

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München
Direktor: Prof. Dr. Peter Biberthaler

Untersuchung der Expression von Interleukin 17 auf Th17-Zellen und regulatorischen CD4+ T-Zellen
und Thrombozytenfunktionsdiagnostik bei polytraumatisierten Patienten im Rahmen einer klinischen
Pilotstudie

Friederike Lea Hefe

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizinischen Wissenschaft
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Dirk Busch

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Marc Hanschen
2. Prof. Kathrin Schumann, Ph.D.

Die Dissertation wurde am 17.09.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 02.01.2020 angenommen.

Μηδὲν ἄγαν. – Nichts im Übermaß.
(überlieferte Inschrift am Eingang des Apollontempels in Delphi)

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	EINLEITUNG.....	4
2.1	HINTERGRUND	4
2.1.1	<i>Polytrauma</i>	<i>4</i>
2.1.2	<i>Interleukin 17A.....</i>	<i>7</i>
2.1.3	<i>Th17-Zellen.....</i>	<i>7</i>
2.1.4	<i>Regulatorische CD4+ T-Zellen</i>	<i>9</i>
2.1.5	<i>Thrombozyten und Gerinnung.....</i>	<i>11</i>
2.2	STAND DER FORSCHUNG – RELEVANZ.....	13
3	FRAGESTELLUNG.....	15
4	MATERIAL UND METHODEN	16
4.1	STUDIENDESIGN.....	16
4.2	PATIENTEN.....	16
4.2.1	<i>Rekrutierung</i>	<i>16</i>
4.2.2	<i>Probengewinnung und Datenerhebung.....</i>	<i>17</i>
4.3	KONTROLLPROBANDEN	17
4.4	DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	18
4.4.1	<i>Prinzip</i>	<i>18</i>
4.4.2	<i>Besonderheiten - Begrifflichkeiten</i>	<i>19</i>
4.4.3	<i>Methodik.....</i>	<i>20</i>
4.4.3.1	<i>Th17/ CD4+ Treg</i>	<i>20</i>
4.4.3.2	<i>Thrombozyten</i>	<i>22</i>
4.4.3.3	<i>Thrombozyten – Positivkontrolle.....</i>	<i>23</i>
4.4.4	<i>Auswertung</i>	<i>24</i>
4.4.4.1	<i>Th17/ CD+ Treg</i>	<i>24</i>
4.4.4.2	<i>Thrombozyten</i>	<i>26</i>
4.5	ROTEM® THROMBELASTOMETRIE	27
4.5.1	<i>Prinzip</i>	<i>27</i>
4.5.2	<i>Messansätze.....</i>	<i>27</i>
4.5.3	<i>Parameter.....</i>	<i>28</i>
4.5.4	<i>Methodik.....</i>	<i>29</i>
4.5.5	<i>Auswertung.....</i>	<i>29</i>
4.6	LUMINEX® MAGPIX-TECHNOLOGIE.....	30
4.6.1	<i>Prinzip</i>	<i>30</i>
4.6.2	<i>Auswahl des Kits.....</i>	<i>30</i>
4.6.3	<i>Methodik.....</i>	<i>30</i>
4.6.3.1	<i>Probenaufbereitung</i>	<i>30</i>
4.6.3.2	<i>Messung</i>	<i>31</i>
4.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG	32

5	ERGEBNISSE	33
5.1	PATIENTENKOLLEKTIV	33
5.2	FEHLENDE MESSWERTE	33
5.3	KONTROLLPROBANDEN	35
5.4	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	35
5.4.1	<i>Th17/ CD4+ Tregs</i>	35
5.4.1.1	Th17/CD4+-Quotient, CD4+ Treg/ CD4+-Quotient, Th17/ CD4+Treg-Quotient	35
5.4.1.2	IL-17A-Expression	39
5.4.2	<i>Thrombozyten</i>	42
5.4.2.1	Positivkontrolle: Stimulation mit TRAP-6	42
5.4.2.2	Thrombozytäre Expression von CD62L, CD63, TLR9	43
5.5	ROTATIONSTHROMBELASTOMETRIE	44
5.5.1	<i>Extem</i>	44
5.5.2	<i>Intem</i>	46
5.5.3	<i>Fibtem</i>	47
5.5.4	<i>Extem – Fibtem</i>	48
5.6	THROMBOZYTENZAHL	49
5.7	ZYTOKINMESSUNG MITTELS LUMINEX MAGPIX®	50
5.7.1	<i>Ausgeschlossene Zytokine</i>	50
5.7.2	<i>IFN-γ</i>	52
5.7.3	<i>IL-18</i>	53
5.8	EINFLUSSFAKTOREN	54
5.9	VERGLEICH MIT GESUNDER KONTROLLGRUPPE	55
5.9.1	<i>Durchflusszytometrie an Th17-Zellen und CD4+ Tregs</i>	56
5.9.2	<i>Durchflusszytometrie an Thrombozyten</i>	57
5.9.3	<i>MCF-Werte in der Thrombelastometrie</i>	58
5.9.4	<i>Luminex-Analyse der Serumzytokinkonzentrationen</i>	61
6	DISKUSSION	62
6.1	TH17-ZELLZAHL, CD4+ TREG-ZELLZAHL	62
6.2	IL-17A-EXPRESSION AUF TH17-ZELLEN UND CD4+ TREGS	64
6.3	THROMBOZYTENZAHL, EXPRESSIONSPROFIL DER THROMBOZYTEN UND THROMBELASTOMETRIE: MCF IN EXTEM, INTEM, FIBTEM, THROMBOZYTÄRE MCF	67
6.4	SERUMSPIEGEL VON IFN- γ UND IL-18	69
6.5	EFFEKTE DER POTENTIELLEN EINFLUSSFAKTOREN ALTER, GESCHLECHT, VERLETZUNGSSCHWERE	70
7	LIMITATIONEN UND SCHLUSSFOLGERUNG	74
8	ZUSAMMENFASSUNG	76
9	LITERATURVERZEICHNIS	78
10	DANKSAGUNG	88

Abkürzungsverzeichnis

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

95% CI	<i>95% confidence interval</i>
Abb.	Abbildung
AIS	<i>Abbreviated injury scale</i>
APACHE II	<i>Acute physiology and chronic health evaluation II</i>
APC	Allophycocyanin <i>Antigen-presenting cell</i>
aPTT	Aktiviert partielle Thromboplastinzeit
B	Regressionskoeffizient
CARS	<i>Compensatory anti-inflammatory response syndrome</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD4+ iTreg	Induzierte regulatorische CD4+ T-Zelle
CD4+ nTreg	Natürliche regulatorische CD4+ T-Zelle
CFT	<i>Clot formation time</i> , Gerinnselbildungszeit
CT	<i>Clotting time</i> , Gerinnungszeit
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DCO	<i>Damage control orthopedics</i>
DGU	Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiamintetraessigsäure
ETC	<i>Early total care</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
g	Gramm Erdbeschleunigung
GCS	<i>Glasgow coma scale</i>
GHE	<i>Global health estimates</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte monocyte colony stimulating factor</i>
GP	Glykoprotein
h	<i>Hours</i> , Stunden
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IL-17	Interleukin 17
IL-17RA	Interleukin-17-Rezeptor A

Abkürzungsverzeichnis

INR	<i>International normalized ratio</i>
IPEX	<i>Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked</i>
ISS	<i>Injury severity score</i>
LI	<i>Lysis index, Lyseindex</i>
LLOQ	<i>Lowest limit of quantification</i>
MARS	<i>Mixed antagonist response syndrome</i>
MCF	<i>Maximum clot firmness, Maximale Gerinnselfestigkeit</i>
MFI	<i>Mediane Fluoreszenzintensität</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
ML	<i>Maximum lysis, Maximale Lyse</i>
ml	<i>Milliliter</i>
mm	<i>Millimeter</i>
MODS	<i>Multiple organ dysfunction syndrome</i>
MOV/MOF	<i>Multiorganversagen / Multiple organ failure</i>
MW	<i>Mittelwert</i>
n	<i>Number, Anzahl</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
pg	<i>Pikogramm</i>
PRP	<i>Plättchenreiches Plasma</i>
ROR α	<i>Retinoic acid related orphan receptor alpha</i>
ROR γ t	<i>Retinoic acid related orphan receptor gamma thymus</i>
s.	<i>siehe</i>
SD	<i>Standard deviation, Standardabweichung</i>
SE	<i>Standard error, Standardfehler</i>
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
SOFA	<i>Sequential organ failure assessment</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
Stat3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th17	<i>T Helfer 17</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF-RII	<i>Tumor necrosis factor-receptor II</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>

Abkürzungsverzeichnis

TRAP-6	<i>Thrombin receptor activating peptide 6</i>
USA	<i>United States of America</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
µl	Mikroliter

Einleitung

2 EINLEITUNG

2.1 HINTERGRUND

2.1.1 Polytrauma

Von einem Polytrauma nach der bekannt gewordenen Definition des österreichischen Unfallchirurgen Harald Tscherne spricht man, wenn ein Patient gleichzeitig an mehreren Körperregionen Verletzungen erlitten hat, wobei mindestens eine der Verletzungen oder die Kombination aus mehreren Verletzungen potentiell lebensbedrohlich ist. Dabei stellt die Versorgung dieses Patientenkollektivs weiterhin eine große Herausforderung dar, da einerseits schnelles, effektives und standardisiertes Arbeiten erforderlich ist, andererseits die Therapie dennoch patientenindividuell und -angepasst erfolgen muss (Keel and Trentz 2005).

Eine Einordnung der Patienten bezüglich ihrer Prognose wird ermöglicht durch verschiedene Scoring-Systeme, der bekannteste im Bereich der Versorgung Schwerverletzter ist der *Injury severity score* (ISS). Dieser berechnet sich aus dem *Abbreviated injury scale* (AIS), welcher jeder Verletzung gemäß ihrer Schwere einen Punktwert zwischen eins und sechs zuordnet, wobei sechs Punkte einer nicht behandelbaren, sicher tödlichen Verletzung entsprechen. Für die Ermittlung des ISS werden die drei höchsten AIS-Punktwerte in jeweils unterschiedlichen Körperregionen zunächst quadriert und dann addiert, so ergibt sich ein ISS zwischen eins und maximal 75. Sollte mindestens einer Verletzung ein AIS von sechs zugeordnet worden sein, ist definitionsgemäß der ISS auf 75 zu setzen. Von einem Polytrauma spricht man, wenn der ISS eines Patienten mindestens 16 Punkte erreicht.

Die häufigste Ursache für ein Polytrauma sind laut dem Jahresbericht 2017 des Traumaregisters der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU®) mit etwa 50 % Verkehrsunfälle, gefolgt von Stürzen (39 %) und Suizidversuchen (5 %). Den Verletzungen liegt also in Deutschland in der überwiegenden Zahl der Fälle (96 %) ein stumpfes Trauma zugrunde. Weltweit führen außerdem gemäß den Global Health Estimates (GHE) der World Health Organization (WHO) von 2016 Verkehrsunfälle die Todesursachenstatistik in der Altersgruppe der 15-29-jährigen an und belegen über alle Altersgruppen hinweg immerhin Platz acht der häufigsten Todesursachen. Im Vergleich dazu lagen laut GHE der WHO die Verkehrsunfälle im Jahr 2000 nur auf Platz zehn.

Die Mortalität bei Polytraumatisierung hängt von verschiedenen Faktoren ab, die Gegenstand aktueller Forschung sind. So sind zum einen patientenspezifische Faktoren wie Verletzungsschwere und Alter relevant, aber auch äußere Umstände wie Art und zeitlicher Ablauf der Erstversorgung sowie Ausstattung des Krankenhauses spielen eine Rolle (Bardenheuer, Obertacke et al. 2000, Zacher, Kanz et al. 2015). Erreicht der schwerverletzte Patient lebend das Krankenhaus, beträgt die Mortalität etwa 19 % (Huber-Wagner, Biberthaler et al. 2013, El Mestoui, Jalalzadeh et al. 2017). Andererseits ereignen sich zwischen 53 % und 69 % der Polytrauma-bedingten Todesfälle, bevor der Patient das Krankenhaus erreicht (Pfeifer, Tarkin et al. 2009). Zeitlich gesehen lassen sich bezüglich der Mortalität drei Gipfel ausmachen: der erste innerhalb von Sekunden oder Minuten am Unfallort, der zweite innerhalb der

Einleitung

ersten 24 Stunden des Krankenhausaufenthaltes, und der dritte nach mehreren Tagen (Wutzler, Lustenberger et al. 2013). Den frühen traumabedingten Todesfällen liegen in der überwiegenden Zahl der Fälle direkte Traumafolgen zugrunde, also beispielsweise unstillbare Blutungen im Sinne eines hämorrhagischen Schocks oder ein schweres Schädel-Hirn-Trauma. Beim späteren Versterben nach Tagen im Verlauf der intensivmedizinischen Behandlung steht hingegen die immunologische (Fehl-) Reaktion des Körpers auf die Verletzungen als Ursache im Vordergrund.

