung des posttraumatischen IL-6-Transsignalings als die Werte von IL-6 und sIL-6R einzeln.

In Gruppe I (Polytraumagruppe) hatte die Transsignaling-Ratio (TSR) ihren Maximalwert nach 6h erreicht. Dieser Maximalwert fiel zu den weiteren untersuchten Zeitpunkten dann konstant ab (Abb. 18)

Im Vergleich hierzu konnte in Gruppe II nachgewiesen werden, dass die TSR durchgehend niedriger ausfiel. Demnach war in der Trauma-Gruppe das Transsignaling im Rahmen der posttraumatischen Entzündungssituation weitaus weniger ausgeprägt, als in der Gruppe I (Polytraumagruppe) (Abb. 19).

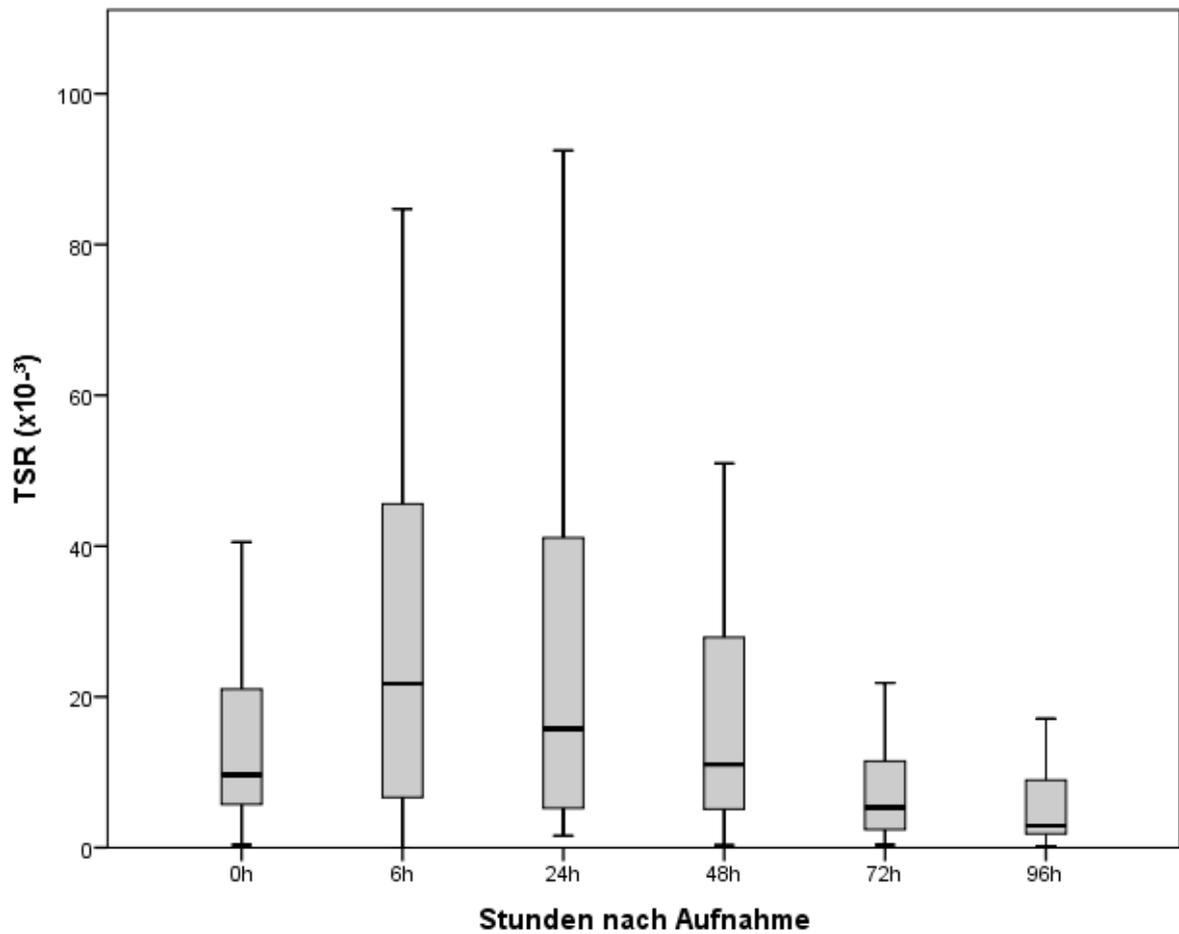


Abb. 18: TSR-Quotienten zu den verschiedenen Messzeitpunkten in Gruppe I (Polytraumagruppe). Deutlicher Anstieg der TSR nach 6h und ein konsekutives Abfallen der TSR im weiteren Verlauf [48].

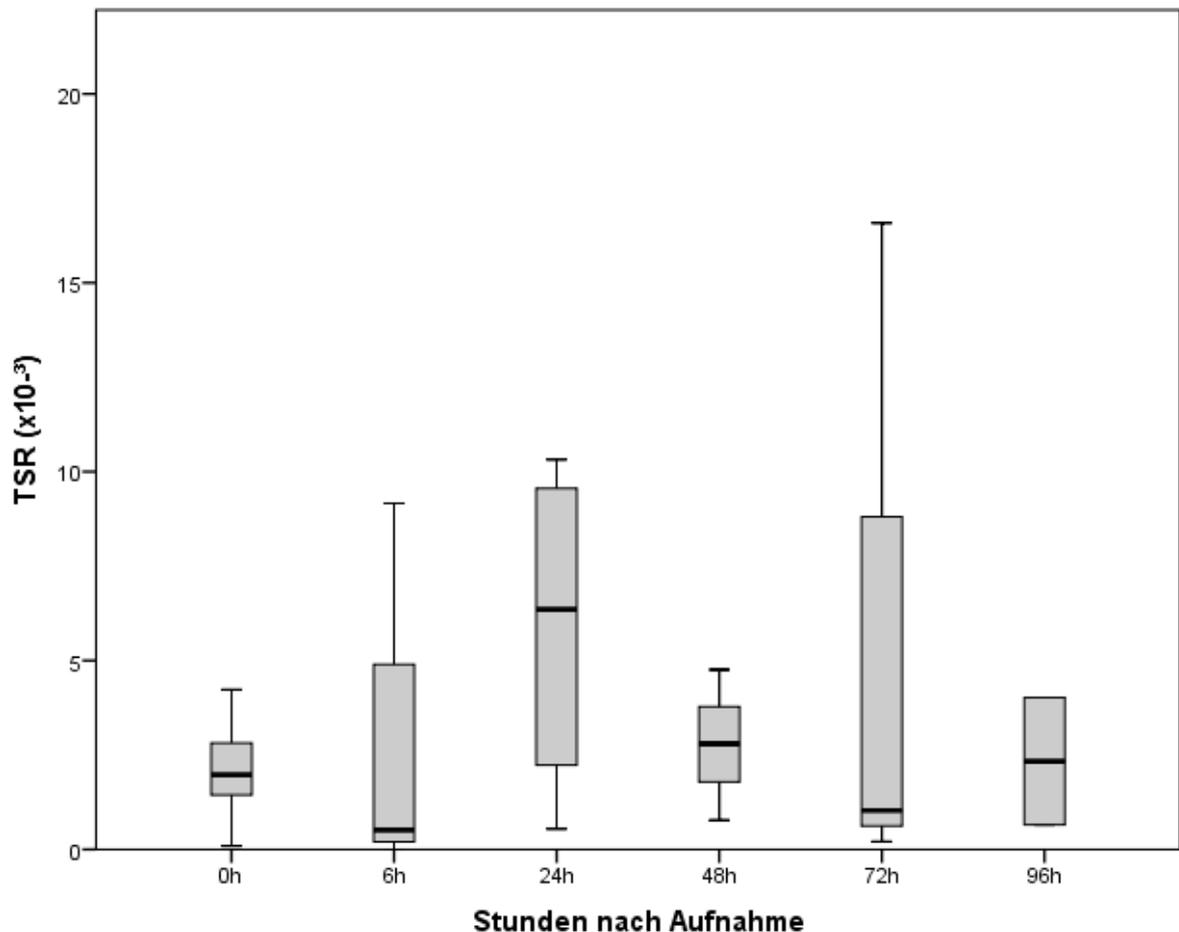


Abb. 19: Transsignaling-Ratio: Der Quotient aus IL-6 / sIL-6R zu den verschiedenen Messzeitpunkten in der Gruppe II (Traumagruppe) zeigte durchgehend niedrigere TSR-Werte zu allen Untersuchungszeitpunkten mit Maximalwerten nach 24h nach Klinikaufnahme.

Ein erhöhter TSR-Wert 6h nach Aufnahme des Patienten war signifikant mit einer höheren Mortalität ($p = 0,04$) assoziiert. 6h nach Aufnahme lagen die TSR-Werte bei den Überlebenden bei $22 \pm 25 \times 10^{-3}$, wohingegen die Nicht-Überlebenden um ein Vielfaches höhere TSR-Werte ($48 \pm 192 \times 10^{-3}$) aufwiesen (Abb. 20).

Zwischen den Überlebenden und Nicht-Überlebenden der Studie konnte alleine durch Evaluation der sIL-6R- und IL-6-Serumkonzentrationen kein Unterschied festgestellt werden.

