

## A. EINLEITUNG

---

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Beschreibung von Zusammenhängen zwischen schweren Unfällen, dem zeitlichen Verlauf verschiedener Botenstoffe des Immunsystems und der Entwicklung von Komplikationen im Heilverlauf.

Epidemiologische Untersuchungen zeigen uns, dass in westlichen Ländern Traumata und ihre Folgen den dritten Platz in der Rangliste für Todesursachen einnehmen. Bei den unter 45-jährigen ist der Unfall mit seinen Folgen sogar die Haupttodesursache (Baker et al., 1980). Die auf Kriegsschauplätzen gewonnenen Erfahrungen zeigen uns die folgende Entwicklung:

Im ersten Weltkrieg verstarben die meisten Verwundeten noch an nicht substituierten Blutverlusten und im zweiten Weltkrieg, nach der Einführung von Bluttransfusionen, am posttraumatischen Nierenversagen, welches dann im Koreakrieg durch eine adäquate Therapie in den Griff zu bekommen war. Vor 50 Jahren war der akute hämorrhagische Schock die Ursache für über 90% aller Todesfälle nach einem Unfall (Friedl et al., 1992). Später, im Vietnamkrieg, trat das ARDS (adult respiratory distress syndrome) in den Vordergrund. Auch hierfür konnten Therapieschemata etabliert werden und so stellt heute das Multiorganversagen (seit 1992 Multiorgan dysfunktionssyndrom = MODS) die wichtigste und komplexeste Spätkomplikation mit hoher Letalität nach schweren Verletzungen dar (Ertel et al., 1994).

Die Notfall- und Intensivmedizin machte dann enorme Fortschritte, zum Beispiel durch effektive medikamentöse Kreislaufunterstützung, Volumenersatz, Frühintubation, verbessertes notfallmedizinisches und unfallchirurgisches Management, Vitaldatenmonitoring und ein effektives Rettungssystem. Diese Maßnahmen konnten in den letzten Jahren die Frühmortalität nach einer schweren Verletzung, vor allem in Folge eines hypovolämischen oder kardiogenen Schocks, erfolgreich senken (Miller 1982).

Faist und Mitarbeiter zeigten, dass die Mortalität der polytraumatisierten Patienten in engem Zusammenhang mit der Zahl der dysfunktionalen Organe steht (Faist et al., 1983). Diese vor einigen Jahrzehnten noch unbekannt Phänomene sind also die Ursachen für den „late hospital death“, den so genannten zweiten Mortalitäts Gipfel nach Trauma (Nieuwenhoven et al., 1998). Dabei ist die Mortalität signifikant erhöht bei Patienten mit initial hypovolämischem Schock und nach Massentransfusionen.

Septisch-toxisches Multiorganversagen erreicht, abhängig wiederum von der Zahl der betroffenen Organe, eine Letalität von 30% bis 100%. Das ARDS tritt dabei meist als erste Form eines Organversagens auf, gefolgt von Leberversagen, gastrointestinaler Dysfunktionen, Nierenversagen und kardialer Dysfunktion (Nuytinck et al., 1988). Posttraumatisch werden dabei häufig eine verminderte Reaktivität der T-Lymphozyten und eine Suppression der Funktion der neutrophilen Granulozyten beobachtet (Guillou et al., 1993). Grob beschreibt den Zusammenhang zwischen schwerem Polytrauma, der Entwicklung einer Infektion bei 67% der untersuchten Patienten, die in 26% der Fälle zu Sepsis und in 11% zum Tod führt, und dem posttraumatischen Immundefektsyndrom (Grob et al., 1987).