Die Mechanismen der immunologischen Reaktion nach Trauma sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Das aktuelle Konzept beschreibt, dass es durch den Gewebeschaden nach Trauma zur Freisetzung sogenannter Alarmine oder *damage associated molecular patterns* (DAMPs) (Matzinger 1994) aus nekrotischen und unter Stress stehenden Zellen kommt, so zum Beispiel mitochondrialer DNA (Zhang, Raouf et al. 2010), *High mobility group box 1* (HMGB1) (Scaffidi, Misteli et al. 2002) und *Heat shock proteins* (Hsp) (Basu, Binder et al. 2000). Es werden zum einen direkt Immunzellen aktiviert, zum anderen kommt es zur Induktion der Komplementkaskade, welche ihrerseits wiederum weitere Entzündungszellen aktiviert. Proinflammatorische Zytokine, insbesondere Interleukine, werden ausgeschüttet, die zur Einwanderung von Leukozyten führen und das Entzündungsgeschehen weiter verstärken (Lord, Midwinter et al. 2014). Zunächst sind diese Prozesse auf die verletzten Körperareale begrenzt und dort auch sinnvoll und notwendig, um die Wundheilung einzuleiten. Überschreitet der traumatisch bedingte Gewebeschaden aber ein interindividuell unterschiedliches Maß, dann kommt es zu einer Generalisierung der Immunreaktion: Auch nicht direkt vom Trauma betroffene Organe und Gewebe werden miteinbezogen und angegriffen. Diese überschießende systemische Immunantwort wird als *Systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) bezeichnet und kann unbehandelt über Organdysfunktionen (*Multiple organ dysfunction syndrome*, MODS) zum – in diesem Fall frühen – Multiorganversagen (MOV; *Multiple organ failure*, MOF) führen (s. **Abb. 1**).

In dem Versuch, die Homöostase des Immunsystems wiederherzustellen, werden im Organismus auch immunsuppressive antiinflammatorische Mechanismen aktiv, es kommt zur Ausschüttung von beispielsweise Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-13 (IL-13) und *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β). Diese auch als *Compensatory antiinflammatory response syndrome* (CARS) bezeichneten Prozesse können, wenn sie überhandnehmen, zu einer herabgesetzten Immunabwehr bis hin zur Immunparalyse führen. Es resultiert eine gesteigerte Anfälligkeit des Patienten für bakterielle Infektionen mit der Gefahr der Entwicklung einer Sepsis, die unbehandelt in ein spätes Multiorganversagen münden kann. Die proinflammatorischen Prozesse des SIRS werden als die Antwort des angeborenen Immunsystems auf Trauma angesehen, wohingegen das CARS wahrscheinlich vorwiegend vom erworbenen Teil des Immunsystems vermittelt wird (Stoeklein, Osuka et al. 2012).

Das gleichzeitige Auftreten von SIRS und CARS, also von pro- und antiinflammatorischen Vorgängen, wird auch als *Mixed antagonist response syndrome* (MARS) bezeichnet.

Einleitung

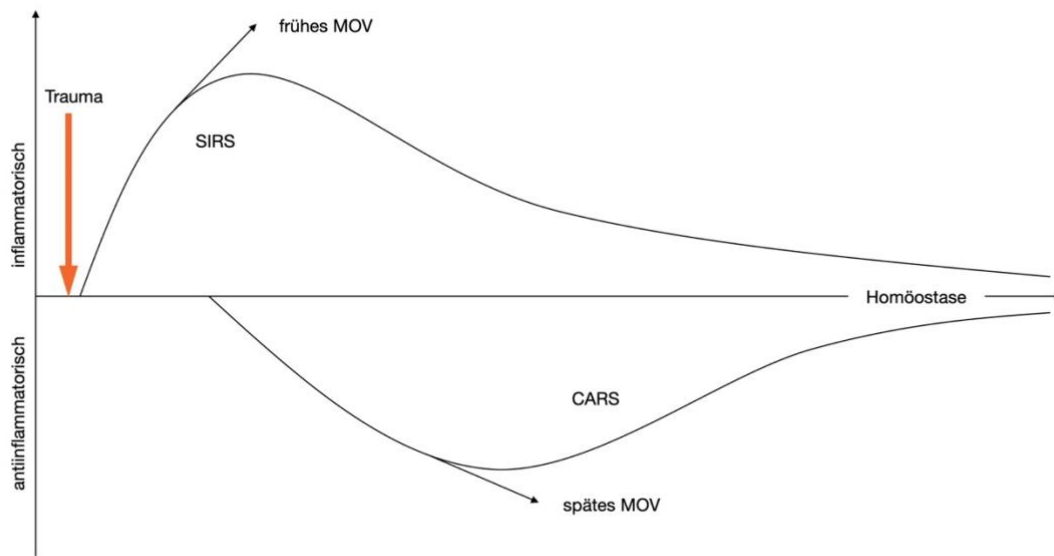


Abb. 1: Schematische Darstellung der vermuteten immunologischen Abläufe nach Trauma (in Anlehnung an (Moore, Sauaia et al. 1996)). SIRS: systemic inflammatory response syndrome, CARS: compensatory antiinflammatory response syndrome, MOV: Multiorganversagen.

In diesem Zusammenhang sollte auch die *two hit hypothesis* Erwähnung finden (Moore, Moore et al. 1993): Schwerverletzte Patienten sind nicht nur durch den *first hit* – das Trauma mit Organ- und Weichteilschäden, welche zur Aktivierung der oben ausgeführten Kaskade führen – gefährdet. Die posttraumatische Immunperturbation wird zudem weiter verstärkt durch die *second hits*, welche sowohl endogen als auch exogen verursacht sein können: Infektionen oder Ischämie-/Reperfusionsschäden ebenso wie kardiovaskuläre oder respiratorische Instabilität stellen typische endogene *second hits* dar, als exogene *second hits* spielen insbesondere Operationen mit konsekutivem weiteren Gewebeschaden und Blutverlust eine Rolle (Keel and Trentz 2005). Diese Hypothese, gemäß welcher ärztliche Interventionen zur Behandlung des Traumas unter Umständen den Zustand des Patienten verschlechtern können, führte zu einer bis heute andauernden Diskussion über die adäquate Therapie des Polytraumas. Die beiden Behandlungskonzepte *early total care* (ETC; zeitnahe definitive chirurgische Versorgung des Patienten) und *damage control orthopedics* (DCO; nur zur Stabilisierung zwingend notwendige Eingriffe werden durchgeführt) stehen sich hier gegenüber (Hussmann and Lendemans 2014, Rixen, Steinhausen et al. 2016). Üblicherweise werden die Patienten gemäß ihrem Zustand in stabil, *borderline* und instabil eingeteilt, wobei allerdings für diese Unterscheidung keine einheitlichen Kriterien etabliert sind (Pape, Rixen et al. 2007). Für stabile Patienten wird eine rasche definitive Frakturversorgung angestrebt (Bone, Johnson et al. 1989), während instabile Patienten nach dem DCO-Prinzip behandelt werden, um einen exogenen *second hit* zu vermeiden (Stubig, Mommsen et al. 2010, Steinhausen,

Einleitung

Lefering et al. 2014). Eine Herausforderung bezüglich ihrer Einordnung und folglich auch bezüglich der für sie optimalen Therapie stellen die Patienten der *borderline*-Risikogruppe dar.

2.1.2 Interleukin 17A

Interleukin 17A (IL-17A), häufig auch nur Interleukin 17 (IL-17) genannt, ist ein proinflammatorisches Zytokin aus der Gruppe der Interleukine. Allgemein gesprochen sind Zytokine Proteine, durch die Wachstum und Differenzierung von Zellen gesteuert wird. Die Bezeichnung Zytokin leitet sich aus dem Altgriechischen ab ($\kappa\upsilon\tau\omicron\varsigma$ „Zelle“ und $\kappa\iota\nu\epsilon\omega$ „ich bewege“) und beschreibt damit Stoffe, die Zellen bewegen oder – freier übersetzt – beeinflussen. Die Untergruppe der Interleukine vermittelt die Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems und koordiniert damit Entzündungsreaktionen und die Erregerabwehr. Ursprünglich ging man davon aus, dass Interleukine nur von Leukozyten gebildet werden und nur auf Leukozyten wirken – daher ihr Name.

IL-17A ist Teil der IL-17-Familie, der insgesamt fünf strukturell ähnliche Zytokine (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17F) angehören. Produziert und sezerniert wird es von $\gamma\delta$ -T-Zellen, natürlichen Killerzellen, eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten, natürlichen Killer-T-Zellen, aber auch von den über ihre IL-17A-Produktion definierten T-Helfer-17-Zellen (Th17-Zellen) und unter bestimmten Bedingungen ebenfalls von regulatorischen CD4⁺ T-Zellen (Korn, Bettelli et al. 2009). Es wirkt über den heterodimären Interleukin-17-Rezeptor A (IL-17RA) – Interleukin-17-Rezeptor C (IL-17RC) - Komplex, der von hämatopoietischen Zellen und in geringerem Ausmaß auch von zahlreichen anderen Zellarten, beispielsweise Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten und Osteoblasten, exprimiert wird. Aus dieser beinahe ubiquitären Expression des Rezeptors erklärt sich die breite Wirkung des IL-17A, das vorwiegend über den Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) Einfluss auf die Zielzellen nimmt (Yao, Fanslow et al. 1995). Die genauen Effekte des IL-17 hängen vom jeweiligen Gewebe ab: Durch Induktion der Expression von anderen Zyto- und Chemokinen werden Immunzellen angelockt und so eine Entzündung ausgelöst oder verstärkt.

2.1.3 Th17-Zellen

T-Helfer-17-Zellen (Th17-Zellen) sind Teil der CD4⁺-T-Helferzell-Population und wurden ursprünglich, wie oben erwähnt, durch ihre Produktion von Interleukin 17 (IL-17) charakterisiert und auch danach benannt (Park, Li et al. 2005), weswegen sie auch als proinflammatorische Zellen eingestuft werden. Infolge des Nachweises der Th17-Zellen im Jahr 2005 durch *Park* und Mitarbeiter musste von der bis dahin angenommenen funktionellen Dichotomie der CD4⁺-T-Helferzellen in Form der Unterscheidung in Th1- und Th2-Zellen Abstand genommen werden (Mosmann and Coffman 1989). Zur Aktivierung einer naiven CD4⁺ T-Zelle und Differenzierung in eine Effektor-T-Helferzelle sind zwei verschiedene Signalwege notwendig: Zunächst erfolgt eine Bindung am T-Zell-Rezeptor (TCR,

Einleitung

T-cell receptor) der CD4⁺ T-Zelle durch MHC (*major histocompatibility complex*)-II-Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC, *antigen presenting cell*). Die Bestätigung dieser Aktivierung vermitteln dann kostimulatorische Moleküle – der wichtigste Interaktionsweg läuft über CD28 auf der naiven T-Zelle und CD80 sowie CD86 auf APCs (Lenschow, Walunas et al. 1996). Vom umgebenden Zytokinmilieu ist abhängig, in welchen T-Helfer-Subtyp die naive CD4⁺-T-Zelle differenziert. Schlüsselzytokin für die Entwicklung von Th17-Zellen ist Transforming growth factor β (TGF- β). Dies ist besonders vor dem Hintergrund interessant, dass TGF- β auch essentiell für regulatorische CD4⁺ T-Zellen ist, die im Allgemeinen als antiinflammatorische Gegenspieler der Th17-Zellen gesehen werden (Bettelli, Carrier et al. 2006, Mangan, Harrington et al. 2006, Veldhoen, Hocking et al. 2006). Für die Th17-Zell-Differenzierung sind weiterhin Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-21 (IL-21) notwendig (Nurieva, Yang et al. 2007, Zhou, Ivanov et al. 2007). Während IL-6 in Anwesenheit von TGF- β die Th17-Entwicklung initiiert, amplifiziert IL-21 die Menge an Th17-Zellen im Sinne eines autokrinen positiven Feedback-Mechanismus – Th17-Zellen produzieren selbst IL-21. Als weiteres Zytokin ist Interleukin-23 (IL-23) beteiligt, welches die Th17-Zell-Population stabilisiert und die Th17-vermittelte Immunreaktion aufrecht erhält (Veldhoen, Hocking et al. 2006). Zudem wurde auch für Interleukin-1 β (IL-1 β) eine regulatorische Funktion in der Th17-Zell-Differenzierung nachgewiesen (Ghoreschi, Laurence et al. 2010, Zielinski, Mele et al. 2012).