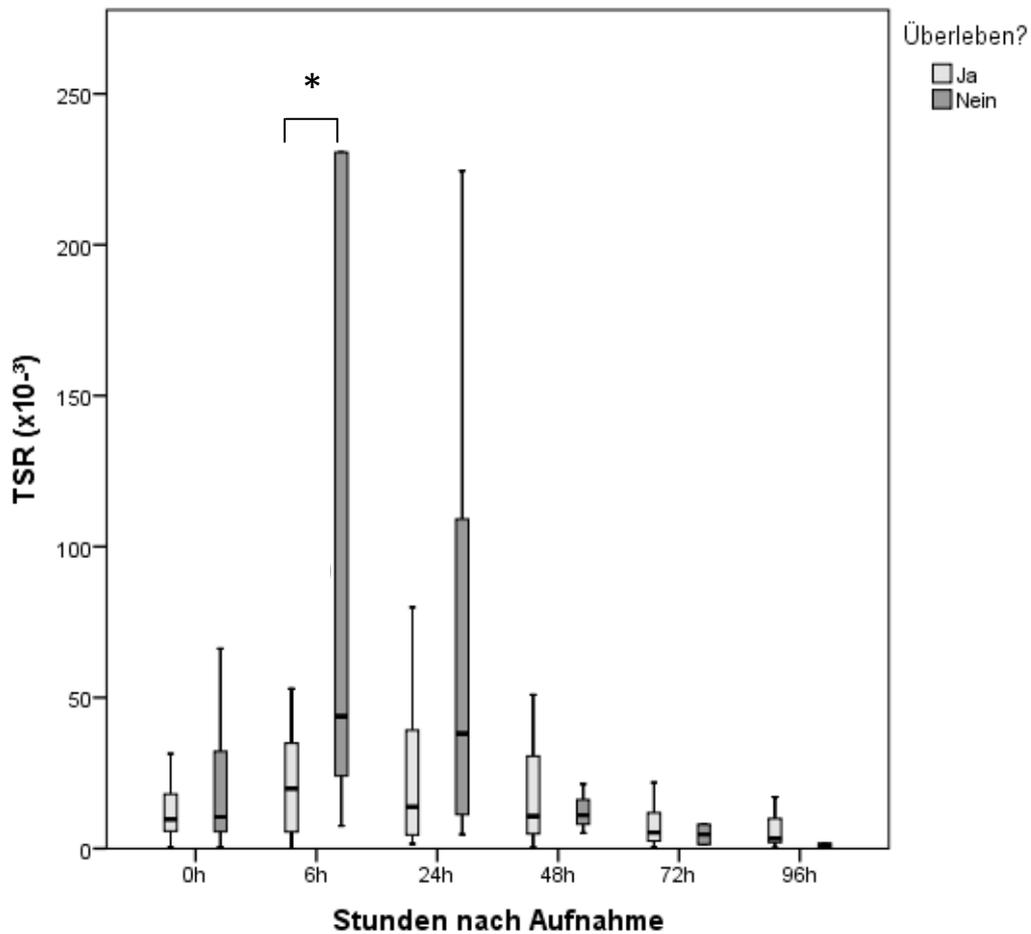


Abb. 20: Abhängigkeit der TSR-Kinetik und dem Überleben des Patienten: Ein nach 6h erhöhter TSR-Quotient war signifikant mit einer höheren Mortalität assoziiert *(p = 0,04) [48].

Die Patienten die ein Multiorganversagen entwickelten, hatten signifikant höhere TSR-Werte (p = 0,04 / 0,03) nach jeweils 24h und 48h nach Klinikaufnahme (Abb. 21).

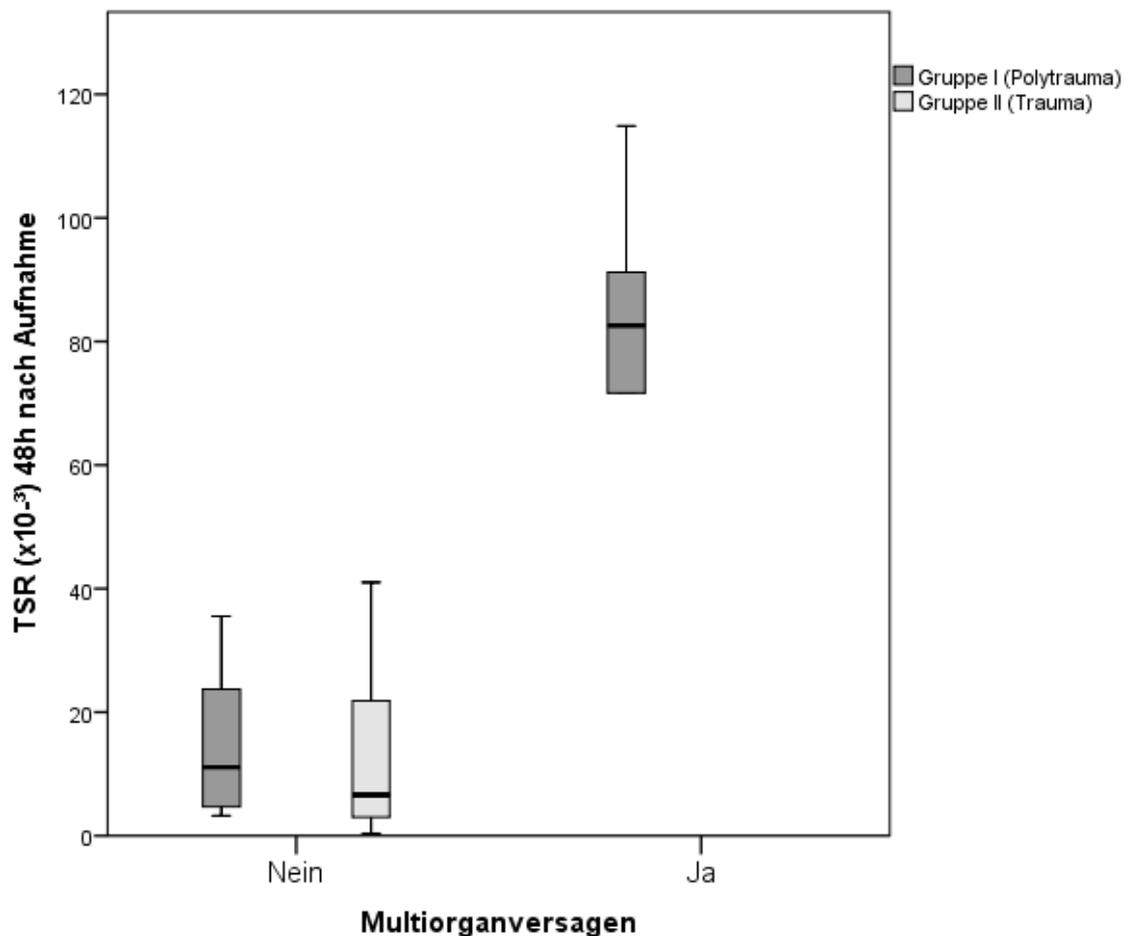


Abb. 21: TSR-Quotienten der Gruppen I und II 48h nach Klinikaufnahme im Vergleich zum Auftreten eines Multiorganversagens. Signifikant höhere Inzidenz des Multiorganversagens in der Polytraumagruppe nach 48h, $p = 0,03$.

38% dieser Patienten erlitten während des stationären Aufenthaltes eine Sepsis. Diese Patienten hatten nach 24h signifikant höhere TSR- ($p = 0,009$) und IL-6- ($p = 0,03$) Werte.

3.7 SIRS

Bei Patienten die ein SIRS entwickelten, war die TSR nach 6/24/72h signifikant erhöht ($p = 0,01, 0,008$ und $0,03$).

Erhöhte PTX3-Werte 24h nach Aufnahme des Patienten waren auch signifikant mit dem Auftreten eines Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) assoziiert ($p = 0,03$).

67% der Patienten aus der Gruppe I entwickelten ein Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS).

Ein SIRS trat in 56% der Fälle am Tag des Traumas, in 48% nach 24h, in 39% nach 48h, in 32% nach 72h und in 25% nach 96h auf (Abb. 22).

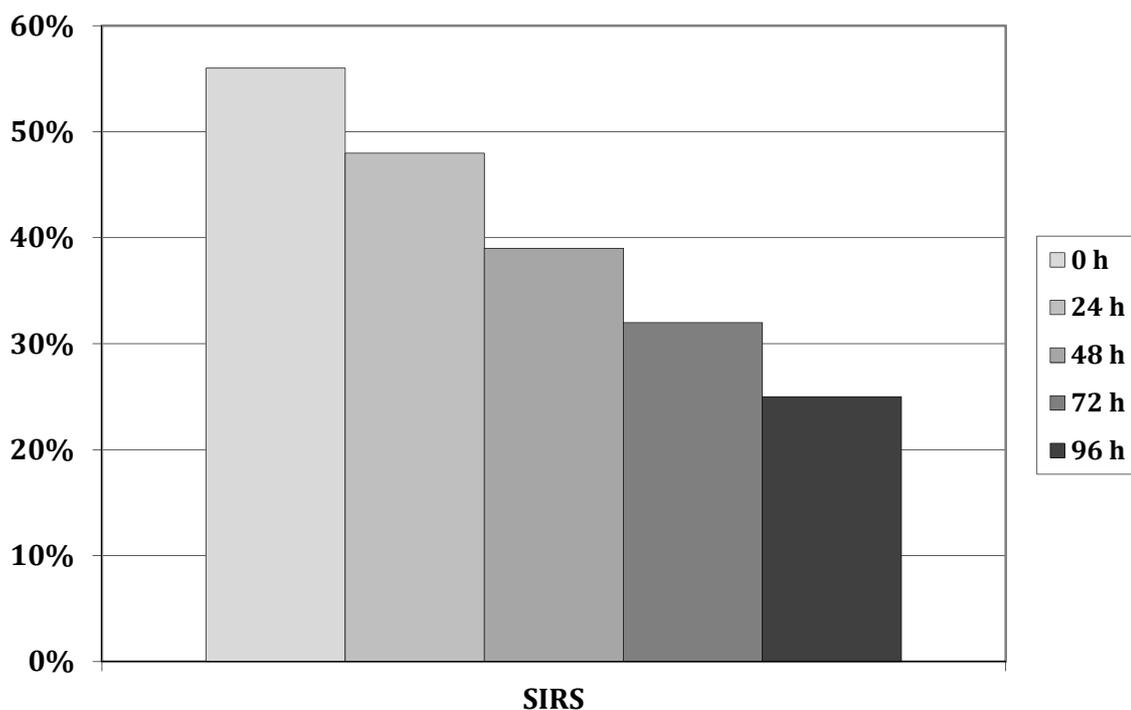


Abb. 22: Anteil der Patienten aus der Polytraumagruppe (Gruppe I), welche ein SIRS nach den verschiedenen Messzeitpunkten entwickelten. Der Anteil wird im zeitlichen Verlauf kontinuierlich geringer.

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals den temporalen Verlauf der sIL-6R- und PTX3- Serumkonzentrationen beim polytraumatisierten Patienten.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass sIL-6R, PTX3 und die Transsignaling-Ratio (TSR) die posttraumatische immunologische Situation des Patienten beschreiben können. Die TSR hat sich in unseren Untersuchungen signifikant in der Mortalität bei schwer polytraumatisierten Patienten unterschieden ($p = 0,04$, Gesamtmortalität Gruppe I: 29%). Anscheinend beeinflusst das IL-6-Transsignaling die Prognose des Polytraumapatienten in einem nicht unerheblichen Ausmaß.