Regel und Tscherne (1991) ziehen aus einer prospektiven Studie an 38 polytraumatisierten Patienten folgende Schlussfolgerungen: bereits initial ist ein generalisierter Zellschaden nachweisbar. Histologische Ergebnisse sprechen dabei sowohl für eine hypoxische wie auch für eine "inflammatorische Reaktion" der Organe. Klinisch fassbare Funktionsstörungen treten jedoch erst ab dem vierten posttraumatischen Tag in Erscheinung. Die initiale reversible Organfunktionsstörung kann ab dem vierten Tag in ein irreversibles, meist letal endendes MODS übergehen. Dabei hat das direkte Organtrauma keine Beziehung zur späteren Entwicklung eines MODS, und die Sepsis zeigt keinen unmittelbaren zeitlichen Zusammenhang zum MODS. Sie postulieren, dass vor allem Verletzungsart und -schwere sowie die Höhe des initialen Blutverlustes als kritische Faktoren angesehen werden können. Endotoxinämie, RES (Retikulo-Endotheliales System)- Blockade und nachfolgende Schäden des Kapillarendothels aller Organe tragen also zur Entstehung eines irreversiblen und letalen MODS bei.

Einmal klinisch manifestiert, erweist sich das MODS häufig als therapieresistent und bedingt eine hohe Letalität (Donnelly et al., 1994). Die generalisierte Immunantwort auf ein traumatisches Geschehen kann nämlich überschießen und entspricht einem von Paul Ehrlich und J. Morgenroth 1901 in ihrer Schrift "Über Hämolytins" bezüglich der zerstörerischen Auswirkungen autoimmuner Prozesse beschriebenen Phänomen "...dass man gewissermaßen berechtigt wäre, von einem horror autotoxicus des Organismus zu sprechen" (zitiert nach Baue 1992).

Zahlreiche Untersuchungen konnten das Phänomen dieser inflammatorischen, nicht-septischen Akut- Phase- Antwort nach Polytrauma näher beschreiben. Dabei konnten auf molekularer Ebene zunehmend detailliert die beteiligten Faktoren und

ihre Rolle identifiziert werden. Das Anlocken von Leukozyten und ihr Austritt aus der Gefäßbahn in das Gewebe über eine Leukozyten – Endothelzell – Interaktion im weitesten Sinne stehen im Mittelpunkt des inflammatorischen Geschehens. Dabei gelten die Selektine als die frühesten bekannten Induktoren der Bindung von Leukozyten an Endothelzellen.

Es können drei Gruppen von Adhäsionsmolekülen differenziert werden: Selektine, Integrine und die Immunglobulin-ähnlichen. Bei den Selektinen handelt es sich um eine Klasse von Adhäsionsmolekülen, die löslich und zellgebunden vorkommen. Das CD62P (PADGEM, GMP140 = granule membrane protein = P-Selektin), CD62E (ELAM-1= endothelial adhesion molecule-1 = E-Selektin) und das CD62L (MEL14, ELAM1, LECAM-1= L-Selektin) bilden die Selektinfamilie (Bajorath 1995). Ihren Namen haben die Mitglieder der Selektinfamilie dem Zelltyp, auf dem sie zuerst beschrieben werden konnten, zu verdanken: L-(=leukocyte), P-(=platelet) und E-(=endothelial) Selektin.

Zusätzlich zu den auf den Zellmembranen exprimierten Selektinen werden lösliche Formen dieser Moleküle im Plasma nachgewiesen: s(=soluble)CD62L, sCD62P, sCD62E.