Als Th17-definierender Transkriptionsfaktor wurde zunächst *Retinoic acid related orphan receptor γ thymus* (ROR γ t) identifiziert, später konnte festgestellt werden, dass in Abwesenheit von ROR γ t auch *Retinoic acid related orphan receptor α* (ROR α) die Th17-Polarisation verursachen kann (Ivanov, McKenzie et al. 2006, Yang, Pappu et al. 2008). Auch dem *Signal transducer and activator of transcription 3* (Stat3) kommt bei der Th17-Differenzierung eine wichtige Rolle zu, er induziert die Expression von ROR γ t (Yang, Panopoulos et al. 2007).

Th17-Zellen produzieren und sezernieren verschiedene Zytokine außer den namensgebenden IL-17A und IL-17F: unter anderem das oben erwähnte IL-21 (Nurieva, Yang et al. 2007), IL-22 (Liang, Tan et al. 2006), Interleukin-9 (IL-9) (Nowak, Weaver et al. 2009), Interleukin-10 (IL-10) (McGeachy, Bak-Jensen et al. 2007), Interferon γ (IFN- γ) (Annunziato, Cosmi et al. 2007) und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) (El-Behi, Ciric et al. 2011).

Bekanntheit erlangten die Th17-Zellen ursprünglich durch ihre Rolle bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Erforscht wurden sie zunächst im Rahmen von Tiermodellen wie beispielsweise der *Experimental autoimmune encephalitis* (EAE), einem Modell für Multiple Sklerose (MS) (Park, Li et al. 2005). Auch im humanen Organismus wurde zur Rolle der Th17-Zellen bei Autoimmunerkrankungen geforscht: Eine 2008 durchgeführte Studie an MS-erkrankten Patienten mit Ustekinumab, einem Antikörper gegen die p40-Untereinheit von IL-23 und IL-12, ergab jedoch keine Reduktion der MS-assoziierten Läsionen (Segal, Constantinescu et al. 2008). Anders verhält es sich bei der Psoriasis, wo sowohl Ustekinumab als auch Secukinumab, ein Antikörper gegen IL-17A, und Brodalumab, ein Antikörper gegen den IL-17-Rezeptor, inzwischen zugelassene Arzneimittel in der

Einleitung

Behandlung sind (Leonardi, Kimball et al. 2008, Langley, Elewski et al. 2014, Papp, Reich et al. 2016). Weitere Autoimmunerkrankungen, an deren Pathogenese Th17-Zellen Anteil haben, sind die rheumatoide Arthritis und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Wilke, Bishop et al. 2011).

Th17 Zellen sind jedoch nicht ausschließlich autoreaktiv und schädlich, sondern tragen auch maßgeblich zur Immunantwort im Rahmen von Infektionen bei. Insbesondere im Rahmen von *Candida albicans*- und *Klebsiella pneumoniae*-Infektionen kommt ihnen erwiesenermaßen große Bedeutung zu (Ye, Rodriguez et al. 2001, Hernandez-Santos and Gaffen 2012).

Noch herrscht keine Einigkeit über eine spezifische Konstellation von Oberflächenmarkern, mit denen Th17-Zellen eindeutig identifizierbar und von anderen Zellpopulationen zu unterscheiden sind. Aufgrund der ursprünglichen Definition von Th17-Zellen als IL-17-produzierend werden sie zumeist über die Expression von IL-17 nach Aktivierung identifiziert. Möchte man die Zellen – beispielsweise aufgrund des Studienkonzepts – nicht aktivieren, hat sich die Verwendung von CD4 in Kombination mit CD161 und CD196 (Chemokinrezeptor 6, CCR6) bewährt (Cosmi, De Palma et al. 2008, Maggi, Santarlaschi et al. 2010, Sollazzo, Trabanelli et al. 2011, Malard, Bossard et al. 2014).

2.1.4 Regulatorische CD4+ T-Zellen

Regulatorische CD4+ T-Zellen (CD4+ Tregs) bilden eine Population von T-Helferzellen, die im Gegensatz zu den schon länger bekannten Th1- und Th2-Zellen immunsuppressive Eigenschaften besitzt und damit für eine immunologische Toleranz sowohl körpereigenen als auch bestimmten körperfremden Antigenen gegenüber sorgt. Im Rahmen der Selbsttoleranz wurden CD4+ Tregs erstmals 1995 von Sakaguchi und Mitarbeitern als T-Helferzellen beschrieben, die die alpha-Kette des IL-2-Rezeptors (IL-2R α , CD25) exprimieren und bei deren Depletion es im Mausmodell zu verschiedenen Autoimmunerkrankungen kommt (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Als zentraler, für die Entwicklung und Funktion von CD4+ Tregs verantwortlicher Transkriptionsfaktor erwies sich 2003 Forkhead box P3 (FoxP3) – Mäuse, die FoxP3-defizient sind, bilden keine CD4+ CD25+ Tregs und entwickeln ein tödliches Autoimmunsyndrom (Fontenot, Gavin et al. 2003). Im Menschen führt eine Mutation im FoxP3-Gen zum IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*)-Syndrom, welches mit verschiedenen Autoimmunphänomenen einhergeht (Bennett, Christie et al. 2001). Im weiteren Verlauf gelang Liu et al. der Nachweis, dass die Expression von CD127 (der alpha-Kette des IL-7-Rezeptors, IL-7R α) invers mit der FoxP3-Expression korreliert und sich daher die fehlende oder nur schwach vorhandene Positivität für CD127 gut als Identifikationsmarker für CD4+ Tregs eignet (Liu, Putnam et al. 2006). Bezüglich des Entstehungsortes von regulatorischen CD4+ T-Zellen werden die natürlichen CD4+ Tregs (*natural CD4+ Tregs*, CD4+ nTreg) von den induzierten CD4+ Tregs (*induced CD4+ Treg*, CD4+ iTreg) unterschieden. Die als CD4+ nTreg bezeichnete Zellpopulation entwickelt sich im Thymus analog zu den konventionellen T-Zellen, wohingegen CD4+ iTregs in der Körperperipherie aus konventionellen Effektor-T-Zellen entstehen. Das erforderliche Zytokinmilieu zur Induktion von FoxP3 und damit zur CD4+ Treg-Differenzierung beinhaltet insbesondere auch IL-2 und

Einleitung

TGF- β . Während nTregs immer CD4⁺ sind, können die iTregs sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ sein. (Feurerer, Hill et al. 2009). Noch ist kein spezifischer Marker etabliert, der eine sichere Unterscheidung dieser beiden Subgruppen ermöglicht (Shevach and Thornton 2014).

CD4⁺ Tregs können aber nicht nur das Auftreten von Autoimmunerkrankungen verhindern, indem sie autoreaktive Immunreaktionen inhibieren und damit eine notwendige Selbsttoleranz vermitteln. Sie modulieren auch allergische Reaktionen (McGuirk, Higgins et al. 2010) und verhindern Transplantatabstoßungen (Wood 2011) durch die Regulation der Toleranz gegenüber Allo-Antigenen. Eben diese Fremdtoleranz birgt allerdings auch das Risiko einer unzureichenden Immunantwort im Rahmen von Infektionen mit konsekutiver Persistenz der Erreger im Organismus (Belkaid and Tarbell 2009). Auch die Selbsttoleranz ist nicht ohne Nachteile: Bei den meisten onkologischen Erkrankungen ist die Zahl der CD4⁺ Tregs sowohl im Blut als auch im Tumorgewebe erhöht und geht mit einer schlechteren Prognose einher (Woo, Chu et al. 2001).

Von Vignali und Mitarbeitern wurden 2008 vier verschiedene Mechanismen beschrieben, durch welche CD4⁺ Tregs hemmend auf andere Immunzellen wirken können. Die Suppression erfolgt einerseits durch die Ausschüttung inhibitorischer Zytokine wie TGF- β , IL-10 und Interleukin-35 (IL-35), andererseits durch Induktion der Zytolyse mittels Freisetzung von Granzym A oder Granzym B. Als dritter Mechanismus ist eine Hemmung mittels Störung des Stoffwechsels (*metabolic disruption*) anzuführen – beispielsweise binden die CD4⁺ Tregs durch ihre hohe Expression des IL-2-Rezeptors das vorhandene IL-2, welches die Effektor-T-Zellen zur Proliferation benötigen, sodass es nicht mehr zur Verfügung steht. Ferner können CD4⁺ Tregs zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) auf andere Effektor-T-Zellen übertragen, welches als Sekundärbotenstoff (*second messenger*) in den Zellmetabolismus eingreift. Der vierte von Vignali und Mitarbeitern postulierte inhibitorische Weg beinhaltet die Einflussnahme durch CD4⁺ Tregs auf Reifung und Funktion von dendritischen Zellen, einer Subklasse der Antigen-präsentierenden Zellen (Vignali, Collison et al. 2008).

CD4⁺ Tregs sind in ihrem Zytokinprofil jedoch interessanterweise nicht auf antiinflammatorische Botenstoffe beschränkt. So konnten 2008 erstmals humane CD4⁺ Tregs *in vitro* in IL-17-produzierende Zellen transdifferenziert werden. Bei diesen Zellen konnte eine ROR γ t- und CCR6-Expression nachgewiesen werden (Koenen, Smeets et al. 2008). Voo und Mitarbeiter zeigten 2009, dass es innerhalb der CD4⁺ Treg-Population Zellen gibt, die bei Aktivierung IL-17 produzieren. Dabei koexprimiert dieser Zelltyp ROR γ t und FoxP3 und ist dennoch weiterhin imstande, die Proliferation von Effektor-T-Zellen zu unterdrücken (Voo, Wang et al. 2009). IL-17-produzierende CD4⁺ Tregs konnten beispielsweise in der Haut von Psoriasis-Erkrankten ebenso wie in der intestinalen Schleimhaut von Morbus Crohn-Patienten nachgewiesen werden (Bovenschen, van de Kerkhof et al. 2011, Hovhannisyanyan, Treatman et al. 2011). Welche Bedeutung dieser Zellsubtyp jedoch besitzt und welche physiologischen Funktionen er erfüllt, ist bis jetzt nicht geklärt.

Einleitung

2.1.5 Thrombozyten und Gerinnung

Thrombozyten, auch Blutplättchen (*platelets*) genannt, sind die hinsichtlich ihrer Größe kleinsten korpuskulären Bestandteile im menschlichen Blutkreislauf. Etwa eine Billion (10^{12}) dieser 2-3 μm messenden diskoiden Zellen zirkuliert im Blut eines Erwachsenen. Aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer von nur 8-10 Tagen muss jeden Tag etwa ein Zehntel der kompletten Population erneuert werden, das entspricht der Produktion von 10^{11} Thrombozyten pro Tag. Die Bildung geschieht durch Abschnürung von sich im Knochenmark befindenden Megakaryozyten, wobei jeder Megakaryozyt im Laufe seines Lebens mehrere Tausend Thrombozyten freisetzen kann. Reguliert wird die Thrombozytogenese über das in Leber und Nieren produzierte Hormon Thrombopoietin. Thrombozyten besitzen zwar keinen Zellkern, wohl aber *messenger RNA* (mRNA). Sie sind ausgestattet mit Ribosomen zur Translation und damit zur Proteinbiosynthese imstande (Lindemann and Gawaz 2007). Als Identifikationsmarker für Thrombozyten wird häufig CD41 (Glykoprotein IIb, GPIIb) verwendet, welches Teil des GPIIb/IIIa-Rezeptors ist, der auf allen Blutplättchen exprimiert wird. Intrazellulär verfügen Thrombozyten des Weiteren über verschiedene Granula: α -Granula, elektronendichte Granula und Lysosomen.