Erhöhte Werte sowohl der TSR als auch von PTX3 waren mit der Entwicklung eines Organversagens im Verlauf assoziiert. PTX3 korrelierte signifikant mit der Verletzungsschwere und der Mortalität des Patienten 24h nach Trauma ($R^2 = 0,542$; $p < 0,001$). Auch PTX3 könnte demnach ein weiteres Maß für den Immunstatus des Polytraumapatienten, inklusive der Verletzungsschwere darstellen.

Die klinische Relevanz könnte in der intensivmedizinischen Behandlung des Polytraumas liegen. Nötig ist eine Etablierung von Cut-off-Werten, ab wann eine Operation des polytraumatisierten Patienten bezogen auf die immunologische Situation zu riskant ist, bzw. durch welchen Wert der beste Operationszeitpunkt vorhergesagt werden kann. Dies hätte den großen Vorteil, dem bereits immunkompromittierten Patienten einen weiteren „second hit“ zu ersparen und letztlich die Mortalität dadurch zu verbessern.

Hierzu müssen Multicenter-Studien durchgeführt werden, um diesbezüglich klare und valide Aussagen zu erhalten.

Eine Etablierung eines „immunologischen Profils“ des Patienten mit den unterschiedlichen Proteinen zu den verschiedenen Messzeitpunkten, könnte generell zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der frühen posttraumatischen Akut-Phase-Reaktion beitragen.

4.1 Kinetik immunologischer Parameter beim Polytrauma

Zur Zeit gibt es keinerlei verlässliche Daten zu zeitlichen Profilen von PTX3 und dem IL-6-Transsignaling beim polytraumatisierten Patienten in der Literatur.

Deshalb stellten wir die folgenden 4 Hypothesen auf, welche an dieser Stelle diskutiert werden:

- a. Existieren Kinetiken der immunologischen Parameter sIL-6R, TSR und PTX3 beim Polytrauma?
- b. Unterscheiden sich die Serumkonzentrationen von PTX3, sIL-6R und IL-6, bzw. die TSR-Werte beim polytraumatisierten Patienten von Gesunden und weniger schwer verletzten Probanden?
- c. Gibt es einen Zusammenhang der immunologischen Profile von sIL-6R, IL-6, TSR, PTX3 mit Mortalität / Organversagen / SIRS und Sepsis beim Polytrauma?
- d. Ist sIL-6R oder PTX3 mit der Verletzungsschwere gemessen mit ISS [31] und PTS [33] assoziiert?

4.1.1 IL-6 und sIL-6R

Für die Kinetik von IL-6 zeigte sich gegenüber den etablierten Entzündungsparametern CRP und PCT ein schnellerer Anstieg bereits nach 6-24h nach Aufnahme des Patienten. CRP und PCT verzeichneten erst nach durchschnittlich 48-72h nach Aufnahme des Patienten einen Anstieg der Serumkonzentrationen in Gruppe I (Polytraumagruppe). Erhöhte IL-6 Serumkonzentrationen nach Trauma wurden in der Vergangenheit von mehreren Autoren beschrieben [61,86,87,91,164-167]. Der langsamere Anstieg von CRP nach stumpfem Trauma, konnte auch in einer Studie von Giannoudis et al. (1998) gezeigt werden. In dieser Studie wurden CRP- und IL-6-Konzentrationen von insgesamt 31 Patienten mit einem ISS-Wert ≥ 9 nach 1, 3, 5 und 7 Tagen nach Unfall gemessen. Es zeigten sich ähnlich wie in dieser Studie Konzentrationsmaxima von CRP etwa nach 24-72 Stunden nach Trauma, wohingegen die Serumkonzentrationen von IL-6 direkt anstiegen [164].

IL-6 hat demnach für die frühe Erkennung von Entzündungsreaktionen jedweder Art größere Vorteile gegenüber CRP und PCT. Nicht zuletzt auch ein Vorteil ist die Tatsache, dass IL-6 einfach in den meisten Zentrallaboratorien schnell bestimmt werden kann. Kritisch diskutiert werden muss der Nachteil der kurzen Halbwertszeit von IL-6. Somit stellt es nur eine Momentaufnahme der Entzündungssituation des Patienten dar.

Der lösliche Rezeptor sIL-6R war in unserer Studie in Gruppe I (Polytrauma-Gruppe) durchgehend erniedrigt. Im Vergleich zur Gruppe II und III (II: Trauma-Gruppe, III: Gesunden-Gruppe) waren die sIL-6R-Serumkonzentrationen direkt nach Aufnahme des Patienten erniedrigt (21 ± 8 ng/ml) [48]. Vermutlich liegt die niedrige Konzentration von sIL-6R daran, dass es zu einer verstärkten Formation von sIL-6R mit IL-6 und konsekutivem IL-6-Transsignaling kommt und somit eine niedrigere Konzentration des sIL-6R in den Serumproben gemessen wird [107,168,169]. Ein Problem der sIL-6R-ELISA-Messungen stellt die Detektion mittels Antikörper im ELISA-Kit dar (siehe 4.1.3). Durch IL-6 maskierter sIL-6R kann ggf. nicht eindeutig in die Messung mit einfließen und somit besteht die Möglichkeit, dass die niedrige sIL-6R-Konzentration in einer verstärkten Formation, wie oben beschrieben, von IL-6 mit sIL-6R begründet liegt. Aber auch die Möglichkeit einer temporären Immunsuppression des Patienten muss in Erwägung gezogen werden.

Die o.g. Vermutung wurde invers bereits auch in anderen Studien bekräftigt, in denen festgestellt wurde, dass erhöhte sIL-6R-Serumkonzentrationen und somit weniger Transsignaling mit einem niedrigeren Risiko für das Erkranken an koronaren Herzkrankheiten einhergeht [169-171]. Hierdurch wird die Hypothese wiederum bekräftigt, dass es beim Polytraumapatienten zu einem vermehrten Transsignaling im Sinne einer vermehrten Formation von sIL-6R mit IL-6 kommt.

Für die Hypothese der temporären Immunsuppression sprechen die in dieser Dissertation beschriebenen durchgehend niedrigen sIL-6R-Konzentrationen in Gruppe I. Dies könnte ihre Ursache in einer nicht adäquaten Immunantwort, im Sinne einer Immunsuppression haben, da sich in dieser Gruppe weder ein Anstieg noch ein Abfallen der Konzentrationen des sIL-6R über die Zeit zeigte [48]. Dies wäre auch dadurch erklärbar, dass erhöhte Werte der Transsignaling-Ratio (TSR) und somit niedrige sIL-6R-Werte mit der Mortalität bzw. dem Auftreten von SIRS und Sepsis assoziiert waren (siehe 4.1.3).

Frieling et al. (1995) fanden in ihrer Studie an 25 septischen Patienten ebenfalls eine signifikant niedrigere sIL-6R-Konzentration gegenüber Gesunden (43 vs. 80 ng/ml) [172]. Im Gegensatz dazu konnte eine Studie von Corbi et al. (2000) an Patienten die sich einer aortokoronaren Bypassoperation mit und ohne Einsatz der Herz-Lungenmaschine unterzogen zeigen, dass die sIL-6R-Konzentrationen 6h nach der Operation im Vergleich zu 15 Min. vor der Operation nur leicht absanken [173]. Dies könnte so interpretiert werden, dass es sich beim sIL-6R weniger um einen Ischämie-Parameter, sondern mehr um ein Maß für ein Gewebetrauma handeln könnte.

Bei Analyse der alleinigen Konzentrationen von sIL-6R und IL-6 in der Gruppe der Polytraumapatienten, die nicht überlebt haben (non-survivor), wird kein signifikanter Unterschied deutlich. Erst wenn die Transsignaling-Ratio (TSR) berechnet wird, ergeben sich signifikant höhere TSR-Werte in Gruppe I nach 6h bei den non-survivors.

Volpin et al. (2014) zeigten in ihrer Studie, dass signifikant erhöhte proinflammatorische Zytokine wie IL-6, TGF- β und IL-8, sowie gleichzeitig niedrige Serumkonzentrationen von antiinflammatorischem IL-4 gute Marker für das Vorhersagen eines SIRS beim Traumapatienten sind. Leider wurden die Zytokinkonzentrationen nur direkt nach Trauma gemessen, weshalb hier kein zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der Zytokine erkennbar ist [56].

Zu IL-6 als Vorhersagewert für SIRS oder Sepsis nach Trauma existieren mehrere Studien in der Literatur. Die Studienlage hierzu ist jedoch uneinheitlich. Drei Arbeiten betrachten IL-6 als einen wirkungsvollen Parameter zum Vorhersagen septischer Komplikationen nach Trauma [174-177].

Fast doppelt so viele Studien existieren jedoch, welche keine Korrelation zwischen IL-6-Konzentrationen und dem Entwickeln von SIRS oder Sepsis zeigen [164,174,177-181]. Demnach liegt es nahe für ebendiese Vorhersagen andere Parameter, wie z.B. die von uns eingeführte Transsignaling-Ratio (TSR) zu untersuchen.

4.1.2 PTX3

Wir konnten nachweisen, dass die Serumkonzentrationen von PTX3 beim polytraumatisierten Patienten gegenüber den Vergleichsgruppen erhöht waren. Es ergaben sich signifikante Korrelationen zwischen der mit ISS und PTS gemessenen Verletzungsschwere und dem PTX3-Serumspiegel.

Mantovani et al. berichteten über PTX3-Serumspiegel von 200-800 ng/ml bei Sepsis oder septischem Schock [127]. Die von uns gemessenen PTX3-Werte waren demnach nur mäßig stark erhöht und hatten ihren höchsten Wert (61 ± 69 ng/ml) 24h nach Aufnahme des Patienten (Normwert bei Gesunden: < 2 ng/ml).

Die Tatsache, dass PTX3 schon nach 24h die höchste Serumkonzentration in der Polytrauma-Gruppe erreichte, lässt die Vermutung zu, dass dieses Protein geeigneter ist für die Einschätzung sowohl der physikalisch-anatomischen, als auch der immunologischen Verletzungsschwere, als etablierte Parameter wie CRP und PCT, die im Mittel erst nach 48-96h ihre höchsten Werte erreichen.