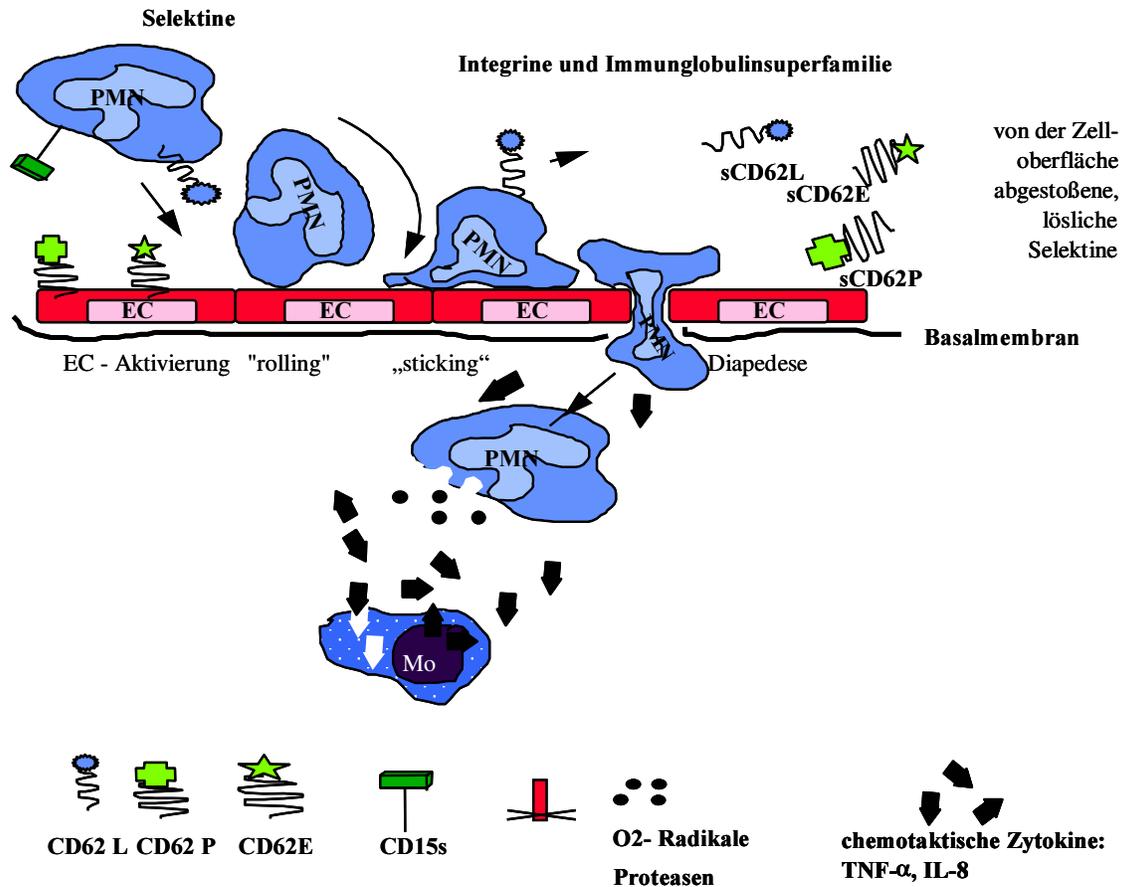
Selektine sind ein wichtiger Bestandteil der Entzündungsreaktion, weil sie durch Vermittlung einer selektiven Leukozyten - Endothelzell - Thrombozyten - Interaktion mittels Adhäsion an Rezeptoren auf den Zielzellen Einfluss auf das leukozytäre Flussverhalten und auf die Regulation der Transmigration von Entzündungszellen nehmen (McEver et al., 1991). Die Selektine beeinflussen also in erster Linie das Flussverhalten der Leukozyten, und sie bilden im Rahmen einer Entzündungsreaktion ein Bindeglied im Zusammenspiel der Leukozyten mit den Zellen der Gefäßwände.

Die Transmigration der Leukozyten ist als Zwei-Schritt-Modell beschrieben und in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Die Rolle der Selektinfamilie liegt dabei im ersten Schritt, der Vermittlung des initialen "rolling" der Granulozyten entlang der aktivierten Endothelzellen (Smith et al., 1996). Hierbei sind insbesondere das E-Selektin und das P-Selektin (auf den Endothelzellen) und ein Immunglobulin auf den Zellmembranen der zirkulierenden Zellen, das ICAM-1, von entscheidender Bedeutung, da gezeigt werden konnte, dass anti-E-Selektin und anti-ICAM-1 die Transmigration der Neutrophilen um über 90% reduzieren kann (Kishimoto et al., 1991).