Schon aus der Etymologie ihres Namens Thrombozyten – altgriechisch $\theta\rho\mu\beta\omicron\varsigma$ „Haufen“ und $\kappa\acute{\omicron}\tau\omicron\varsigma$ „Zelle“, also etwa Haufen[-/bildende] Zelle – lässt sich erahnen, welche Funktion die Blutplättchen bekannt gemacht hat: Sie stellen den zellulären Anteil des Gerinnungssystems dar und sind im Falle von Gefäßverletzungen für den ersten Defektverschluss durch Bildung eines Thrombus – also (Zell)Haufens – zuständig. Das intakte Gefäßendothel verhindert die Interaktion mit den Thrombozyten und die Bindung derselben durch Freisetzung verschiedener vasoaktiver und antithrombogener Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin I_2 (PGI₂, Prostazyklin). Kommt es zu Blutgefäßverletzungen, so werden Proteine der Extrazellulärmatrix, unter anderem auch Kollagene, freigelegt. Der von-Willebrand-Faktor (vWF), welcher von Megakaryozyten und Endothelzellen gebildet und kontinuierlich an das Blut abgegeben wird, vermittelt die Thrombozytenadhäsion: einerseits bindet der vWF Kollagen, andererseits besitzen die Thrombozyten mit dem Glykoprotein Ib/V/IX (GPIb/V/IX) einen Rezeptor für vWF auf ihrer Oberfläche. Mit dem Glykoprotein VI (GPVI) können die Plättchen ferner auch Kollagen direkt binden – diese Interaktion führt zur Aktivierung der Thrombozyten. Es kommt zu einem Einstrom von Kalziumionen in die Blutplättchen, welcher einen Umbau des thrombozytären Zytoskeletts bewirkt: Die Thrombozyten bilden zahlreiche Pseudopodien aus, wodurch sich ihre Oberfläche deutlich vergrößert. Ermöglicht wird dies durch die Interaktion der Aktin/Mikrotubuli-Komplexe des Zytoskeletts mit dem speziellen endoplasmatischen Retikulum der Thrombozyten – dem sogenannten offenen kanalikulären System. Die Aktivierung führt außerdem zu Konversion des Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) -Rezeptors, welcher dann durch Bindung von Fibrinogen die Ausbildung von Fibrinogenbrücken zwischen den Plättchen und damit die Thrombozytenaggregation bewirkt. Ferner setzen die Thrombozyten den Inhalt ihrer Granula frei, darunter Gerinnungs- und Wachstumsfaktoren, vWF sowie chemotaktisch wirksames Serotonin und Thromboxan A₂, wodurch weitere Plättchen angelockt werden. CD63, welches in den Lysosomen und

Einleitung

elektronendichten Granula zu finden ist, wird bei der Degranulation ebenfalls an die Oberfläche transportiert und scheint bei der Reorganisation des Zytoskeletts eine Rolle zu spielen. (Israels and McMillan-Ward 2005)

Dieser beschriebene Prozess der Blutstillung durch die Thrombozyten wird als primäre, zelluläre Hämostase bezeichnet, an welche sich die sekundäre, plasmatische Hämostase anschließt, im Rahmen derer der zelluläre Thrombus durch Fibrinfäden verklebt und damit verstärkt wird. Ermöglicht wird das durch die sequentielle Aktivierung der im Blutplasma zirkulierenden Gerinnungsfaktoren, an deren Ende die Bildung von Fibrinpolymeren steht. (Broos, Feys et al. 2011)

Der erste Zusammenhang zwischen Thrombozyten und dem Immunsystem fand sich, als Autoantikörper gegen thrombozytäre Oberflächenstrukturen als Ursache für die heute als Immunthrombozytopenie (ITP) bezeichnete idiopathische thrombozytopenische Purpura identifiziert wurden (Semple, Italiano et al. 2011). Inzwischen sind Thrombozyten nicht nur als Zielstruktur für Autoimmunprozesse etabliert, sondern sie sind als wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems anerkannt. Einerseits haben sie Mediatorfunktion: Sie führen Leukozyten an Gefäßverletzungen und leiten so dort eine Entzündungsreaktion und konsekutiv die Wundheilung ein. Mittels Toll-ähnlicher Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLRs), die vor allem von phagozytierenden Immunzellen, aber auch von Thrombozyten exprimiert werden, werden *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), also Strukturen, die von verschiedenen Krankheitserregern stammen, gebunden. Über eben diese Rezeptoren können Blutplättchen die Invasion von Erregern erkennen und auch hier Leukozyten anlocken. Interessanterweise ist auch TGF- β Teil des thrombozytären Zytokinspektrums; die Thrombozyten sind an der Regulation der Plasma-TGF- β -Spiegel beteiligt, welchem – wie in 2.1.4 erwähnt – eine zentrale Bedeutung für die CD4⁺ Treg-Entwicklung zukommt. Bei Patienten mit ITP ist die Zahl der CD4⁺ Tregs reduziert, reguliert sich jedoch im Rahmen der therapiebedingten Normalisierung der Thrombozytenzahl.

Die Leukozytenrekrutierung geschieht jedoch nicht ausschließlich über die Ausschüttung von Zytokinen, sondern ebenso über Zell-Zell-Kontakte, beispielsweise über die Expression von P-Selektin (CD62P), welches in den α -Granula der Plättchen lagert und bei Aktivierung an die Oberfläche transportiert wird (Palabrica, Lobb et al. 1992). Über P-Selektin kann außerdem auch das Komplementsystem aktiviert werden (Del Conde, Cruz et al. 2005).

Thrombozyten vermitteln aber nicht nur die Immunantwort anderer Zellen, sie werden auch selbst aktiv. In ihren α -Granula enthalten sie verschiedene antimikrobielle Proteine; diese auch Thrombozidine genannten Moleküle sind bakterizid für verschiedene Bakterienspezies und fungizid für einige Pilze (Krijgsveld, Zaat et al. 2000).

In der Pathogenese einiger Erkrankungen wurde für die Thrombozyten inzwischen eine zentrale Bedeutung herausgearbeitet, die Atherosklerose ist hier wohl die am längsten bekannte. Einerseits sorgen die Blutplättchen für eine Progression der inflammatorischen Prozesse durch Interaktion mit Endothelzellen und Granulozyten sowie Monozyten, andererseits inhibieren sie die CD4⁺ Tregs und

Einleitung

verhindern damit den Aufbau eines antientzündlichen Milieus (Lievens, Zerneck et al. 2010). Weitere Erkrankungen, bei denen eine Thrombozytenbeteiligung als gesichert gilt, sind unter anderem die rheumatoide Arthritis (Boilard, Nigrovic et al. 2010) und die Sepsis (de Stoppelaar, van 't Veer et al. 2014).

2.2 STAND DER FORSCHUNG – RELEVANZ

Die oben beschriebene posttraumatische Immunantwort mit SIRS, CARS und der Gefahr der Entwicklung eines Multiorganversagens ist bis heute mechanistisch nicht vollständig verstanden. Die Therapie der polytraumatisierten Patienten besteht derzeit in der (chirurgischen) Versorgung der Verletzungen sowie einer bedarfsgerechten, intensivmedizinischen Behandlung und Überwachung. Zur Prävention und kausalen – nicht nur symptomatischen – Therapie der Dysregulation des Immunsystems gibt es bisher keine klinisch validierten Strategien.

Für Patienten mit septischem Schock erwies sich eine antiinflammatorische Therapie mit dem TNF-Rezeptor-Antikörper Lenercept als nicht prognoseverbessernd (Abraham, Laterre et al. 2001). Im Verbrennungsmodell der Maus zeigten sich mit IL-12 behandelte Tiere als resistenter gegenüber Sepsis (O'Suilleabhain, O'Sullivan et al. 1996), in einer anderen Studie erwies sich die Gabe von IL-18 als vorteilhaft im Rahmen eines Sepsismodells (Kinoshita, Kuranaga et al. 2006). Auch für die Verabreichung von Antikörpern gegen IL-10 konnten in der Maus im Rahmen der Sepsis Prognosevorteile aufgezeigt werden (Lyons, Goebel et al. 1999). Diesen drei Therapieansätzen ist gemeinsam, dass sie die proinflammatorische Reaktion verstärken. Einen Hinweis auf die Notwendigkeit einer gewissen posttraumatischen Inflammation gibt auch eine 2009 von *Kirchhoff* und Mitarbeitern publizierte Arbeit. Es konnte gezeigt werden, dass die Kapazität von Monozyten, proinflammatorische Zytokine zu produzieren, posttraumatisch zunächst sinkt und dann wieder ansteigt, wobei niedrige Zahlen von zytokinproduzierenden Monozyten mit höheren MODS-Scorewerten korreliert sind (Kirchhoff, Biberthaler et al. 2009).

Schon lange ist bekannt, dass die Gerinnung bei polytraumatisierten Patienten häufig beeinträchtigt ist, es kommt zur traumainduzierten Koagulopathie. Die Ursachen hierfür sind vielfältig, einerseits werden vermehrt Gerinnungsfaktoren verbraucht, doch durch den Gewebeschaden kommt es auch zur Endothelaktivierung mit resultierender Autoheparinisierung; weiterhin wird eine thrombozytäre Dysfunktion diskutiert, zudem besteht bei einigen Patienten ein Zustand der Hyperfibrinolyse, der die Mortalität massiv erhöht (White 2013). Die Gerinnungsdiathese kann ferner iatrogen durch Volumensubstitution verschlimmert werden. Das Management der Gerinnung ist Teil der Leitlinie zur Versorgung polytraumatisierter Patienten und wird laufend überarbeitet, inzwischen werden beispielsweise viskoelastische Testverfahren wie die Rotationsthrombelastometrie aufgrund ihrer einfachen Anwendbarkeit und raschen Auswertbarkeit zur Diagnostik empfohlen.

Welche Bedeutung den Thrombozyten insbesondere aus immunologischer Sicht im posttraumatischen Setting zukommt, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. *Fujimi* und Mitarbeiter etwa fanden 2006

Einleitung

heraus, dass eine Thrombozytendepletion mit einer Mortalitätserhöhung im murinen Verbrennungsmodell einhergeht und vermuteten einen Einfluss von thrombozytärem TGF- β auf die systemische posttraumatische Entzündungsreaktion (Fujimi, MacConmara et al. 2006).

Auch mit der Rolle von Th17-Zellen und CD4⁺ Tregs im Rahmen der posttraumatischen Immunreaktion wurde sich in verschiedenen Arbeiten auseinandergesetzt. In einem Polytraumamodell in der Ratte fanden Dai und Mitarbeiter 2013 ein reduziertes CD4⁺ Treg/Th17-Zell-Verhältnis, das invers mit dem erhobenen intestinalen Score und damit vermutlich mit der Verletzungsschwere korrelierte (Dai, Sun et al. 2013). In einer anderen Studie, die sich eines murinen Verbrennungsmodells bediente, konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den verbrannten Versuchstieren eine erhöhte Th17-Zellzahl sowie ein erhöhtes Th17/Th1-Verhältnis gezeigt werden (Neely, Maile et al. 2011). Eine kürzlich von Serve und Mitarbeitern veröffentlichte Arbeit wies eine verminderte Zahl zirkulierender CD4⁺ Tregs sowohl im Blut polytraumatisierter Menschen als auch im Polytraumamodell am Schwein nach (Serve, Sturm et al. 2018).

Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten in der posttraumatischen Immunreaktion geben zwei Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe, in denen ebenfalls ein murines Verbrennungsmodell angewendet wurde: Damit konnte 2016 erstmals gezeigt werden, dass nach Thrombozytendepletion im posttraumatischen Setting die intrazelluläre Signalkaskade in CD4⁺ Tregs beeinträchtigt war (Bergmann, Hefele et al. 2016), darüber hinaus wurde eine reziproke Aktivierung von Thrombozyten über CD4⁺ Tregs nachgewiesen. Weitere Versuche ergaben, dass die thrombozytäre Modulation der posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs TLR4- und Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 (TNF-RII, *tumor necrosis factor receptor 2*) -abhängig ist (Bock, Bergmann et al. 2018).

Obwohl allerdings Tierversuche für den Erkenntnisgewinn in der medizinischen Forschung (aktuell) unabdingbar sind, gilt es, die zum Teil signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies nicht aus den Augen zu verlieren. So ergibt sich die Notwendigkeit, im Tiermodell gewonnene Erkenntnisse im Rahmen humaner Studien zu verifizieren und zu vertiefen.

Weiterhin stellt die Einschätzung der schwerverletzten Patienten bezüglich ihres Risikos, Komplikationen zu entwickeln, eine große Herausforderung dar. Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Scoring-Systeme entwickelt, die unterschiedlich gut mit dem Outcome der Patienten korrelieren, deren Berechnung allerdings die Erhebung zahlreicher Parameter erfordert und einige Zeit in Anspruch nimmt. Mit dem IL-6-Spiegel konnte 2009 ein Laborwert gefunden werden, dessen Wert hinreichend mit Verletzungsschwere und Mortalität bei polytraumatisierten Patienten korreliert und außerdem eine Einschätzung bezüglich des Risikos für die Entwicklung eines Multiorganversagens erlaubt (Frink, van Griensven et al. 2009). Dennoch ist auch hier die Datenlage teilweise nicht eindeutig, sodass die Suche nach dem idealen Prädiktor weiterhin andauert.

Fragestellung

3 FRAGESTELLUNG

Bei der hier vorgestellten Studie handelt es sich um eine monozentrische, rein deskriptive, nicht interventionelle prospektive klinische Studie an polytraumatisierten Patienten mit dem Ziel, die immunologischen Vorgänge infolge schwerer Verletzungen besser zu verstehen. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Beteiligung der Thrombozyten und des adaptiven Immunsystems an der posttraumatischen Immunantwort. Zum einen können durch ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen neue therapeutische Ansatzpunkte erschlossen und bestehende Therapien verbessert werden. Andererseits ergeben sich möglicherweise neue Messgrößen, die eine Risikostratifikation der Patienten erleichtern oder als Entscheidungshilfe bei der Wahl der adäquaten therapeutischen Strategie dienen könnten.