Weiterhin korrelierte PTX3 24h nach Aufnahme signifikant mit der Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten, welche anhand des RISC-Scores errechnet wurde (R^2 0,542, $p = 0,0001$). Die lediglich mittelstarke Korrelation liegt wahrscheinlich in der niedrigen Fallzahl der Studie begründet, sodass weitere, am Besten multizentrische Studien erfolgen sollten, um diese Korrelation weiter zu validieren. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den Resultaten einer Studie von Bastrup-Birk et al. (2013), in der PTX3 signifikant mit dem Entwickeln eines SIRS, einer Sepsis oder septischen Schocks von Intensivpatienten korreliert [182]. Patienten mit einer hohen PTX3-Konzentration bei Aufnahme, hatten eine höhere 90-Tage-Mortalität [182]. Die Serumkonzentrationen von PTX3 waren in einer anderen bereits o.g. Studie von Mauri et al. (2010) mit der Schwere einer Sepsis assoziiert [183]. Pentraxin-3 scheint also ein sensitiver Marker für das Entwickeln bzw. den Verlauf eines SIRS bzw. einer Sepsis zu sein.

PTX3 wird u.a. in Adipozyten, Fibroblasten, Endothelzellen synthetisiert, wodurch eine unmittelbare anatomische Nähe zu Weichteilstrukturen, wie Muskeln, Sehnen, Bändern, aber auch Nerven und Blutgefäßen hergestellt werden kann. Auch in einzelnen

Organen und Organsystemen wie Thymus, Ovar und Myokard wird verstärkt PTX3 synthetisiert. Diese Organe können natürlich ebenfalls im Rahmen des Polytraumas verletzt werden (beispielsweise schweres Thoraxtrauma) [98,127,132,146,147,150]. Durch die schwere Weichteilschädigung beim Polytrauma, erhöhen sich die Serumkonzentrationen von Pentraxin 3 proportional zu dem Ausmaß der Weichteilschädigung, bzw. der Verletzungsschwere des Patienten. Die Assoziation des ISS/PTS mit dem PTX3-Wert direkt bei Aufnahme war bei den Patienten in der Polytrauma-Gruppe signifikant (ISS: $p = 0,02$, PTS: $p = 0,002$). Die höhere Signifikanz des PTS (Hannoveraner Polytraumaschlüssel) liegt vermutlich in der Tatsache begründet, dass durch den PTS, besser als durch den ISS, die Einzelverletzungen und somit das Verletzungsausmaß des Polytraumapatienten bewertet werden [37].

Die Konzentrationen von PTX3 sind bei entzündlich bedingten Erkrankungen wie Sepsis, rheumatoider Arthritis ebenfalls erhöht und außerdem mit Gefäßerkrankungen wie Atherosklerose vergesellschaftet.

Die extrahepatische Produktion von PTX3 wird durch IL-1, TNF- α und wahrscheinlich auch IL-6 ausgelöst [98,146,147,150,184]. Eine gewisse Anpassung von PTX3-Serumkonzentrationen an verschiedene pathologische Zustände wurde auch von Mauri et al. (2010) gezeigt [183]. In dieser Studie korrelierte die PTX3-Konzentration mit der Schwere einer Sepsis bzw. mit dem Sepsis-assoziierten Gerinnungsversagen [183].

Durch Pentraxin 3 wird somit auch die systemische Entzündungsreaktion abgebildet. Als extrahepatischer Mitregulator der Akut-Phase-Reaktion, inklusive Komplementaktivierung und Apoptose, besitzt PTX3 unserer Auffassung nach eine große Bedeutung in der posttraumatischen Entzündungsreaktion, insbesondere bei der Bewertung des optimalen Operationszeitpunktes und der Verletzungsschwere.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PTX3 sowohl mit der Verletzungsschwere korreliert als auch die individuelle immunologische Situation zu einem frühen Zeitpunkt nach Trauma widerspiegelt. Diese Tatsache könnte in Zukunft sehr hilfreich sein, wenn sich der verantwortliche Unfallchirurg fragen muss, zu welchem Zeitpunkt eine definitive Versorgung des Patienten am günstigsten ist. Die Frage ob man sich für die Ansätze Damage Control Surgery oder Early Total Care entscheidet ist multifaktoriell und kann nicht nur von der immunologischen Situation abhängig gemacht werden.

Letztlich sind die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch ein Anreiz in dieser Richtung weiterhin in vitro- und in vivo- Untersuchungen weiterzuführen.

4.1.3 Transsignaling

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Polytraumapatienten, die einen frühen Anstieg der Transsignaling-Ratio 6h nach Trauma zeigten, signifikant öfter nicht überlebten. Die Transsignaling-Ratio (TSR) war der einzige Parameter durch den signifikante Unterschiede gezeigt werden konnten. Durch die verschiedenen Konzentrationen von sIL-6R und IL-6 alleine konnten keine signifikanten Änderungen in der Mortalität der Polytraumapatienten aus Gruppe I nachgewiesen werden [48].

Wahrscheinlich verbindet sich der sIL-6R mit IL-6 und steht somit für die Messung des freien sIL-6R im ELISA nicht mehr zur Verfügung. Eine Interpretationsschwierigkeit wird zusätzlich durch die Messmethode des ELISA-Kits mittels Antikörper hervorgerufen. Der Detektionsantikörper des sIL-6R-ELISA bindet an die IL-6-Bindungsstelle am sIL-6R und steht somit in Konkurrenz mit tatsächlich vorhandenem IL-6 in der Patientenprobe. Durch IL-6 gebundener sIL-6R, bzw. durch IL-6 maskierter sIL-6R kann dann nicht eindeutig in die Messung mit einfließen.

Eine andere Möglichkeit der niedrigeren gemessenen sIL-6R-Konzentration ist eine Immunsuppression des Patienten durch eine verminderte Produktion von sIL-6R. Erhöhte TSR-Werte nach frühen 6h nach Klinikaufnahme zeigten eine signifikant erhöhte Mortalität der Patienten ($p = 0,04$). Nach 24h erhöhte TSR- und IL-6-Werte korrelierten signifikant mit dem Auftreten einer Sepsis ($p = 0,009$ / $p = 0,03$). Weiterhin wurde bei Patienten mit erhöhten TSR-Werten nach 24h und 48h eine signifikant erhöhte Inzidenz eines Multiorganversagens festgestellt ($p = 0,04$ / $0,03$). Die frühzeitige Evaluation der TSR beim Polytrauma, könnte demnach schon vor dem Anstieg etablierter Parameter wie CRP und PCT einen Hinweis auf einen komplizierten Krankheitsverlauf im Sinne eines Auftretens eines SIRS bzw. einer Sepsis mit Organversagen geben.

Eine Abschätzung der hyperinflammatorischen Situation des Patienten wird durch einen steigenden TSR-Quotienten (einen steigenden Wert der TSR) erreicht, da hier sowohl

IL-6 ansteigen kann als auch sIL-6R in der Konzentration fallen kann. Aber auch beide Konstellationen sind zeitgleich möglich. Dann ist der Anstieg der TSR davon abhängig, dass IL-6 im Verhältnis zu sIL-6R höhere Werte aufweist bzw. stärker ansteigt. Selbst wenn IL-6 sich mit dem sIL-6R verbindet und somit für die Messung des IL-6 nicht mehr zur Verfügung steht, zeigt ein steigender IL-6-Wert trotzdem eine hyperinflammatorische Situation an (Transsignaling-Aktivität). Invers zeigt ein niedriger TSR-Wert einen eher antiinflammatorischen Zustand an.

Wir stellten die Hypothese auf, dass es schwieriger ist durch IL-6 und sIL-6R einzeln eine Aussage über die derzeitige immunologische Situation des Polytraumapatienten zu bekommen. Die TSR hilft zu unterscheiden, ob es sich um eine Hyperinflammation oder eine Antiinflammation handelt. In der Literatur finden sich verschiedene Studien, in denen unterschiedliche Ergebnisse das Transsignaling betreffend nachgewiesen wurden.

Mees et. al. (2009) beispielsweise verursachten einen hämorrhagischen Schock in einem Mausmodell und blockierten gleichzeitig das IL-6-Transsignaling durch Applikation von gp130-Fc. Eine Blockade des Transsignaling konnte zwar nachweisen, dass das Transsignaling auch wirklich vermindert wurde, jedoch zeigten sich keine Unterschiede in der Mortalität der Mäuse nach hämorrhagischem Schock [116]. Barkhausen et. al. (2011) zeigten in einem Sepsis-Mausmodell einen Überlebensvorteil, wenn durch die Applikation von gp130-Fc eine Reduzierung des IL-6-Transsignalings induziert wurde. Interessanterweise zeigte sich in dieser Studie genauso wie bei Vyas et al. (2005) kein Überlebensvorteil bei Blockade von IL-6 mittels eines IL-6-Antikörpers, wohl aber bei Blockade des Transsignaling-Mechanismus [185,186]. Hier liegt die Vermutung nahe, dass durch das Transsignaling beim kritisch kranken Patienten, wozu auch ein Polytraumapatient zählt, eine stärkere Entzündungsreaktion mit nachfolgenden Organschädigungen verursacht wird, als durch IL-6 alleine. Eine nachfolgende Studie unserer Arbeitsgruppe deckte einen im Mausmodell induzierten hämorrhagischen Schock als Auslöser für ein IL-6-Transsignaling mit nachfolgender Entzündungsreaktion auf [115].

Diese Studien und unsere generierten Daten geben einen weiteren Hinweis auf die

grundlegende pathophysiologische Bedeutung des Transsignaling-Mechanismus für das Überleben eines kritisch kranken Patienten.

Auch die Frakturheilung nach Trauma könnte durch den IL-6-Transsignaling-Mechanismus beeinflusst werden. Beeton et al. (2004) untersuchten die Frakturheilung nach Schädel-Hirn-Trauma, interpretierten jedoch die Ergebnisse ihrer Studie missverständlich. Sie betrachteten eine erhöhte Konzentration von sIL-6R als Indikator für ein gesteigertes Transsignaling [187]. Das Gegenteil ist wahrscheinlich der Fall, da der sIL-6R im Komplex zusammen mit IL-6 nicht mehr als sIL-6R detektierbar ist und somit sinkt [169]. Auch hier stellt sich o.g. Problem der Messmethodik mittels sIL-6R-ELISA dar.