Das sCD62L und das sCD62E stellen die von der Zelloberfläche abgestoßene Form des zellgebundenen Moleküls dar, während das sCD62P durch alternatives Splicing schon in der Phase der Translation als lösliches Zytokin bestimmt wird und in intrazytoplasmatischen Granula gespeichert wird, woraus es erst auf bestimmte Reize hin (Akut-Phase-Proteine wie Thrombin oder Histamin) ausgeschüttet wird.

Die von L-Selektin und E-Selektin abhängige Zell-Endothelzellbindung ist ein CD11/CD18-unabhängiger Vorgang, jedoch benötigen L-Selektin-positive Zellen zur Bindung an Rezeptoren das Sialyl-Lewis-X Epitop (Malik et al., 1993). Das lösliche L-Selektin moduliert diese Vorgänge durch Bindung an E- und P-Selektin auf Endothelzellen. Das E-Selektin stellt ein entscheidendes Adhäsionsmolekül für die Bindung von Neutrophilen, Monozyten und T-Lymphozyten an Endothelzellen dar. Dieses Phänomen wird als "rolling" bezeichnet, woran E-, L- und P-Selektin beteiligt sind (Tözeren et al., 1992). "Rollende" Leukozyten halten plötzlich ein, binden fest am Endothel und transmigrieren.

Dieser zweite Schritt, das so genannte „sticking“, benötigt auf den Leukozytenoberflächen die Beteiligung der Integrine (CD11a/CD18 und CD11b/CD18), auf der Endothelzelloberfläche ICAM-1 und chemotaktisch wirkende Zytokine wie Interleukin-8 und TNF- $\alpha$ . Dies ermöglicht den Zellen die Diapedese nach extravasal und führt konsekutiv zu Organschädigungen (Redl et al., 1993). Die Adhäsion der PMN an die Endothelzellen ist dabei für den Integritätsverlust der Endothelbarriere (Auflockerung der tight junctions) essentiell (Marcus et al., 1997).



**Abbildung 1** Schematische Darstellung vom „rolling“ über „sticking“ zur Diapedese unter Beteiligung der Adhäsionsmoleküle. Die Abbildung wurde selbst erstellt.

### Bisherige Untersuchungen zum Thema Trauma und Selektine

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich mit dem Thema Selektine und Trauma bereits beschäftigt. Siemiatkowski untersuchte vierunddreißig polytraumatisierte Patienten und fand initial bei allen erhöhte Werte für das lösliche E- und P-Selektin. Die höchsten Werte konnten bei Patienten mit besonders schlechter Prognose bzw. später Verstorbenen ermittelt werden. Das L-Selektin war bei allen untersuchten Patienten erniedrigt (Siemiatkowski et al., 2001).

Kvasnicka fand erhöhte Werte der löslichen Zelladhäsionsmoleküle sE-Selektin und sICAM-1 bei polytraumatisierten Patienten (Kvasnicka et al., 1998).

Stengel zeigte in einer Metaanalyse den prognostischen Wert des löslichen L-Selektin nach stumpfem Trauma. Im frühen Verlauf nach Trauma zeigten sich in drei von vier Studien erniedrigte Serumwerte des L-Selektin bei Patienten, die später ein

ARDS bzw. Lungenversagen entwickelten sowie bei den Nicht-Überlebenden (Stengel et al., 2005). Den Zusammenhang zwischen Trauma, frühen L-Selektin Werten und Geschlecht betrachtete Van Griensven an 48 Polytraumatisierten. Dabei fiel bei männlichen Patienten mit einem MODS das L-Selektin schnell und deutlich ab, bei Patienten ohne MODS stieg es an. Bei den weiblichen Patienten, auch mit MODS, stieg das L-Selektin posttraumatisch an (van Griensven et al., 2004).