Für die vorliegende Arbeit, welche eine Zwischenauswertung nach Einschluss der ersten 10 Patienten darstellt, wurden folgende Fragen definiert:

1. Kann eine Veränderung in der Zahl der Th17-Zellen, regulatorischen CD4+ T-Zellen und Thrombozyten bei polytraumatisierten Patienten festgestellt werden?
2. Wie entwickelt sich die Interleukin-17A-Expression auf Th17-Zellen und regulatorischen CD4+ T-Zellen im Verlauf?
3. Kann mittels Durchflusszytometrie eine posttraumatische Aktivierung der Thrombozyten nachgewiesen werden?
4. Können Veränderungen in der Blutgerinnung und Thrombozytenfunktion der schwerverletzten Patienten beobachtet werden?
5. Unterliegen die potentiellen Veränderungen der oben genannten Zellreihen nach Trauma einer bestimmten Kinetik?
6. Stehen eventuell beobachtete Veränderungen in einem Zusammenhang mit klinischen Parametern der Patienten wie Alter, Geschlecht oder Verletzungsschwere?
7. Können im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe Unterschiede in den gewonnenen Messwerten festgestellt werden?

Material und Methoden

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 STUDIENDESIGN

Die in dieser Arbeit beschriebene Studie ist konzipiert als prospektive, nicht-interventionelle klinische Studie an schwerverletzten Patienten. Den Teilnehmern wurde im Verlauf des Krankenhausaufenthaltes wiederholt Blut zu definierten Zeitpunkten abgenommen, um daraus die Zahl und Aktivität der regulatorischen CD4+ T-Zellen und Th17-Zellen sowie die Thrombozytenfunktion und Serumzytokinspiegel zu bestimmen. Weiterhin wurden verschiedene klinische Parameter erhoben. Vorgestellt wird hier eine Zwischenauswertung nach dem Einschluss der ersten 10 Patienten.

4.2 PATIENTEN

4.2.1 Rekrutierung

Von Dezember 2014 bis April 2015 wurden in der Klinik für Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar insgesamt 10 schwerverletzte Patienten eingeschlossen.

Einschlusskriterien waren:

- das Vorliegen eines Polytraumas (*Injury severity score* (ISS) ≥ 16),
- ein Alter zwischen 18 und 95 Jahren,
- eine direkte Einweisung in den Schockraum des Klinikums rechts der Isar oder eine Zuverlegung nicht mehr als 12 Stunden nach dem jeweiligen Unfall.

Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft und Strafgefängenschaft.

Polytraumatisierte Patienten sind häufig entweder bewusstlos oder analgosediert und deshalb nicht einwilligungsfähig, daraus ergab sich bezüglich der Einverständniserklärung folgendes Vorgehen:

Einwilligungsfähige Patienten wurden über die geplante Untersuchung aufgeklärt und erhielten eine schriftliche Patienteninformation, im Falle einer Zustimmung unterzeichneten die Patienten vor Einschluss in die Studie den Einwilligungsbogen.

Nicht einwilligungsfähige Patienten wurden einem in Bezug auf die Studie unabhängigen Arzt vorgestellt, welcher – ggf. in Rücksprache mit Angehörigen – im Sinne des mutmaßlichen Willens des Patienten über die Studienteilnahme entschied. Die Aufklärung des Patienten und das Einholen der schriftlichen Einverständniserklärung erfolgte dann post-hoc bei Wiedererlangen der Einwilligungsfähigkeit des Patienten.

Die Studie befolgt die in der Deklaration von Helsinki 1964 festgehaltenen Grundsätze ärztlicher Ethik und wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München am 16.09.2013 bewilligt (Projektnummer 5925/13).

Die Patientenrekrutierung läuft aktuell (Stand Dezember 2018) noch, ein Einschluss von insgesamt 60 Patienten ist geplant.

Material und Methoden

4.2.2 Probengewinnung und Datenerhebung

Den Studienteilnehmern wurde im Verlauf der ersten zehn Tage des Klinikaufenthalts insgesamt neun Mal Blut abgenommen: im Schockraum, nach sechs und zwölf Stunden, sowie nach einem Tag und zwei, drei, fünf, sieben und zehn Tagen (vgl. **Abb. 2**). Die Blutentnahme erfolgte in der Regel aus einem liegenden arteriellen oder venösen Zugang, wenn dies nicht möglich oder keiner vorhanden war, wurde eine Armvene punktiert. Hierbei wurden eine 7,5 ml Sarstedt S-Monovette® mit Gerinnungsaktivator, eine 3 ml Sarstedt S-Monovette® mit Zitrat 3,2 % sowie eine 9 ml Sarstedt S-Monovette® mit EDTA (alle Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) befüllt. Im Anschluss an die Blutentnahme wurden die Proben unverzüglich verarbeitet.

Die Werte der Gerinnungsparameter (Thrombozytenzahl, Quick, aPTT, INR, Fibrinogen) entstammen den Laboruntersuchungen, die im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführt wurden. AIS-Werte sowie der daraus resultierende ISS-Wert wurden auf Grundlage der klinischen sowie radiologischen Befunde erhoben und berechnet. Sämtliche Daten wurden nach Erfassung pseudonymisiert ausgewertet.

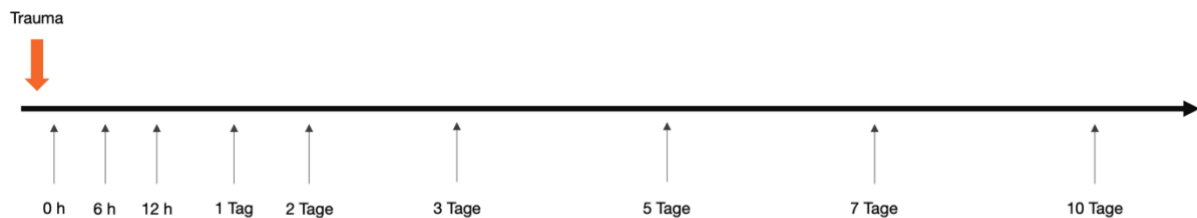


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der Blutentnahmen (nicht maßstabsgetreu). Der erste Zeitpunkt (0 h) entspricht der Aufnahme des entsprechenden Patienten in den Schockraum.

4.3 KONTROLLPROBANDEN

Um außerdem die gewonnenen Ergebnisse mit Daten einer gesunden Kohorte vergleichen zu können, konnten sechs Kontrollprobanden rekrutiert werden, die in Geschlecht und Alter zu sechs der eingeschlossenen Traumapatienten gematcht waren. Dieser Gruppe wurde lediglich einmal Blut abgenommen, wobei die gleichen Röhrchen gefüllt wurden wie bei den polytraumatisierten Patienten. Es wurden allerdings keine Thrombozytenzahl und auch keine anderen Gerinnungsparameter – abgesehen von den ROTEM®-Analysen – erhoben. Auch die hier gewonnenen Resultate wurden pseudonymisiert ausgewertet. Die Einverständniserklärung aller Probanden lag vor.

Material und Methoden

4.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Durchflusszytometrisch wurde die Zahl der CD4+ Tregs und Th17-Zellen sowie die Expression verschiedener Oberflächenmarker auf diesen Zellen sowie auf Thrombozyten bestimmt.

4.4.1 Prinzip

Mittels der Durchflusszytometrie können suspendierte Einzelzellen hinsichtlich ihrer morphologischen und immunologischen Eigenschaften beurteilt werden. Nach Anregung der Zelle durch einen oder mehrere Laser nehmen Photodetektoren für Streulicht und Fluoreszenz das von der Zelle emittierte Signal auf. Ein angeschlossener Computer analysiert die von den Detektoren wahrgenommenen optischen Signale der Einzelzellen, wobei durch die Verarbeitung von bis zu 10 000 Zellen pro Sekunde rasch auch über kleine Subpopulationen innerhalb heterogener Zellsuspensionen valide Aussagen getroffen werden können.

Zur Messung wird die Zellsuspension zunächst in die Durchflussmesszelle geleitet. Dabei werden die Zellen durch einen Hüllstrom (*sheath fluid*) hydrodynamisch fokussiert und passieren nacheinander den Messbereich. In der Messküvette werden die Zellen mit einem oder mehreren Lasern bestrahlt, das infolgedessen durch die Zellen gestreute und emittierte Licht gelangt durch ein System von Filtern und Spiegeln zu den verschiedenen Detektoren. Dabei werden von jedem Impuls die Parameter Höhe und Breite sowie die Fläche unter der Impulskurve aufgezeichnet.

Hinsichtlich der Lichtstreuung wird die Beugung des Lichts – das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) – von der Brechung des Lichts – dem Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) – unterschieden: das Vorwärtsstreulicht korreliert mit der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht hängt von der Struktur der Zelle (Granularität, Kernmorphologie, Dichte) ab. Eine grobe Unterscheidung verschiedener Zelltypen ist mittels dieser beiden Parameter möglich.

Zur genaueren Differenzierung dienen die Fluoreszenzdetektoren: In der Regel wird die Zellsuspension vor der Messung mit monoklonalen Antikörpern inkubiert, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind und gegen eine bestimmte, zur Unterscheidung geeignete Zielstruktur gerichtet sind. Hierfür kommen sowohl membranständige als auch intrazelluläre Proteine infrage, die einerseits über den genauen Zelltyp Aufschluss geben können, aber auch über den Zustand der Zelle – aktiviert oder nicht aktiviert. Ein gleichzeitiger Einsatz verschiedener Antikörper, die jeweils mit einem anderen Farbstoff konjugiert sind, erlaubt eine immer feinere Differenzierung der Zellen. Mittels der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) wird das Vorhandensein eines Merkmals der Zelle nicht nur qualitativ, sondern quantitativ beurteilbar. Die Anzahl an Fluorochromen, die unterschieden werden können, hängt vom eingesetzten Durchflusszytometer ab.

Material und Methoden

4.4.2 Besonderheiten - Begrifflichkeiten

Kompensation

Fluoreszenzfarbstoffe emittieren bei Anregung mit einem Laser Licht eines bestimmten Wellenlängen-Spektrums, wobei sich die Spektren verschiedener Fluorochrome in unterschiedlichem Ausmaß überlagern. Die Verwendung mehrerer Fluorochrome in einem Ansatz macht deshalb eine sogenannte Kompensation nötig, um zu verhindern, dass ein Farbstoff in einem nicht ihm zugeordneten Kanal ein – wenn auch geringeres – Signal verursacht. Die Kompensation entspricht einer mathematischen Korrektur des vorher experimentell ermittelten Anteils an durch andere Fluorochrome vermittelten Impulsen. Zuvor werden die Laser auf die zu den verwendeten Fluorochromen passende Spannung eingestellt, um die Auflösung zwischen ungefärbten und gefärbten Zellen zu optimieren. **Abb. 3** zeigt exemplarisch einen Vergleich zwischen unkompensierter und kompensierter Messung.

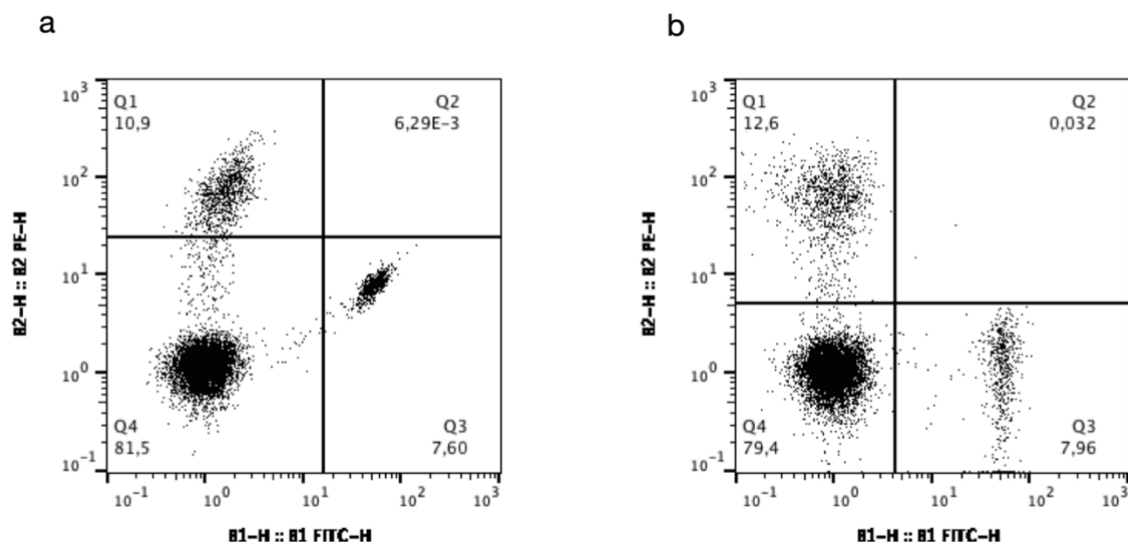


Abb. 3: Vergleich unkompensierter (a) mit kompensierter (b) Messung. Exemplarisch dargestellt sind die Messungen eines Probengemisches aus PE-gefärbter und FITC-gefärbter Probe. (a) Unkompensiert: Die mediane PE-Fluoreszenzintensität der Q3-Population liegt bei 7,67, obwohl diese Zellen nur mit einem FITC-konjugierten Antikörper gefärbt wurden. Die mediane FITC-Fluoreszenzintensität der Q1-Population liegt bei 1,59, obwohl diese Zellen nur mit einem PE-konjugierten Antikörper gefärbt wurden. (b) Kompensiert: Die mediane PE-Fluoreszenzintensität der Q3-Population liegt nun bei 1,01, die mediane FITC-Fluoreszenzintensität der Q1-Population liegt bei 0,95.