Eine Beurteilung des Effektes des IL-6-Transsignalings auf das Überleben von Traumapatienten kann nicht abschließend gegeben werden. Dennoch erscheint es so, als könnte die TSR besser als die Konzentrationen von sIL-6R und IL-6 alleine einen Hinweis auf die Überlebenschancen polytraumatisierter Patienten geben.

Aus den Daten dieser Arbeit und der uneinheitlichen Studienlage zur Vorhersagekraft von IL-6 bzgl. SIRS und Sepsis bzw. Organversagen kann festgestellt werden, dass wahrscheinlich nicht nur die Werte von IL-6 alleine die Überlebenschancen vorhersagen, sondern vielmehr das Transsignaling. Dieses Transsignaling wird in unserer Studie durch die Transsignaling-Ratio (TSR) widerspiegelt.

Letztlich müssen auch diesbezüglich weitere Studien speziell das Transsignaling betreffend folgen, um valide Aussagen über etwaige Assoziationen mit dem Auftreten eines SIRS / Sepsis bzw. eines Organversagens beim kritisch kranken Patienten treffen zu können.

4.2 Frühe Marker zur Beurteilung der immunologischen Verletzungsschwere

Die sIL-6R-Konzentrationen blieben durchgehend niedrig bei den schwer polytraumatisierten Patienten im Gegensatz zu den Gruppen II und III. PTX3-Konzentrationen waren nach 24h deutlich höher als in den übrigen Gruppen. Weiterhin besteht eine Korrelation zwischen erhöhten Werten der TSR und PTX3 und einem Organversagen nach Polytrauma.

PCT und CRP eignen sich nach unserer Einschätzung primär nicht als frühe Marker zur Einschätzung der immunologischen Verletzungsschwere, da sie später ansteigen als PTX3 und die TSR.

Sowohl PTX3 als auch die TSR eignen sich als frühe Marker zur Beurteilung der immunologischen und physikalisch-anatomischen Verletzungsschwere bei polytraumatisierten Patienten [48].

4.3 Zusammenfassende Beantwortung der Fragestellungen

a. Existieren Kinetiken der immunologischen Parameter sIL-6R, TSR und PTX3 beim Polytrauma?

Die Serumkonzentrationen von PTX3 haben ihren Maximalwert nach 24h bzw. 48h nach Klinikaufnahme des schwer polytraumatisierten Patienten. Nach 0h und 6h sind die Werte ansteigend und nach 72h bzw. 96h abfallend.

Nach 6h nach Klinikaufnahme hatten die TSR-Quotienten ihre maximalen Werte erreicht, danach waren die Werte konstant abfallend.

Serumkonzentrationen des sIL-6R waren konstant niedriger als in den Vergleichsgruppen, jedoch ohne deutlich ersichtliche Maximalwerte.

b. Unterscheiden sich die Serumkonzentrationen von PTX3, sIL-6R und IL-6, bzw. die TSR-Werte beim polytraumatisierten Patienten von Gesunden und weniger schwer verletzten Probanden?

Beim Polytraumapatienten waren die Werte von IL-6 und PTX3 insgesamt höher als bei den Gesunden bzw. den weniger schwer verletzten Patienten. Dagegen waren die Konzentrationen von sIL-6R durchgehend niedriger beim Polytrauma als in der Vergleichsgruppe.

c. Gibt es einen Zusammenhang der immunologischen Profile von sIL-6R, IL-6, TSR, PTX3 mit Mortalität / Organversagen / SIRS und Sepsis beim Polytrauma?

Durch alleinige Analyse der Kinetik des sIL-6R und IL-6 einzeln, konnten keine Unterschiede bzgl. der Mortalität des Polytraumapatienten festgestellt werden.

Jedoch war ein erhöhter TSR-Quotient 6h nach Klinikaufnahme des schweren Polytraumas signifikant mit einer höheren Mortalität assoziiert ($p = 0,04$).

Polytraumapatienten die ein Multiorganversagen entwickelten, hatten signifikant höhere TSR und IL-6-Werte nach 24h und 48h nach Klinikaufnahme ([TSR: $p = 0,04$ und $0,03$], [IL-6: $p = 0,02$ und $0,03$]). 38% dieser Patienten entwickelten eine Sepsis.

Es zeigte sich eine signifikante TSR-Erhöhung nach 6h, 24h und 72h bei Polytraumapatienten die ein SIRS entwickelten ($p = 0,01$, $p = 0,008$ und $p = 0,03$).

Außerdem waren nach 24h erhöhte PTX3-Konzentrationen signifikant mit dem Entwickeln eines SIRS assoziiert ($p = 0,03$).

d. Ist sIL-6R oder PTX3 mit der Verletzungsschwere gemessen mit ISS [31] und PTS [33] assoziiert?

Bei PTX3 ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen der mittels ISS und PTS gemessenen Verletzungsschwere des Patienten unmittelbar nach Klinikaufnahme. Die Konzentrationen des sIL-6R waren in der Polytraumagruppe durchgehend niedriger als in den Vergleichsgruppen.

Somit kann hier auch von einer Assoziation mit der Verletzungsschwere ausgegangen werden [48].

4.4 Limitationen

Aus unserer Sicht ergeben sich für die Ergebnisse dieser Studie nachfolgende Einschränkungen [48]:

Da Berlin die kürzesten Rettungszeiten in ganz Deutschland hat, wurden wir im Schockraum mit Patienten konfrontiert, die eine weit höhere Verletzungsschwere aufwiesen als ggf. im ländlichen Raum üblich. In Regionen mit längeren Rettungszeiten, ist es meist der Fall dass Patienten mit einer derartig hohen Verletzungsschwere (höherer ISS und PTS) nicht lebend das Krankenhaus erreichen [11]. Ein Selektions-Bias kann nahezu ausgeschlossen werden, da in das Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie am Campus Virchow Klinikum der Charité nachgewiesenermaßen (laut jährlichem Traumaregisterbericht seit 2005) nahezu konstant Patienten mit hoher Verletzungsschwere, Mortalität und Verteilungsmuster der Verletzungen eingeliefert werden [48].

Zu den verschiedenen Zeitpunkten an denen IL-6, sIL-6R und PTX3 gemessen wurden, fanden sich unterschiedlich stark ausgeprägte Werte. Niedrige Fallzahlen, verbunden mit hohen Standardabweichungen machen die Interpretation der Werte zusätzlich schwierig. Es müssen weitere Studien erfolgen, welche speziell Cut-off-Werte der o.g. Moleküle nach Trauma näher beschreiben [48].

4.5 Ausblick

Eine Validierung der Ergebnisse dieser Dissertation, inklusive der Detektion von Cut-off-Werten ist in einer multizentrischen Studie, gemeinsam mit dem Forschungsnetzwerk der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) geplant.

Derzeit erfolgt die Validierung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse an einem neuen und innovativen Polytrauma-Mausmodell.

In dieser Studie werden mehrere Gruppen mit unterschiedlicher Verletzungsschwere und mehreren Interventionen (z.B. sIL-6R-Applikation und sIL-6R-Antikörper-Applikation) miteinander verglichen.

Das Ziel soll sein, die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zu validieren, aber auch die grundsätzlichen physiologischen Mechanismen hinter der Akut-Phase-Reaktion beim Polytrauma zu verstehen und Interventionsmöglichkeiten wie z.B. die Blockierung des Transsignalings durch sIL-6R-Antikörper-Applikation zu evaluieren.

Weiterhin ist das Ziel mit den gewonnenen Daten aus dieser Arbeit und der nachfolgenden tierexperimentellen Arbeiten einen Schnelltest zu entwickeln, der durch die Evaluierung der immunologischen Parameter einen Eindruck über die immunologische Verletzungsschwere gibt und somit eine Hilfestellung zur Planung des optimalen Zeitpunkts der operativen Versorgung geben kann.

PTX3 und die Transsignaling-Ratio (TSR) könnten den Chirurgen bei der Entscheidungsfindung bzgl. des Operationsszeitpunktes und des weiteren Vorgehens behilflich sein.

Die Bestimmung der verschiedenen Zytokin- und löslichen Rezeptorkonzentrationen erfolgte in dieser Pilotstudie mittels der sog. Sandwich-ELISA-Technik. Diese Methode ist für die Praxis eher ungeeignet, da sie teuer, zeitaufwendig und fehleranfällig ist. Für die Einschätzung der immunologischen Verletzungsschwere wären industriell gefertigte Schnelltests die beste Wahl. Bestenfalls könnten mit einem Bedside-Test mehrere Zytokine gemessen werden und somit zu verschiedenen Zeitpunkten die

optimale Versorgungsstrategie (Damage Control Surgery vs. Early Total Care) ausgelotet werden.