Rainer untersuchte an 164 Traumapatienten den Zusammenhang zwischen der L-Selektin-Expression auf Monozyten und der Entwicklung eines MODS. Dabei wurden die höchsten Werte bei Patienten gemessen, die ein MODS entwickelten (Rainer et al., 2001)

Fujimi bestimmte bei polytraumatisierten Patienten über zwölf Tage lösliches L-Selektin und lösliches E-Selektin sowie die Expression des L-Selektin auf Granulozyten (PMNs). Am 2. bis 5. Tag nach Trauma konnten erhöhte Werte für das L-Selektin gemessen werden, nicht jedoch für das E-Selektin (Fujimi et al., 2003).

Gando zeigte an Polytraumatisierten eine erhöhte Inzidenz für ein ARDS bzw. MODS, wenn posttraumatisch ein DIC (disseminierte intrvasale Coagulopathie) aufgetreten ist. Bei diesen Patienten konnten erhöhte Werte für die löslichen P- und E-Selektine nachgewiesen werden (Gando et al., 2002).

Rohr untersuchte die Rolle des E-Selektin im septischen Geschehen. Dabei hatten septische Patienten signifikant höhere sE-Selektin-Spiegel als nicht septische Patienten. E-Selektin wird nur vom aktivierten Endothel exprimiert und ist damit ein spezifischer Marker für die funktionelle und morphologische Endothelschädigung bei Sepsis. Erhöhte sE-Selektin-Spiegel im Blut können frühzeitig eine Aktivierung des Endothels anzeigen und korrelieren bei septischen Patienten mit dem Outcome (Rohr 1998).

Pan postuliert, die Mehrexpression von L-Selektin auf Neutrophilen nach Trauma steuere die Adhäsion der Leukozyten an den Gefäßwänden und habe einen positiven Effekt auf die Wundheilung und Immunabwehr (Pan et al., 2002).

Cowley beschrieb an 21 Patienten mit SIRS erhöhte Werte des löslichen E-Selektin (Cowley et al., 1994). Nach Trauma kann in allen Organen eine vermehrte Expression von P-Selektin nachgewiesen werden (Armstead et al., 1997).

Für das lösliche L-Selektin ist ein signifikanter Zusammenhang zwischen niedrigen Plasmaspiegeln und der Entwicklung eines Lungenschadens bis hin zum ARDS

beschrieben (Donnelly et al., 1994). Dabei wurde bei 82 ARDS-gefährdeten Patienten (Polytrauma, Pankreatitiden, Darmperforationen) ein Zusammenhang zwischen dem Organversagensscore nach Goris und den niedrigen sL-Selektinspiegeln, nicht aber sE- und sP-Selektinspiegeln, gezeigt. Aktivierte Endothelzellen exprimieren vermehrt einen sL-Selektin-Liganden in vitro und auch die Bindung des sL-Selektin an HEV (high endothelial venules) in Entzündungsgebieten ist immunhistochemisch nachgewiesen (Spertini et al., 1992). So kann ein erniedrigter Spiegel des sL-Selektin als Marker für eine generalisierte Endothelzellaktivierung angesehen werden.

Durch die Verabreichung eines zweibindigen Antikörpers gegen L- und E-Selektin konnte im Schweinmodell die Entwicklung eines Lungenschadens/ ARDS unter septischen Kautelen deutlich gemindert werden. Dies legt eine entscheidende Rolle dieser Selektine in der Pathogenese eines ARDS nahe (Ridings et al., 1995).

Die bisherigen Untersuchungen zum Thema zeigen also folgende Tendenz: E- und P-Selektin sind eher erhöht nach Trauma und bei den komplizierten Krankheitsverläufen bzw. schlechtem Outcome, das L-Selektin ist dann eher erniedrigt.