Erythrozytolyse und Blockade der Fc-Rezeptoren

Bei der Färbung von insbesondere Leukozyten aus Vollblut mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern ist es notwendig, die Erythrozyten vorher zu lysieren und einen sogenannten Fc-Block durchzuführen. Einerseits wird hierdurch eine Überlagerung der interessierenden Zellpopulation durch die zahlreichen roten Blutkörperchen verhindert, andererseits wird eine unspezifische Bindung von Antikörpern an Fc-Rezeptoren unterbunden, indem die Fc-Rezeptoren mit anti-CD16/32 (Fc-Block) besetzt werden.

Material und Methoden

Gating

Zur Auswertung werden die durchflusszytometrisch gewonnenen Daten ein- oder zweidimensional in Diagramme aufgetragen. Unterschiedliche Zellpopulationen können dann in Abhängigkeit von Größe (FSC), Morphologie (SSC), und Fluoreszenzintensitäten getrennt voneinander analysiert werden. Die sequenziell immer feinere Differenzierung anhand dieser Merkmale wird *Gating* genannt. Durch die Darstellung einer Zellsubpopulation in einem eindimensionalen Diagramm erhält man ein Histogramm zu einem bestimmten Fluoreszenzkanal und kann Aussagen über die Verteilung der Fluoreszenzintensität in der entsprechenden Population treffen.

Ein *Gating*-Schritt ist das Entfernen der sogenannten Doubletten aus der Analyse. Während der Messung kann es vorkommen, dass zwei Zellen, die dicht hintereinander die Messküvette passieren, fälschlicherweise als ein einziges Ereignis aufgezeichnet werden. Derartige Doubletten liefern im FSC ein Signal, das bezüglich der Höhe (*height*, FSC-H) identisch ist mit dem eines Einzelereignisses, sich jedoch sowohl in Breite (*width*, FSC-W) als auch der Fläche unter der Signalkurve (*area*, FSC-A) unterscheidet. Diese Eigenschaft macht man sich beim Einzelzell-*Gating* zunutze.

4.4.3 Methodik

4.4.3.1 Th17/ CD4+ Treg

Für die Durchflusszytometrie der Th17-Zellen und CD4+ Tregs wurden die Fluorochrome Allophycocyanin (APC), Phycoerythrin (PE), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Alexa Fluor® 488 (annähernd FITC-identisch), eFluor 450™ und Allophycocyanin-eFluor®780 (APC-eFluor®780) verwendet. Deshalb wurde im Rahmen der Etablierung des Versuchsprotokolls eine Fünf-Farben-Kompensation durchgeführt.

Die in der Studie verwendeten Antikörper wurden titriert, um die zum Färben notwendige Menge zu bestimmen, als Orientierungshilfe dienten die Herstellerempfehlungen.

Im Rahmen der durchgeführten Versuche gestaltete sich die Aufbereitung der Blutproben zur durchflusszytometrischen Messung folgendermaßen: In insgesamt vier 15 ml Schraubröhren (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) wurden jeweils 2 ml EDTA-antikoaguliertes Blut zu 13 ml einer Erythrozytenlyselösung (s. **Tabelle 1**) gegeben und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde bei 1500 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und jedes Zellpellet mit 500 µl PBA (s. **Tabelle 1**) resuspendiert. Die vier Suspensionen wurden zusammengeführt und erneut bei 1500 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstands wurde mit 210 µl PBA resuspendiert, 225 µl der entstandenen Zelllösung wurden in ein 2 ml SafeSeal Reagiergefäß (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) transferiert und nach Zugabe von 4,5 µl Fc-Block-Lösung (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Währenddessen wurde eine 96-Well Rundbodenplatte (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) mit den in **Tabelle 2** aufgeführten Antikörpern vorbereitet. Je Well wurden

Material und Methoden

5 µl einer der beiden Identifikationsantikörperlösungen und jeweils die in **Tabelle 2** angegebene Menge eines Marker-Antikörpers vorgelegt. Zur Erleichterung des späteren Gatings wurde in einem Well pro Zelltyp der Markerantikörper weggelassen, zudem befanden sich in einem Well keine Antikörper. Nach Ablauf der Inkubationszeit der Fc-Block-Lösung wurden je 15 µl der Zellsuspension in jedes der vorbereiteten Wells pipettiert, es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 4 °C unter Lichtschutz. Nach Zugabe von 200 µl PBA je Well wurde bei 500 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zur Messung mit 200 µl PBA je Well resuspendiert.

Für die Analysen wurde ein MACSQuant®-Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet, welches durch drei Laser (405 nm, 488 nm, 640 nm) und fünf verschiedene Filter die Differenzierung von sieben verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht. Vor den Untersuchungen wurde das Gerät gemäß Herstelleranweisung mit MACSQuant® Calibration Beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) kalibriert. Gemessen wurden vollautomatisiert 190 µl Probe je Well mit je einem Waschschrift zwischen den einzelnen Analysen. Die Flussgeschwindigkeit war auf 25 µl pro Minute eingestellt, um die Zahl an aufgezeichneten Ereignissen auf unter 10 000 pro Sekunde zu halten. Während der Messung wurden die Proben auf dem Chill 96 Rack (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gekühlt.

Tabelle 1: Zusammensetzungen der im Rahmen der Durchflusszytometrie verwendete Lösungen.

	Menge	Stoff	Hersteller
Erythrozytenlyse	1 l	Destilliertes Wasser	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
	8,3 g	Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
	1,0 g	Kaliumcarbonat (K ₂ CO ₃)	Caesar & Lorentz GmbH, Hilden
	0,1 g	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PBA	1 l	Phosphat-gepufferte Salzlösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	10 g	Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	1 g	Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Material und Methoden

Tabelle 2: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen der Th17-Zellen und Tregs.

	Volumen [µl]	Epitop (Klon)	Fluorochrom	Hersteller
Th17- Identifikation	0,7	Maus anti-Human CD4 (OKT4)	APC	eBioscience, San Diego, USA
	3,5	Maus anti-Human CD161 (HP-3G10)	eFluor® 450	eBioscience, San Diego, USA
	14	Maus anti-Human CD196/CCR6 (R6H1)	FITC	eBioscience, San Diego, USA
	21	PBA-Puffer		
CD4+ Treg- Identifikation	0,7	Maus anti-Human CD4 (OKT4)	Alexa Fluor® 488	eBioscience, San Diego, USA
	3,5	Maus anti-Human CD25 (BC96)	eFluor® 450	eBioscience, San Diego, USA
	7	Maus anti-Human CD127 (eBioRDR5)	APC-eFluor® 780	eBioscience, San Diego, USA
	28	PBA-Puffer		
Marker	0,025	Ratte anti-Human/ Maus CD44 (IM7)	PE	eBioscience, San Diego, USA
	2,0	Maus anti-Human CD69 (FN50)	PE	eBioscience, San Diego, USA
	0,1	Maus anti-Human CD62L (DREG-56)	PE	eBioscience, San Diego, USA
	1,0	Ratte anti-Human CD120b (hTNFR-M1)	PE	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
	0,2	Maus anti-Human CD357 (eBioAITR)	PE	eBioscience, San Diego, USA
	2,0	Maus anti-Human IL- 17A	PE	LifeSpan Biosciences, Nottingham, UK

4.4.3.2 Thrombozyten

Bei der Färbung der Thrombozyten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für die durchflusszytometrischen Messungen orientierten wir uns an einem Booklet zur durchflusszytometrischen Untersuchung der Thrombozytenfunktion (Brodde, Jurk et al. s.a.). Es wurden vier Fluorochrome benutzt: Allophycocyanin (APC), Phycoerythrin (PE), Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und VioBlue. Analog zur Analyse der Th17/ CD4+ Treg-Zellen wurde deshalb im Rahmen der

Material und Methoden

Etablierung dieses Messansatzes eine Vier-Farben-Kompensation durchgeführt. Die verwendeten Antikörper (siehe **Tabelle 3**) wurden in Vorversuchen titriert.

Die Messungen erfolgten an plättchenreichem Plasma (PRP), nachdem sich in Vorversuchen herausgestellt hatte, dass die Ergebnisse mit Messungen in Vollblut vergleichbar sind. Es kann durch die Verwendung von PRP allerdings der Stress auf die Thrombozyten durch eine ansonsten notwendige Erythrozytolyse vermieden werden, die gewonnene Probe ist zudem reiner als lysiertes Vollblut.

Gewonnen wurde das PRP durch zehnminütige Zentrifugation von Zitratblut bei 190 g. Im Anschluss daran wurden 50 µl des Überstandes – also des PRPs – in ein 2 ml SafeSeal Reagiergefäß (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen und nach Zugabe von 50 µl PBS und 50 µl einprozentigem Paraformaldehyd (ROTIPURAN® 37 % (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in PBS verdünnt) 30 Minuten inkubiert und dadurch fixiert. Die Fixierung wurde durch Zugabe von 1 ml PBA (s. **Tabelle 1**) gestoppt, es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 500 g. Nach Abnahme des Überstandes wurden 10 µl PBA sowie jeweils 0,5 µl der in **Tabelle 3** gelisteten Antikörper zugegeben. Die Probe wurde für 45 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Erneut wurde durch Zugabe von 1 ml PBA und Zentrifugation bei 500 g für 10 Minuten gewaschen. Gemessen wurde nach Abnahme des Überstandes und Zugabe von 410 µl PBS.

Analysiert wurden die Proben wie auch Th17-Zellen und CD4+ Tregs (vgl. 4.4.3.1) am MACSQuant®-Durchflusszytometer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland): Bei 50 µl pro Minute Flussgeschwindigkeit wurden 200 µl gemessen, um die Zahl erfasster Ereignisse gemäß Herstelleranweisung unter 10 000 pro Sekunde zu halten.

Tabelle 3: Für die durchflusszytometrischen Messungen der Thrombozyten verwendete Antikörper.

Epitop (Klon)	Fluorochrom	Hersteller
Maus anti-Human CD41 (HIP8)	Pacific Blue™	BioLegend, San Diego, USA
Maus anti-Human/Maus CD62P (Psel.KO2.3)	APC	eBioscience, San Diego, USA
Maus anti-Human CD63 (H5C6)	PE	BioLegend, San Diego, USA
Maus anti-Human TLR9 (5G5)	FITC	abcam, Cambridge, UK

4.4.3.3 Thrombozyten – Positivkontrolle

In einem Vorversuch wurde die Thrombozytenfärbung analog zur Beschreibung in 4.4.3.2 an fünf gesunden freiwilligen Kontrollprobanden durchgeführt. Um eine Positivkontrolle zu erzeugen, wurden die Thrombozyten vor der Fixierung mit TRAP-6 (*Thrombin receptor activating peptide 6*) (tocris, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) in unterschiedlichen Konzentrationen aktiviert. Hierfür wurden zu 50 µl PRP je 50 µl TRAP-6 in PBS in den Konzentrationen 0 µM, 12,5 µM, 200 µM gegeben, woraus jeweils eine Endkonzentration von 0 µM, 6,25 µM, 100 µM resultierte. Nach

Material und Methoden

vierminütiger Inkubation wurde mit Paraformaldehyd fixiert und das Protokoll wie oben beschrieben fortgesetzt.

4.4.4 Auswertung

Ausgewertet wurden die durchflusszytometrischen Daten mit der Software FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA).

4.4.4.1 Th17/ CD4+ Treg

Im FSC-A/FSC-H Diagramm wurden die Einzelzellen selektiert, aus den Einzelzellen in FSC-H/SSC-H die Lymphozyten. Aufgrund der in der Einleitung dargelegten Überlegungen definierten wir Th17-Zellen als CD4+, CD161+ und CD196+, regulatorische T-Zellen als CD4+, CD25+ und CD127-. Die entsprechenden *Gates* wurden unter Zuhilfenahme der jeweils mitgeführten ungefärbten Kontrolle gesetzt. Die Gatingstrategien können **Abb. 4** und **Abb. 5** entnommen werden.

Zur Bestimmung der Zahl von Th17-Zellen und CD4+ Tregs wurden diese jeweils ins Verhältnis zur Gesamtheit der CD4+ Zellen gesetzt, es werden hier also nicht absolute Zahlen angegeben, sondern der Anteil an Th17-Zellen und CD4+ Tregs an allen CD4+ Zellen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich außerdem mit der Expression von IL-17A auf Th17-Zellen und CD4+ Tregs, hierfür wurde die relative MFI des Fluoreszenzfarbstoffes PE in den entsprechend *gategeten* Zellpopulationen als Maß bestimmt. Die MFI von PE in der mit dem IL-17A-Antikörper gefärbten Zellpopulation wurde dafür in Relation zu der MFI von PE gesetzt, die auf der gleichen Zellpopulation in einem nicht-PE-gefärbten Ansatz gemessen wurde.