5. Literaturverzeichnis

1. DGU T. Jahresbericht. In. Sektion Notfall-, Intensiv-, und Schwerstverletztenversorgung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie; 2009
2. Matthes G, Seifert J, Ostermann PA, et al. [Early death of the severely injured patient--A retrospective analysis]. Zentralbl Chir 2001;126:995-999
3. Arbeitsmedizin BfAu. Unfalltote und Unfallverletzte 2008 in Deutschland. In: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin; 2010
4. Unfallchirurgie DGf. Weißbuch Schwerverletzten-Versorgung. Empfehlungen zur Struktur, Organisation und Ausstattung der Schwerverletzten-Versorgung in der Bundesrepublik Deutschland.: Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie; 2012
5. Kinzl L, Gebhard F, Arand M. [Polytrauma and economics]. Unfallchirurgie 1996;22:179-185
6. DGU T. Jahresbericht. In. Sektion Notfall-, Intensiv-, und Schwerstverletztenversorgung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie; 2014
7. Bundesamt S. Unfallentwicklung auf Deutschen Straßen 2010. In: Statistisches Bundesamt; 2011
8. Sefrin P. Geschichte der Notfallmedizin und des Notarztdienstes in Deutschland. Notfall&Hausarztmedizin 2004;30:215-222
9. Kleber C, Schaser KD, Haas NP. Surgical intensive care unit--the trauma surgery perspective. Langenbecks Arch Surg 2011;396:429-446
10. van Olden GD, Meeuwis JD, Bolhuis HW, Boxma H, Goris RJ. Clinical impact of advanced trauma life support. Am J Emerg Med 2004;22:522-525
11. Kleber C, Giesecke MT, Tsokos M, et al. Overall distribution of trauma-related deaths in Berlin 2010: advancement or. World J Surg 2012;36:2125-2130
12. Trunkey DD. Trauma. Accidental and intentional injuries account for more years of life lost in the U.S. than cancer and heart disease. Among the prescribed remedies are improved preventive efforts, speedier surgery and further research. Sci Am 1983;249:28-35

13. Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am* 1995;75:257-277
14. Giannoudis PV, Giannoudi M, Stavlas P. Damage control orthopaedics: lessons learned. *Injury* 2009;40 Suppl 4:S47-52
15. Pape HC, Giannoudis P, Krettek C. The timing of fracture treatment in polytrauma patients: relevance of damage control orthopedic surgery. *Am J Surg* 2002;183:622-629
16. Wick M, Ekkernkamp A, Muhr G. [The epidemiology of multiple trauma]. *Chirurg* 1997;68:1053-1058
17. Kelsch G, Helber MU, Ulrich C. [Craniocerebral trauma in fall from bicycles--what is the effect of a protective helmet?]. *Unfallchirurg* 1996;99:202-206
18. Kuner EH, Gabelmann M, Schlickewei W. [Bicycle accidents--causes and sequelae. An evaluation of the 1986 calendar year]. *Unfallchirurgie* 1990;16:25-34
19. McLellan BA, Rizoli SB, Brenneman FD, et al. Injury pattern and severity in lateral motor vehicle collisions: a Canadian experience. *J Trauma* 1996;41:708-713
20. Ruchholtz S, Nast-Kolb D, Waydhas C, Schweiberer L. [The injury pattern in polytrauma. Value of information regarding accident process in clinical acute management]. *Unfallchirurg* 1996;99:633-641
21. Hahn MP, Richter D, Ostermann PA, Muhr G. [Injury pattern after fall from great height. An analysis of 101 cases]. *Unfallchirurg* 1995;98:609-613
22. Grotz M, Schwermann T, Lefering R, et al. [DRG reimbursement for multiple trauma patients -- a comparison with the comprehensive hospital costs using the German trauma registry]. *Unfallchirurg* 2004;107:68-75
23. Ruchholtz S, Nast-Kolb D, Waydhas C, et al. [Cost analysis of clinical treatment of polytrauma patients]. *Chirurg* 1995;66:684-692
24. Qvick B, Buehren V, Woltmann A. [Is polytrauma affordable these days? G-DRG system vs per diem charge based on 1,030 patients with multiple injuries]. *Unfallchirurg* 2012;115:892-896
25. Regel G, Schmidt U, Tscherne H. Allgemeine Aspekte. In: Tscherne H ed, *Tscherne Unfallchirurgie: Traumamanagement*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 1997:3-13

26. Regel G, Seekamp A, Takacs J, et al. [Rehabilitation and reintegration of polytraumatized patients]. *Unfallchirurg* 1993;96:341-349
27. Tscherne H, Regel G. *Tscherne Unfallchirurgie: Traumamanagement*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 1997
28. Butcher N, Balogh ZJ. The definition of polytrauma: the need for international consensus. *Injury* 2009;40 Suppl 4:S12-22
29. Tscherne H, Sturm JA, Regel G. [Prognostic significance of early management as exemplified by the accident patient]. *Langenbecks Arch Chir* 1987;372:37-42
30. Copes WS, Champion HR, Sacco WJ, et al. The Injury Severity Score revisited. *J Trauma* 1988;28:69-77
31. Baker SP, O'Neill B, Haddon W, Jr., Long WB. The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J Trauma* 1974;14:187-196
32. Oestern HJ, Kabus K. [Comparison of various trauma score systems. An overview]. *Unfallchirurg* 1994;97:177-184
33. Regel G, Pape HC, Pohlemann T, et al. [Scores as decision aids]. *Unfallchirurg* 1994;97:211-216
34. Oestern H, Kabus K. Der Polytraumaschlüssel: Ein einfaches Kriterium zur Analyse der Verletzungsschwere. *Hefte Unfallheilkd* 1993;230: 1316-1321
35. Copes WS, Champion HR, Sacco WJ, et al. Progress in characterizing anatomic injury. *J Trauma* 1990;30:1200-1207
36. Osler T, Baker SP, Long W. A modification of the injury severity score that both improves accuracy and simplifies scoring. *J Trauma* 1997;43:922-925; discussion 925-926
37. Foltin E, Stockinger A. [Effects of injury pattern on the predictability of 4 multiple trauma scores. Presentation of a method for identifying artifacts]. *Unfallchirurg* 1999;102:98-109
38. Pape HC, Lefering R, Butcher N, et al. The definition of polytrauma revisited: An international consensus process and proposal of the new 'Berlin definition'. *J Trauma Acute Care Surg* 2014;77:780-786
39. Bronkhorst MW, Boye ND, Lomax MA, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor pathway increase susceptibility to infections in severely injured trauma patients. *J Trauma Acute Care Surg* 2013;74:862-870

40. Sutherland A, Thomas M, Brandon RA, et al. Development and validation of a novel molecular biomarker diagnostic test for the early detection of sepsis. In, Crit Care. England; 2011;R149
41. Michalopoulos A, Center OCS, Kriaras J, et al. SIRS and sepsis in cardiac surgery patients. Intensive Care Medicine 2013;22
42. Papavero J, Erchinger C, Haas N, Schaser K, Kleber C. Inzidenz des Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS) und Sepsis und deren Auswirkungen auf Multiorganversagen (MOF) in polytraumatisierten Patienten. In. © AG Polytrauma, CMSC, Charité Berlin.; unpublished
43. Baker CC, Oppenheimer L, Stephens B, Lewis FR, Trunkey DD. Epidemiology of trauma deaths. Am J Surg 1980;140:144-150
44. Sears BW, Stover MD, Callaci J. Pathoanatomy and clinical correlates of the immunoinflammatory response following orthopaedic trauma. J Am Acad Orthop Surg 2009;17:255-265
45. Definitions for sepsis and organ failure, and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus. Crit Care Med 1992;20:864-874
46. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. Science 2002;296:301-305
47. Suffredini AF, Fantuzzi G, Badolato R, Oppenheim JJ, O'Grady NP. New insights into the biology of the acute phase response. J Clin Immunol 1999;19:203-214
48. Kleber C, Becker CA, Schmidt-Bleek K, Schaser KD, Haas NP. Are Pentraxin 3 and Transsignaling Early Markers for Immunologic Injury Severity in Polytrauma? A Pilot Study. Clin Orthop Relat Res 2013
49. Kohl J. The role of complement in danger sensing and transmission. Immunol Res 2006;34:157-176
50. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. Chest 2000;118:503-508
51. Hensler T, Sauerland S, Bouillon B, et al. Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase. J Trauma 2002;52:962-970
52. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. Injury 2005;36:691-709
53. Matthes G, Seifert J, Ostermann PA, et al. [Early death of the severely injured patient--A retrospective analysis]. Zentralbl Chir 2001;126:995-999

54. Rose S, Marzi I. Mediators in polytrauma--pathophysiological significance and clinical relevance. *Langenbecks Arch Surg* 1998;383:199-208
55. Rotstein OD. Modeling the two-hit hypothesis for evaluating strategies to prevent organ injury. *J Trauma* 2003;54:S203-206
56. Volpin G, Cohen M, Assaf M, et al. Cytokine Levels (IL-4, IL-6, IL-8 and TGFbeta) as Potential Biomarkers of Systemic Inflammatory Response in Trauma Patients. *Int Orthop* 2014
57. O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, et al. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg* 1995;222:482-490; discussion 490-482
58. West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med* 2002;30:S64-s73
59. Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg* 2012;72:1491-1501
60. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996;125:680-687
61. Pape HC, Auf'm Kolk M, Paffrath T, et al. Primary intramedullary femur fixation in multiple trauma patients with associated. *J Trauma* 1993;34:540-547; discussion 547-548
62. Pape HC, Dwenger A, Regel G, et al. Pulmonary damage after intramedullary femoral nailing in traumatized sheep--is there an effect from different nailing methods? *J Trauma* 1992;33:574-581
63. Stubig T, Mommsen P, Krettek C, et al. [Comparison of early total care (ETC) and damage control orthopedics (DCO) in the treatment of multiple trauma with femoral shaft fractures: benefit and costs]. *Unfallchirurg* 2010;113:923-930
64. Easton R, Balogh ZJ. Peri-operative changes in serum immune markers after trauma: a systematic review. *Injury* 2014;45:934-941
65. Holcomb JB, Jenkins D, Rhee P, et al. Damage control resuscitation: directly addressing the early coagulopathy of trauma. *J Trauma* 2007;62:307-310
66. Larrey D. *Memoires de chirurgicales militaires et campagnes*. Paris.; 1812

67. Stone HH, Strom PR, Mullins RJ. Management of the major coagulopathy with onset during laparotomy. *Ann Surg* 1983;197:532-535
68. Rotondo MF, Schwab CW, McGonigal MD, et al. 'Damage control': an approach for improved survival in exsanguinating penetrating abdominal injury. *J Trauma* 1993;35:375-382; discussion 382-373
69. Harwood PJ, Giannoudis PV, van Griensven M, Krettek C, Pape HC. Alterations in the systemic inflammatory response after early total care and damage control procedures for femoral shaft fracture in severely injured patients. In, *J Trauma. United States*; 2005:446-452; discussion 452-444
70. Pape HC, Rixen D, Morley J, et al. Impact of the method of initial stabilization for femoral shaft fractures in patients with multiple injuries at risk for complications (borderline patients). *Ann Surg* 2007;246:491-499; discussion 499-501
71. Nicola R. Early Total Care versus Damage Control: Current Concepts in the Orthopedic Care of Polytrauma Patients. *ISRN Orthop* 2013;2013:329452
72. Caba-Doussoux P, Leon-Baltasar JL, Garcia-Fuentes C, Resines-Erasun C. Damage control orthopaedics in severe polytrauma with femur fracture. *Injury* 2012;43 Suppl 2:S42-46
73. Zhang Y, Yan W, Collins MA, et al. Interleukin-6 is required for pancreatic cancer progression by promoting MAPK signaling activation and oxidative stress resistance. *Cancer Res* 2013;73:6359-6374
74. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* 2002;4 Suppl 3:S233-242
75. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993;54:1-78
76. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995;86:1243-1254
77. Klouche M, Rose-John S, Schmiedt W, Bhakdi S. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation* 2000;101:1799-1805
78. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-1143
79. Flohe S, Lendemans S, Schade FU, Kreuzfelder E, Waydhas C. Influence of surgical intervention in the immune response of severely injured patients. *Intensive Care Med* 2004;30:96-102