Im Folgenden werden die drei Selektine einzeln vorgestellt

### **A.1. L-Selektin**

Das Molekül CD62L (= L-Selektin, Leu-8, LAM-1, LECAM-1, leukocyte adhesion molecule-1, TQ-1) ist in seiner lymphozytär gebundenen Form 74 kDa, in seiner an Neutrophile gebundenen Form 90 - 100 kDa groß. Es wird auf Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Thymozyten, Monozyten, Eosino- und Basophilen sowie natürlichen Killerzellen exprimiert und vermittelt die Bindung von Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen an Endothel während "capture" und "rolling" und die Bindung von Lymphoyten an HEV (High Endothelial Venules) während des "lymphocyte homings". CD62L wurde ebenfalls auf hämatopoetischen Vorläuferzellen identifiziert (Simon 1993). Die Liganden des L-Selektin sind MAdCAM-1 (58 - 66 kDa) und GlyCAM-1 (50 kDa) auf HEV und CD34 (105 - 120 kDa) auf Endothelzellen. Abbildung 2 zeigt die Domänenstruktur des L-Selektin.



**Abbildung 2** Domänenstruktur des L-Selektin

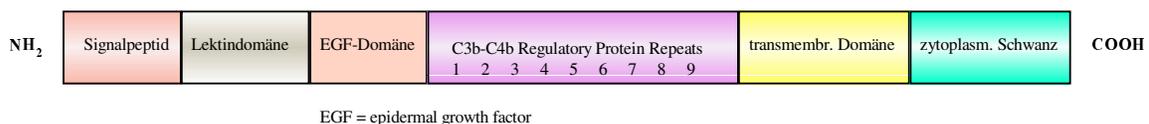
L-Selektin wurde auf Endothelzellen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, NK-Zellen, Zellen der myeloischen Reihe (Granulozyten, Monozyten) und Thrombozyten nachgewiesen (Shaw et al., 1995).

Die lösliche Variante des L-Selektin kann im Plasma und in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden und wird mit folgenden Krankheitsbildern in Verbindung gebracht: Rheumatoide Arthritis, Diabetes Mellitus, HIV, Sepsis (Berlin et al., 1993, Lasky et al., 1992).

## A.2. P-Selektin

Das in der zellgebundenen Variante 140 kDa messende Molekül CD62P (= P-Selektin, PADGEM, GMP 140 = granule membrane protein 140, LECAM-3) wird auf Thrombozyten, Endothelzellen und Megakaryozyten exprimiert. Es vermittelt die Bindung von Monozyten und Neutrophilen an aktivierte Thrombozyten und Endothelzellen während "capture" und "rolling". Seine Liganden sind das Mucin-ähnliche 220 kDa Dimer PSGL-1 auf Neutrophilen, Monozyten, Thrombozyten und Natürliche Killerzellen, das CD15 (Lewis-X-Trisaccharid), sCD15 (Sialysiertes Lewis-X), Gal1,4(Fuc1,3)GlcNAc, sulfatierte Polysaccharide (zB. Heparin) und sulfatierte Glykolipide. Für die Bindung von Neutrophilen an P-Selektin stellt das sCD15 einen notwendigen Kofaktor dar (Carlos et al., 1994). Auf den Reiz durch Akut-Phase-Proteine wie Histamin oder Thrombin hin wird P-Selektin schnell an die Zellmembran mobilisiert, um Neutrophile und Monozyten zu binden (Lawrence et al., 1993). In gesunden Individuen beträgt die Plasmakonzentration 0,15 - 0,30 µg/ml.

Durch alternatives splicing entstehen zwei Varianten des P-Selektin, darunter eine lösliche Form mit fehlender transmembranöser Domäne (Molekulargewicht: 122kD), die in Thrombozyten in  $\alpha$ -Granula und in Endothelzellen in den Wiebel-Palade-Körperchen gespeichert werden. In gesunden Individuen sind 20% -40% der Bindungsstellen für P-Selektin auf Neutrophilen besetzt. Abbildung 3 zeigt die Domänenstruktur des P-Selektin.