Material und Methoden

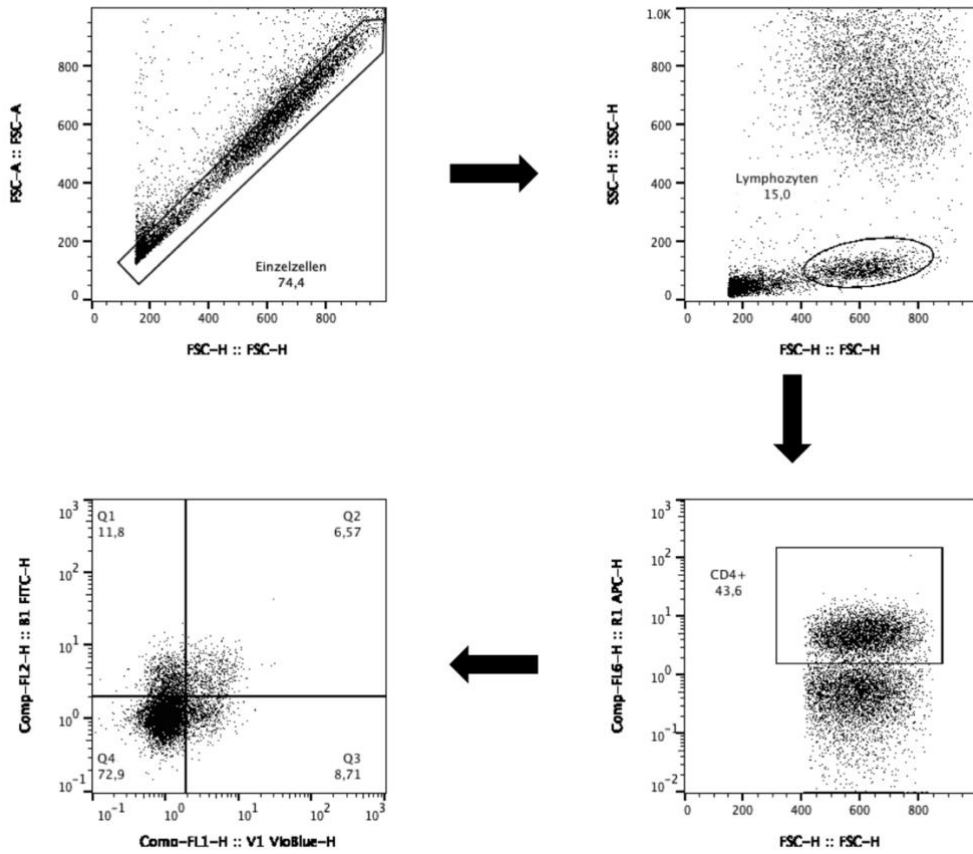


Abb. 4: Strategie für das Gating von Th17-Zellen exemplarisch an Patient 7 zu Zeitpunkt 6 (72 h). Nach der Einzelzellselektion wurden aus diesen die Lymphozyten entsprechend ihres typischen FSC/SSC-Profiles entnommen. Im nächsten Schritt wurden die CD4-positiven Lymphozyten anhand der APC-Fluoreszenz ausgewählt. Im VioBlue/FITC-Diagramm wurden im letzten Schritt die CD4+ Lymphozyten erkannt, die sowohl CD161- als auch CD196-positiv waren (Q2).

Material und Methoden

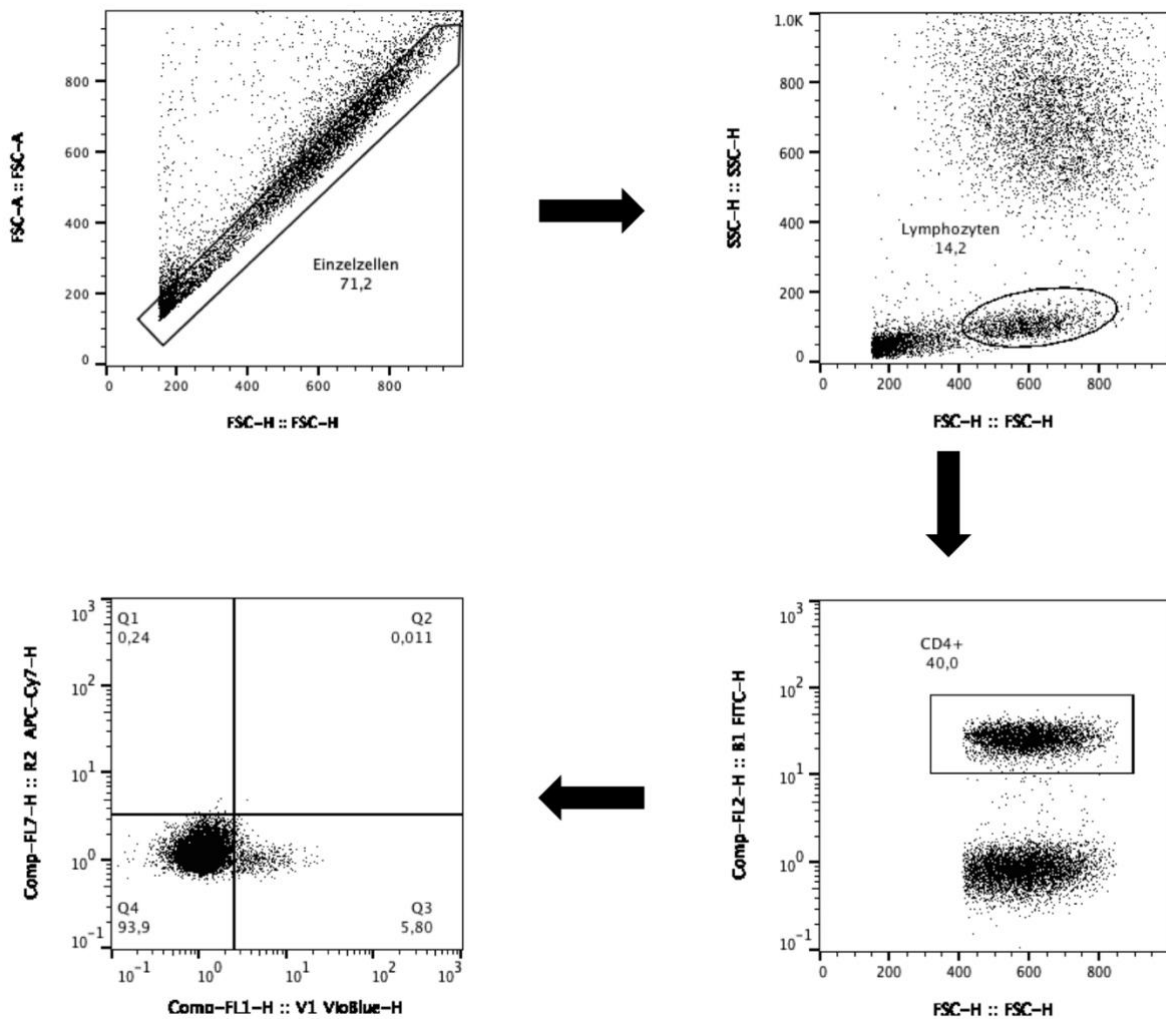


Abb. 5: Strategie für das Gating von CD4⁺ Tregs exemplarisch an Patient 7 zu Zeitpunkt 6 (72 h). Nach der Einzelzellselektion wurden aus diesen die Lymphozyten entsprechend ihres typischen FSC/SSC-Profiles entnommen. Im nächsten Schritt wurden die CD4-positiven Lymphozyten anhand der FITC-Fluoreszenz ausgewählt. Im VioBlue/APC-Cy7-Diagramm wurden im letzten Schritt die CD4⁺ Lymphozyten erkannt, die zwar CD25 positiv, aber CD127-negativ waren (Q3).

4.4.4.2 Thrombozyten

Auch hier wurden zunächst im FSC-H/FSC-A-Diagramm die Einzelzellen selektiert, Thrombozyten wurden im Anschluss daran durch die Expression von CD41 identifiziert. Um eine mögliche Aktivierung der Thrombozyten zu erkennen, wurde die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von APC, PE und FITC als Maß für die Expression von CD62L, CD63 und TLR9 auf den Thrombozyten bestimmt.

Material und Methoden

4.5 ROTEM® THROMBELASTOMETRIE

In der hier vorgestellten Studie wurde die Rotationsthrombelastometrie mittels ROTEM® delta (Tem Innovations GmbH, München, Deutschland) zur Evaluation der hämostaseologischen Thrombozytenfunktion eingesetzt.

4.5.1 Prinzip

Die Rotationsthrombelastometrie ist ein viskoelastisches Verfahren zur Gerinnungsdiagnostik in Echtzeit, wobei im Vergleich zu herkömmlichen Methoden auch Aussagen über Gerinnungskinetik, Gerinnselfestigkeit und Fibrinolyse getroffen werden können.

Vollblut wird zusammen mit einem Gerinnungsaktivator in eine Küvette (*Cup*) pipettiert, in welche ein zylindrischer Stempel (*Pin*) ragt. Der *Pin* rotiert um $\pm 4,75^\circ$ und wird, sobald die Gerinnung einsetzt, in seiner Bewegung gebremst, wobei die Intensität der Bewegungseinschränkung abhängig ist von der Festigkeit und Qualität des Gerinnsels. Die erfassten Änderungen in der Kinetik des *Pins* werden sowohl graphisch (TEMogramm) als auch numerisch ausgegeben. Gemessen wird für die Dauer einer Stunde. In der Regel wird zitriertes Vollblut verwendet, das ROTEM® delta hält während der Messung 37 °C, entsprechend der physiologischen Körpertemperatur.

4.5.2 Messansätze

Es stehen verschiedene Reagenzien zur Verfügung, mit denen sich die Gerinnung beispielsweise nach extrinsischer (extem) und intrinsischer (intem) Aktivierung sowie ohne Thrombozyteneinfluss (Fibtem) untersuchen lässt. Eben diese drei Versuchsansätze wurden in der hier vorgestellten Studie verwendet. Mit heptem böte sich außerdem die Möglichkeit, einen eventuellen Heparineinfluss auszublenden, im aptem-Ansatz würde eine gegebenenfalls vorliegende Fibrinolyse inhibiert. Im natem-Ansatz wird die Gerinnung ohne Gerinnungsaktivator beurteilt.

Für die extem-Messung wird das zitrierte Vollblut zunächst mit star-tem Reagenz rekalkifiziert, dann wird die Gerinnung mit r ex-tem Reagenz, welches rekombinantes Gewebethromboplastin enthält, aktiviert und die Messung gestartet. Der intem-Ansatz läuft analog ab, allerdings wird hier zum Auslösen der Gerinnung in-tem Reagenz verwendet, welches partielles Thromboplastin-Phospholipid aus Kaninchenhirn enthält. Für die Fibtem-Untersuchung wird fib-tem-Reagenz verwendet, welches Kalziumionen zur Rekalkifizierung und Cytochalasin D zur Inhibition der Thrombozyten enthält. Die Gerinnung wird mit r ex-tem-Reagenz aktiviert. Alle verwendeten Reagenzien sind von Tem Innovations GmbH zu beziehen (München, Deutschland).

Material und Methoden

4.5.3 Parameter

Thrombelastometrische Messungen ergeben verschiedene Parameter, die im Folgenden kurz erklärt werden sollen. **Abb. 6** zeigt die Werte in einem TEMogramm.