80. Giannoudis PV, Harwood PJ, Loughenbury P, et al. Correlation between IL-6 levels and the systemic inflammatory response score: can an IL-6 cutoff predict a SIRS state? In, *J Trauma*. United States; 2008:646-652
81. Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 2005;175:3463-3468
82. Rotstein OD. Modeling the two-hit hypothesis for evaluating strategies to prevent organ injury after shock/resuscitation. *J Trauma* 2003;54:S203-206
83. Pape HC, Griensven MV, Hildebrand FF, et al. Systemic inflammatory response after extremity or truncal fracture operations. In, *J Trauma*. United States; 2008:1379-1384
84. Strecker W, Gebhard F, Rager J, et al. Early biochemical characterization of soft-tissue trauma and fracture trauma. *J Trauma* 1999;47:358-364
85. Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, et al. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in. *Arch Surg* 2000;135:291-295
86. Nast-Kolb D, Waydhas C, Gippner-Steppert C, et al. Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ. *J Trauma* 1997;42:446-454; discussion 454-445
87. Svoboda P, Kantorova I, Ochmann J. Dynamics of interleukin 1, 2, and 6 and tumor necrosis factor alpha in multiple. *J Trauma* 1994;36:336-340
88. van Griensven M. [Cytokines as biomarkers in polytraumatized patients]. *Unfallchirurg* 2014;117:699-702
89. Hensler T, Heinemann B, Sauerland S, et al. Immunologic alterations associated with high blood transfusion volume after multiple injury: effects on plasmatic cytokine and cytokine receptor concentrations. *Shock* 2003;20:497-502
90. Bogner V, Keil L, Kanz KG, et al. Very early posttraumatic serum alterations are significantly associated to initial massive RBC substitution, injury severity, multiple organ failure and adverse clinical outcome in multiple injured patients. *Eur J Med Res* 2009;14:284-291
91. Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, et al. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? *Arch Surg* 2000;135:291-295
92. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374:1-20
93. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2006;8 Suppl 2:S3

94. Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in. *Faseb j* 2001;15:43-58
95. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* 2006;8 Suppl 2:S2
96. Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, et al. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:11924-11928
97. Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B. Pentraxin 3, a non-redundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity. *Vaccine* 2003;21 Suppl 2:S43-47
98. Klouche M, Brockmeyer N, Knabbe C, Rose-John S. Human herpesvirus 8-derived viral IL-6 induces PTX3 expression in Kaposi's sarcoma cells. *Aids* 2002;16:F9-18
99. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 1997;15:797-819
100. Horn F, Moc I, Schneider N, et al. *Biochemie des Menschen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005
101. Hirano T, Nakajima K, Hibi M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:241-252
102. Camporeale A, Poli V. IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity? *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012;17:2306-2326
103. Mullberg J, Schooltink H, Stoyan T, et al. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol* 1993;23:473-480
104. Symons JA, Young PR, Duff GW. Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1714-1718
105. Garbers C, Thaiss W, Jones GW, et al. Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130. *J Biol Chem* 2011;286:42959-42970
106. Mullberg J, Oberthur W, Lottspeich F, et al. The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J Immunol* 1994;152:4958-4968
107. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* 1994;300 (Pt 2):281-290

108. Schooltink H, Rose-John S. Cytokines as therapeutic drugs. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22:505-516
109. Vollmer P, Walev I, Rose-John S, Bhakdi S. Novel pathogenic mechanism of microbial metalloproteinases: liberation of membrane-anchored molecules in biologically active form exemplified by studies with the human interleukin-6 receptor. *Infect Immun* 1996;64:3646-3651
110. Walev I, Vollmer P, Palmer M, Bhakdi S, Rose-John S. Pore-forming toxins trigger shedding of receptors for interleukin 6 and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7882-7887
111. Horiuchi S, Koyanagi Y, Zhou Y, et al. Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *Eur J Immunol* 1994;24:1945-1948
112. Geisterfer M, Richards CD, Gauldie J. Cytokines oncostatin M and interleukin 1 regulate the expression of the IL-6 receptor (gp80, gp130). *Cytokine* 1995;7:503-509
113. Lust JA, Donovan KA, Kline MP, et al. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 1992;4:96-100
114. Varghese JN, Moritz RL, Lou MZ, et al. Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha -chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15959-15964
115. Kleber C, Becker CA, Malysch T, et al. Temporal profile of inflammatory response to fracture and hemorrhagic shock: Proposal of a novel long-term survival murine multiple trauma model. *J Orthop Res* 2015
116. Mees ST, Toellner S, Marx K, et al. Inhibition of interleukin-6-transsignaling via gp130-Fc in hemorrhagic shock and sepsis. In, *J Surg Res. United States*; 2009:235-242
117. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. In, *J Leukoc Biol. United States*; 2006:227-236
118. Rose-John S. GP130 stimulation and the maintenance of stem cells. *Trends Biotechnol* 2002;20:417-419

119. Aoki Y, Narazaki M, Kishimoto T, Tosato G. Receptor engagement by viral interleukin-6 encoded by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Blood* 2001;98:3042-3049
120. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest* 2011;121:3375-3383
121. Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, et al. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* 1993;82:1120-1126
122. Jostock T, Mullberg J, Ozbek S, et al. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem* 2001;268:160-167
123. Atreya R, Mudter J, Finotto S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000;6:583-588
124. Mackiewicz A, Schooltink H, Heinrich PC, Rose-John S. Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *J Immunol* 1992;149:2021-2027
125. Peters M, Odenthal M, Schirmacher P, et al. Soluble IL-6 receptor leads to a paracrine modulation of the IL-6-induced hepatic acute phase response in double transgenic mice. *J Immunol* 1997;159:1474-1481
126. Jones SA, Richards PJ, Scheller J, Rose-John S. IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25:241-253
127. Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol* 2008;28:1-13
128. Han B, Mura M, Andrade CF, et al. TNFalpha-induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK. In, *J Immunol. United States*; 2005:8303-8311
129. Inoue K, Sugiyama A, Reid PC, et al. Establishment of a high sensitivity plasma assay for human pentraxin3 as a marker for unstable angina pectoris. In, *Arterioscler Thromb Vasc Biol. United States*; 2007:161-167
130. Muller B, Peri G, Doni A, et al. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Crit Care Med* 2001;29:1404-1407

131. Bonacina F, Baragetti A, Catapano AL, Norata GD. Long pentraxin 3: experimental and clinical relevance in cardiovascular diseases. *Mediators Inflamm* 2013;2013:725102
132. Rolph MS, Zimmer S, Bottazzi B, et al. Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:e10-14
133. Alles VV, Bottazzi B, Peri G, et al. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood* 1994;84:3483-3493
134. Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, et al. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 1997;272:32817-32823
135. Klouche M, Peri G, Knabbe C, et al. Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2004;175:221-228
136. Doni A, Peri G, Chieppa M, et al. Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003;33:2886-2893
137. Tillett WS, Francis T. SEROLOGICAL REACTIONS IN PNEUMONIA WITH A NON-PROTEIN SOMATIC FRACTION OF PNEUMOCOCCUS. *J Exp Med* 1930;52:561-571
138. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2004;39:206-217
139. Hausfater P. Biomarkers and infection in the emergency unit. *Med Mal Infect* 2014
140. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* 1999;7:169-177
141. Shrive AK, Cheetham GM, Holden D, et al. Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nat Struct Biol* 1996;3:346-354
142. Agrawal A, Singh PP, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A. Pattern recognition by pentraxins. *Adv Exp Med Biol* 2009;653:98-116
143. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, et al. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early

- atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1386-1392
144. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* 2005;23:337-366
 145. Huttunen R, Hurme M, Aittoniemi J, et al. High plasma level of long pentraxin 3 (PTX3) is associated with fatal disease in bacteremic patients: a prospective cohort study. *PLoS One* 2011;6:e17653
 146. Luchetti MM, Piccinini G, Mantovani A, et al. Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 2000;119:196-202
 147. Varani S, Elvin JA, Yan C, et al. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol Endocrinol* 2002;16:1154-1167
 148. Lee GW, Goodman AR, Lee TH, Vilcek J. Relationship of TSG-14 protein to the pentraxin family of major acute phase proteins. *J Immunol* 1994;153:3700-3707
 149. Wisniewski HG, Vilcek J. Cytokine-induced gene expression at the crossroads of innate immunity, inflammation and fertility: TSG-6 and PTX3/TSG-14. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:129-146
 150. Alberti L, Gilardini L, Zulian A, et al. Expression of long pentraxin PTX3 in human adipose tissue and its relation with cardiovascular risk factors. In, *Atherosclerosis. Ireland*; 2009:455-460
 151. Souza DG, Soares AC, et al. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. *Am J Pathol*; 2002; 160, 5; 1755-65.
 152. Arao K, Fujiwara T, Taniguchi Y, et al. Implications of pentraxin 3 levels in patients with acute aortic dissection. *Heart Vessels* 2014
 153. Kusnierz-Cabala B, Gurda-Duda A, Dumnicka P, et al. Plasma pentraxin 3 concentrations in patients with acute pancreatitis. *Clin Lab* 2013;59:1003-1008
 154. Dias AA, Goodman AR, Dos Santos JL, et al. TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis. *J Leukoc Biol* 2001;69:928-936