**Abbildung 3** Domänenstruktur des P-Selektin (McEver 1991)

Die lösliche Variante des P-Selektin im Plasma, das sP-Selektin, wird mit Thrombozytopathien und Leberkrankheiten in Verbindung gebracht (Johnston et al., 1989, Sako et al., 1993).

### A.3. E-Selektin

Das Molekül CD62E (= E-Selektin, ELAM-1, Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1, LECAM-2) ist in seiner zellgebundenen Variante 107 - 115 kDa (es existieren unterschiedlich glykosylierte Formen) groß und wird auf Endothelzellen als Antwort auf eine TNF- $\alpha$  Stimulation exprimiert (Redl et al., 1993). Es vermittelt die Adhäsion von Neutrophilen, Monozyten, einigen memory T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (Malik 1993) am Endothel während "capture" und "rolling". Der E-Selektin-Ligand stellt ein sialysiertes, fucosyliertes Molekül auf neutrophilen Granulozyten, CD4+ Gedächtnis T-Zellen und Monozyten dar. Abbildung 4 zeigt die Domänenstruktur des E-Selektin.



**Abbildung 4** Domänenstruktur des E-Selektin

Das E-Selektin stellt ein entscheidendes Adhäsionsmolekül für die Bindung von Neutrophilen, Monozyten und T-Lymphozyten an Endothelzellen dar. Die Adhäsion der PMN an die Endothelzellen ist dabei für die Auflockerung der tight junctions und somit für den Integritätsverlust der Endothelzellbarriere essentiell (Marcus et al., 1997). Die lösliche Variante des E-Selektin im Plasma, das sE-Selektin, wird mit den folgenden Krankheitsbildern in Verbindung gebracht: Malaria, Diabetes, Hypertonus, COPD, Colitis ulcerosa, Nephropathien, bakterielle Meningitis, Sepsis, systemischem Lupus erythematoses.

E-Selektin kann in seiner auf Endothelzelloberflächen gebundenen Form nachgewiesen werden bei Erythemen, Wegener'scher Granulomatose, dem kolorektalen Karzinom, Psoriasis, nach Flavivirus- und CMV-Infektion und in rheumatoidem Synovialgewebe (Brandley et al., 1990; Gearing et al., 1993; Cellner et al., 1997; Kobayashi et al., 1997; Fassbender et al., 1997).

## **B. FRAGESTELLUNG**

---

Traumapatienten unterliegen einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Sepsis oder eines MODS. Diese Komplikationen sind mit erhöhter Letalität verbunden. Wie dargestellt sind die Selektine am Pathomechanismus dieser Vorgänge beteiligt. Die bisherigen Untersuchungen führten zu teils sich widersprechenden Ergebnissen bezüglich dem Verlauf und dem prognostischen Wert frühzeitiger Bestimmungen von L-, E- und P-Selektin nach schwerem Trauma.

Ziel dieser Studie ist es, durch eine engmaschige Erfassung den Verlauf der löslichen Selektine (E-, P- und L-Selektin) sowie des zellgebundenen L-Selektin auf B- und T-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, insbesondere während der sehr frühen Phase nach schwerem Polytrauma, zu beschreiben und Zusammenhänge mit der klinischen Situation der Patienten darzustellen.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

Gibt es reproduzierbare Veränderungen im Verlauf der gemessenen Selektine?

Besteht eine Abhängigkeit der Verläufe der gemessenen Selektine von Verletzungsschwere und Verletzungsmuster?

Zeigen die gemessenen Parameter einen Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf, bzw. den etablierten intensivmedizinischen Verlaufscores besonders unter Berücksichtigung des MODS?

Besteht ein Zusammenhang zwischen den Selektinkonzentrationen und dem Outcome?