155. Inforzato A, Peri G, Doni A, et al. Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation. *Biochemistry* 2006;45:11540-11551
156. Nauta AJ, Daha MR, van Kooten C, Roos A. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol* 2003;24:148-154
157. Hilbert P, Lefering R, Stuttmann R. Trauma care in Germany: major differences in case fatality rates between centers. *Dtsch Arztebl Int* 2010;107:463-469
158. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 1993;270:2957-2963
159. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13:818-829
160. Janssens U, Graf C, Graf J, et al. Evaluation of the SOFA score: a single-center experience of a medical intensive care unit in 303 consecutive patients with predominantly cardiovascular disorders. *Sequential Organ Failure Assessment. Intensive Care Med* 2000;26:1037-1045
161. R&D Systems Europe Ltd. A, UK. Quantikine® Human IL-6sR Immunoassay DR60.
162. R&D Systems Europe Ltd. A, UK. Quantikine® Human Pentraxin 3/ TSG-14 Immunoassay DPTX30.
163. Bortz J. Statistik für Sozialwissenschaftler. In. Berlin: Springer; 1999:146-152
164. Giannoudis PV, Smith MR, Evans RT, Bellamy MC, Guillou PJ. Serum CRP and IL-6 levels after trauma. Not predictive of septic complications in 31 patients. *Acta Orthop Scand* 1998;69:184-188
165. Hoch RC, Rodriguez R, Manning T, et al. Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. *Crit Care Med* 1993;21:839-845
166. Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, Van Damme J, Shenkin A. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin Sci (Lond)* 1990;79:161-165
167. Strecker W, Gebhard F, Perl M, et al. Biochemical characterization of individual injury pattern and injury severity. *Injury* 2003;34:879-887

168. Peters M, Muller AM, Rose-John S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 1998;92:3495-3504
169. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* 2012;8:1237-1247
170. Sarwar N, Butterworth AS, Freitag DF, et al. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies. *Lancet* 2012;379:1205-1213
171. Hingorani AD, Casas JP. The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis. *Lancet* 2012;379:1214-1224
172. Frieling JT, van Deuren M, Wijdenes J, et al. Circulating interleukin-6 receptor in patients with sepsis syndrome. *J Infect Dis* 1995;171:469-472
173. Corbi P, Rahmati M, Delwail A, et al. Circulating soluble gp130, soluble IL-6R, and IL-6 in patients undergoing cardiac surgery, with or without extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;18:98-103
174. Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Tsaganos T, et al. Evidence for the participation of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in the systemic inflammatory response syndrome after multiple trauma. *J Trauma* 2008;65:1385-1390
175. Keel M, Harter L, Reding T, et al. Pancreatic stone protein is highly increased during posttraumatic sepsis and activates neutrophil granulocytes. *Crit Care Med* 2009;37:1642-1648
176. Billeter A, Turina M, Seifert B, et al. Early serum procalcitonin, interleukin-6, and 24-hour lactate clearance: useful indicators of septic infections in severely traumatized patients. *World J Surg* 2009;33:558-566
177. Ciriello V, Gudipati S, Stavrou PZ, et al. Biomarkers predicting sepsis in polytrauma patients: Current evidence. *Injury* 2013;44:1680-1692
178. Egger G, Aigner R, Glasner A, et al. Blood polymorphonuclear leukocyte migration as a predictive marker for infections in severe trauma: comparison with various inflammation parameters. *Intensive Care Med* 2004;30:331-334
179. Flores JM, Jimenez PI, Rincon MD, et al. Early risk factors for sepsis in patients with severe blunt trauma. *Injury* 2001;32:5-12

180. Paunel-Gorgulu A, Flohe S, Scholz M, Windolf J, Logters T. Increased serum soluble Fas after major trauma is associated with delayed neutrophil apoptosis and development of sepsis. *Crit Care* 2011;15:R20
181. Giannoudis PV, Smith RM, Banks RE, et al. Stimulation of inflammatory markers after blunt trauma. *Br J Surg* 1998;85:986-990
182. Bastrup-Birk S, Skjoedt MO, Munthe-Fog L, et al. Pentraxin-3 serum levels are associated with disease severity and mortality in patients with systemic inflammatory response syndrome. *PLoS One* 2013;8:e73119
183. Mauri T, Bellani G, Patroniti N, et al. Persisting high levels of plasma pentraxin 3 over the first days after severe sepsis and septic shock onset are associated with mortality. *Intensive Care Med* 2010;36:621-629
184. Baragetti A, Knoflach M, Cuccovillo I, et al. Pentraxin 3 (PTX3) plasma levels and carotid intima media thickness progression in the general population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013
185. Barkhausen T, Tschernig T, Rosenstiel P, et al. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Crit Care Med* 2011;39:1407-1413
186. Vyas D, Javadi P, Dipasco PJ, et al. Early antibiotic administration but not antibody therapy directed against IL-6 improves survival in septic mice predicted to die on basis of high IL-6 levels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R1048-1053
187. Beeton CA, Chatfield D, Brooks RA, Rushton N. Circulating levels of interleukin-6 and its soluble receptor in patients with head injury and fracture. *J Bone Joint Surg Br* 2004;86:912-917

6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christopher A. Becker, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle von Pentraxin 3 und Interleukin-6-Transsignaling im Rahmen des Polytraumas“ 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 etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, 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 etwaigen erfolgten Publikationen:

Christopher A. Becker hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation

1:

Kleber C, **Becker CA**, Schmidt-Bleek K, Schaser KD, Haas NP.

Are Pentraxin 3 and Transsignaling Early Markers for Immunologic Injury Severity in Polytrauma? A Pilot Study.

Clin Orthop Relat Res. 2013 Sep;471(9):2822-30. doi: 10.1007/s11999-013-2922-x. IF 2,79

Beitrag im Einzelnen: Beitrag zum Studiendesign, Probandenakquirierung, Durchführung der ELISA im Labor, Dokumentation, Tabellen, Abbildungen, Grafiken, Stat. Auswertung, Schreiben von Teilen des Journal-Manuskripts.

2:

Kleber C, **Becker CA**, Malysch T, Reinhold JM, Tsitsilonis S, Duda GN, Schmidt-Bleek K, Schaser KD.

Temporal profile of inflammatory response to fracture and hemorrhagic shock: Proposal of a novel long-term survival murine multiple trauma model.

J Orthop Res. 2015 Mar 2. Doi: 10.1002/jor.22857. IF 2,88

Beitrag im Einzelnen: Beitrag zum Studiendesign, Mitwirkung im Tier-OP, Einschluss der Tiere in Studiensubgruppen, Durchführung der ELISA im Labor, Dokumentation, Stat. Auswertung, Schreiben von Teilen des Manuskripts.

3:

Kleber C, **Becker C**, Van Scherpenzeel KM, Weidemann H, Deja M, Haas NP.

Coincidence of traumatic tracheal rupture accompanied by ARDS: Illustrated by the example of a 17-year-old patient with multiple injuries.

Unfallchirurg 2011 May 18. Impact factor: 0,6

Beitrag im Einzelnen: Aktenauswertung, Literaturliteraturarbeit, Schreiben von Teilen des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

7. Lebenslauf

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

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

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

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

8. Komplette Publikationsliste

8.1 Zeitschriftenartikel

Kleber C, **Becker CA**, Malysch T, Reinhold JM, Tsitsilonis S, Duda GN, Schmidt-Bleek K, Schaser KD (2015)

Temporal profile of inflammatory response to fracture and hemorrhagic shock: Proposal of a novel long-term survival murine multiple trauma model.

J Orthop Res. 2015 Mar 2. Doi: 10.1002/jor.22857. IF 2,88

Kleber C, **Becker CA**, Schmidt-Bleek K, Schaser KD, Haas NP (2013)

Are Pentraxin 3 and Transsignaling Early Markers for Immunologic Injury Severity in Polytrauma? A Pilot Study.

Clin Orthop Relat Res. 2013 Sep;471(9):2822-30. doi: 10.1007/s11999-013-2922-x. IF 2,79

Kleber C, **Becker C**, Van Scherpenzeel KM, Weidemann H, Deja M, Haas NP (2011)

Coincidence of traumatic tracheal rupture accompanied by ARDS: Illustrated by the example

of a 17-year-old patient with multiple injuries.

Unfallchirurg 2011 May 18. Impact factor: 0,6

8.2 Kongressbeiträge

Becker CA, Märdian S, Haas NP, Schaser KD, Kleber C: Notfallmanagement einer offenen Beckenfraktur mit traumatischem Kreislaufstillstand. Vortrag Jahrestagung der Berliner Chir. Gesellschaft 2013

Becker CA, Kleber C: Präklinische Versorgung von Beckenverletzungen. Workshop präklinische Traumaversorgung, Berliner Rettungsdienst-Symposium Nov. 2011 und Nov. 2012, 2013

Becker CA, Kleber C, Schwabe P, Haas NP, Krapohl B, Schaser KD: Erfolgreiches Management eines komplexen Beckentraumas mit Morel-Lavallée-Verletzung nach Überrolltrauma. Vortrag Jahrestagung der Berliner Chir. Gesellschaft 2011.

Kleber C, **Becker C**, Reinhold JM, Malysch T, Tsitsilonis S, Duda GN, Schmidt-Bleek K, Schaser KD: Etablierung und Validierung eines Polytraumamodells der Maus zur in vivo Analyse der posttraumatischen Immunantwort und Interaktion von hämorrhagischen Schock und Frakturheilung. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2014). Berlin, 28.-31.10.2014.

Giesecke MT, **Becker CA**, Schiller RA, Haas NP, Schaser KD, Kleber C: Influence of the pathogen spectrum after traumatic amputation and type 3C open fracture on the initial antibiotic therapy. Küntscher Society 2012, Rostock und EFORT Berlin 2012.

Kleber C, **Becker CA**, Haas NP, Schaser KD: Polytrauma and Open fracture: A dangerous combination, complicating the clinical course of trauma patients. 129. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin.

9. Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die mich in jeglicher Art und Weise bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt, ermutigt und gefördert haben. Insbesondere möchte ich folgende Personen hervorheben:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. N.P. Haas (Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie, Charité – Universitätsmedizin Berlin)

Prof. Dr. med. K.-D. Schaser (Direktor des Universitätszentrums für Orthopädie und Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Dresden, vorher: stellv. Klinikdirektor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie, Charité – Universitätsmedizin Berlin)

Priv.-Doz. Dr. med. C. Kleber (Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie, Charité – Universitätsmedizin Berlin)

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Polytrauma (Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie, Charité – Universitätsmedizin Berlin)

Meiner Familie und Freunden

Großer Dank gilt meinem Freund und Mentor Priv.-Doz. Dr. med. Christian Kleber, für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung, Motivation, konstruktive Kritik und stetige Ermutigung ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die bedingungslose Unterstützung in jeder Situation.