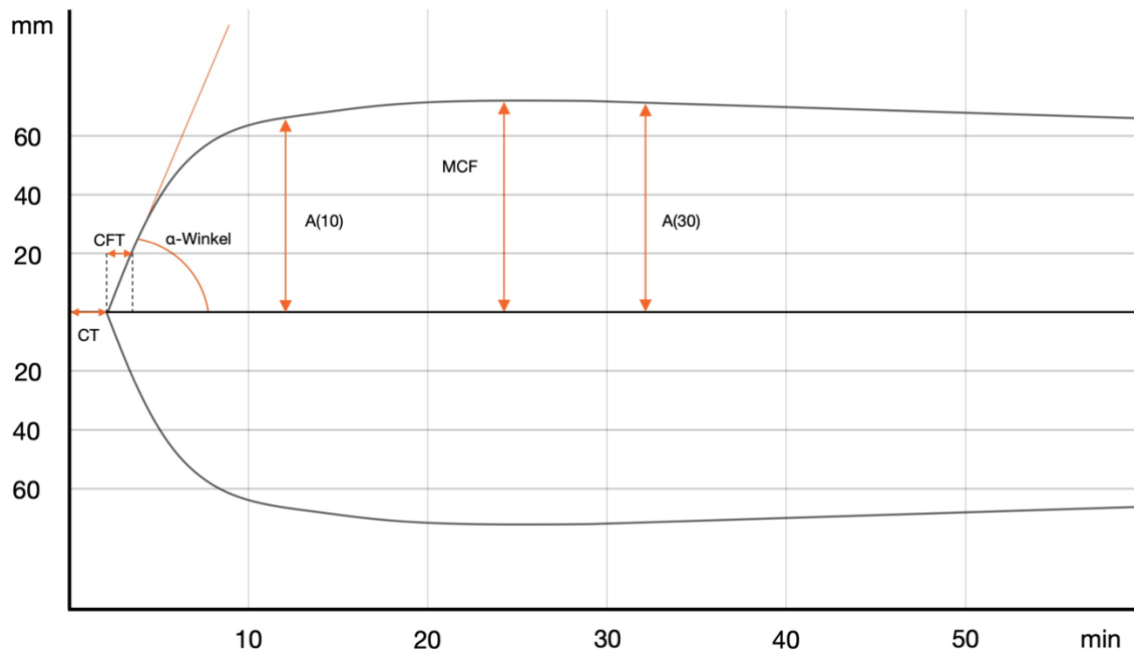


Abb. 6: Ein typisches TEMogramm einer extem-Messung. Die x-Achse bezeichnet die abgelaufene Zeit der Messung in der Einheit Minuten. Die y-Achse bezeichnet den Ausschlag bzw. die Amplitude der Veränderung der Bewegung des Pins im Messgefäß in der Einheit mm. Eingezeichnet sind die Parameter Gerinnungszeit (Clotting Time, CT), Gerinnselbildungszeit (Clot Formation Time, CFT), der α -Winkel, die maximale Gerinnselfestigkeit (Maximum Clot Firmness, MCF) und beispielhaft für die $A(x)$ -Werte der $A(10)$ - und $A(30)$ -Wert.

CT – Clotting Time – Gerinnungszeit

Die CT beschreibt die Zeit, die es dauert, bis erstmals eine Inhibition der Pinbewegung und damit ein Einsetzen der Gerinnung detektiert werden kann und wird in Sekunden angegeben. Im Extem-Ansatz sollte die CT dem Quick-Wert, in der Intem-Messung sollte die CT der aPTT entsprechen.

CFT – Clot Formation Time – Gerinnselbildungszeit

Die CFT beginnt mit dem Ende der CT, also bei Einsetzen der Gerinnung, und endet beim Erreichen einer Amplitude von 20 mm. Auch sie wird in Sekunden angegeben und beschreibt die Zeit, die es dauert, bis sich ein hinreichend festes Gerinnsel bildet.

Alpha-Winkel

Der Alpha-Winkel wird von der Geraden, die den Beginn der CFT mit dem 20 mm Punkt verbindet, und der Horizontalen gebildet. Auch er stellt ein Maß für die Geschwindigkeit dar, mit der sich ein festes Gerinnsel bildet.

Material und Methoden

MCF – *Maximum Clot Firmness* – Maximale Gerinnselfestigkeit

Die MCF entspricht der maximalen Amplitude der Kurve im TEMogramm. Sie wird in Millimetern angegeben. Mit der MCF wird – der Bezeichnung entsprechend – die Festigkeit und damit die Qualität des Gerinnsels beschrieben, es gibt keine Entsprechung in der herkömmlichen Gerinnungsdiagnostik.

A(x)-Werte

Die A(x)-Werte beschreiben die Gerinnselfestigkeit zu definierten Zeitpunkten, wobei A(x) die Festigkeit zum Zeitpunkt CT + x angibt. Auch sie werden in Millimetern angegeben und erlauben eine gewisse Prognose bezüglich des zu erwartenden MCF-Wertes. Dabei bieten sie den Vorteil der schnelleren Verfügbarkeit im Vergleich zur MCF.

LI(x)– *Lysis Index* – Lyseindex

Der LI(x) gibt die Gerinnselfestigkeit x Minuten nach Beginn der Gerinnung an prozentual zur MCF an und weist bei Werten < 85 % auf das Vorliegen einer Hyperfibrinolyse hin.

ML – *Maximum Lysis* – Maximale Lyse

Die ML entspricht dem prozentualen Anteil an der MCF, um den die letzte gemessene Gerinnselfestigkeit geringer ist, als die MCF. Ein hoher Wert lässt auf eine eventuelle Hyperfibrinolyse schließen.

4.5.4 Methodik

In der hier vorgestellten Studie wurde mit Extem, Intem und Fibtem gemessen. Eingeschaltet wurde das Gerät bereits vor der Blutentnahme, um eine ausreichende Temperierung auf 37 °C zu ermöglichen. Die teilautomatisierten Pipettiervorgänge wurden jeweils gemäß Herstelleranweisung durchgeführt.

4.5.5 Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich die ermittelten MCF-Werte der Patienten ausgewertet. Anhand der MCF, die aus der Differenz zwischen extem- und fibtem-MCF resultiert, ist ein Abschätzen der thrombozytären Beteiligung an der Gerinnselfestigkeit möglich (Lang and von Depka 2006).

Material und Methoden

4.6 LUMINEX® MAGPIX-TECHNOLOGIE

4.6.1 Prinzip

Das Prinzip der Luminex MagPix-Technologie beruht, wie auch die Durchflusszytometrie, auf der Messung der Intensität der Fluoreszenz, die von fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die an die zu analysierenden Stoffe gebunden sind, emittiert wird. Um dabei eine Multiplex-Analyse zu ermöglichen, also die Untersuchung mehrerer Stoffe in einer Probe mit einer Messung, werden sogenannte Beads benutzt. Diese Beads sind carboxylierte Polystyren-Mikropartikel, die, abhängig von der Art der verwendeten Beads, eine unterschiedliche Zahl exakt farblich markierter Regionen aufweisen. Diese Regionen binden spezifisch jeweils einen Analyten, wodurch die unterschiedlichen Stoffe voneinander unterschieden werden können. An die gebundenen Analyten wird dann über einen Detektionsantikörper der Fluoreszenzfarbstoff aufgetragen, dessen Fluoreszenzintensität vom Gerät gemessen wird. Durch die Anfertigung einer Standardverdünnungsreihe können in der Auswertung dann die Fluoreszenzintensitäten bestimmten Konzentrationen der analysierten Stoffe zugewiesen werden. Im vorliegenden Fall wurden magnetische Beads verwendet, welche in Kombination mit einer Magnetplatte die Handhabung der Waschschritte erleichtern, wodurch es zu weniger Verlusten kommt.

4.6.2 Auswahl des Kits

Für die Messung entschieden wir uns für das ProcartaPlex® Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg 18-plex Kit (eBioscience, San Diego, USA). Dieses Kit ermöglicht die Messung von 18 Zytokinen aus einer Serumprobe: GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor), TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27. Das Kit ist gemäß Herstellerangabe für die Anwendung mit humanem Blutserum geeignet und hinsichtlich der Analyten entworfen, um die für die verschiedenen T-Helferzell-Subpopulationen typischen Zytokine zu messen. Wir erhofften uns, aus der Messung Rückschlüsse auf die Aktivität von insbesondere den Th17-Zellen und regulatorischen T-Zellen ziehen zu können und so auch auf diese Weise die Immunantwort auf Trauma näher zu charakterisieren. Deshalb fiel unsere Wahl auf dieses Panel.

4.6.3 Methodik

4.6.3.1 Probenaufbereitung

Im Anschluss an die Blutentnahme wurde die jeweils befüllte Sarstedt S-Monovette® mit Gerinnungsaktivator (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) bei 1500 g für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand – das Serum – in 2 ml SafeSeal Reagiergefäße (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) zu je 0,5 ml aliquotiert und bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren.

Material und Methoden

4.6.3.2 Messung

Wie in Kapitel 4.6.2 beschrieben, wurde für die Messungen das ProcartaPlex® Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg 18-plex Kit (eBioscience, San Diego, USA) verwendet.

Je Patient und Zeitpunkt sowie je Kontrolle wurde eines der eingefrorenen Serumaliquots auf Eis aufgetaut. Das zur Messung verwendete Luminex Magpix® wurde vor der Messung mittels Performance Verification Kit und Calibrator Kit (sämtlich von Luminex Corporation, Austin, USA) kalibriert. Das Kit-Protokoll wurde gemäß der Anweisung des Herstellers durchgeführt.

Es erfolgte zunächst die Vorbereitung des Standards in einer Vierfach-Verdünnungsreihe von nicht verdünnt bis 4₆-fach verdünnt. Im nächsten Schritt wurde in jedes Well der im Kit beiliegenden 96-Well-Platte der Antikörper-Magnetbead-Mix vorgelegt. Nach zwei Waschschrritten mithilfe einer Magnetplatte wurde je Well entweder eine Serumprobe oder ein Standard hinzugefügt, wobei für jeden der Standards zwei Wells vorgesehen waren. In zwei weitere Wells wurde lediglich Puffer pipettiert, um ein mögliches Hintergrundsignal detektieren zu können. Nach Verschluss der Platte wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem auf 500 rpm (*revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute) eingestellten Rüttler inkubiert. Im Anschluss an zwei weitere Waschschrritte mittels Magnetplatte wurde jeweils der Detektions-Antikörper-Mix hinzugefügt. Es folgte eine erneute Inkubation für 30 Minuten unter oben genannten Bedingungen. Nach zwei Waschschrritten mithilfe der Magnetplatte wurde in jedes Well die Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung pipettiert und wieder für 30 Minuten unter oben genannten Bedingungen inkubiert. Erneut wurde zweimal mittels Magnetplatte gewaschen und der im Kit enthaltene Messpuffer in jedes Well pipettiert. Nach einem letzten 5-minütigen Inkubationsschritt wurde die Platte mit dem Luminex Magpix® (Luminex Corporation, Austin, USA) ausgelesen.

Die Zuordnung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten zu Zytokinkonzentrationen erfolgte automatisiert mittels der geräteeigenen Software anhand von durch die Standardreihe berechneten Standardkurven.

Material und Methoden

4.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für die Organisation und Aufbereitung der Daten wurde Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet, die statistische Auswertung der Patientendaten erfolgte mit IBM SPSS Statistics (IBM Corporation, Endicott, USA). Grafiken wurden mit Microsoft PowerPoint (Microsoft Corporation, Redmond, USA) erstellt.

Die klinischen Parameter der Patienten sind jeweils als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben. Bei einigen Studienpatienten fehlen einzelne Datenpunkte. Deshalb wurden zur statistischen Analyse der durchflusszytometrischen Messgrößen und ROTEM®-Daten der Patienten in Rücksprache mit dem Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMSE) der Technischen Universität München verallgemeinerte Schätzungsgleichungen mit einer austauschbaren Korrelationsmatrix angewandt. Als Einflussfaktoren wurden das Geschlecht der Patienten, ihr Alter und der ISS mit einberechnet. Der ISS wurde hierfür dichotomisiert, da er weder stetig ist noch linear mit der Verletzungsschwere korreliert. Die beiden Gruppen waren „ISS < 25“ und „ISS \geq 25“. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Als weitere Parameter sind der Regressionskoeffizient B, der Standardfehler (SE) und das 95 %-Konfidenzintervall (95% CI) angegeben.

Für die statistische Auswertung der Positivkontrolle der Thrombozytenfärbung wurde aufgrund der geringen Stichprobengröße keine Normalverteilung angenommen und deshalb der nonparametrische Friedman-Test verwendet. *Post hoc* wurde mit dem Dunn's-Bonferroni-Test analysiert. Auch hier wurde ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

In der Untersuchung der Daten der polytraumatisierten Patienten im Hinblick auf Unterschiede zu einer gesunden Kontrollgruppe wurde jeweils ein Quotient aus dem zu einem bestimmten Zeitpunkt erhobenen Wert des Polytraumapatienten und dem Wert der passenden gesunden Kontrolle gebildet. Diese Werte wurden dann mittels t-Test für eine Stichprobe gegen den Wert 1 verglichen, um mögliche Unterschiede aufzuzeigen. Aufgrund des explorativen Charakters der vorliegenden Arbeit wurde das Signifikanzniveau trotz Mehrfachtestung nicht korrigiert und auf $p < 0,05$ belassen.

Ergebnisse

5 ERGEBNISSE

Ein Teil der hier beschriebenen Daten, gewonnen aus dem Einschluss von 10 Patienten, wurde bereits mit den Daten von 10 weiteren Patienten kombiniert und publiziert (Hefele, Ditsch et al. 2019). Bei diesen Ergebnissen handelt es sich um den Anteil der Th17-Zellen und CD4+ Tregs, die IL-17A-Expression auf Th17-Zellen und CD4+ Tregs, die Thrombozytenzahl sowie thrombelastometrisch die MCF in extem, fibtem und die thrombozytäre MCF.

5.1 PATIENTENKOLLEKTIV

Im Zeitraum von Dezember 2014 bis April 2015 konnten die ersten 10 schwerverletzten Patienten in die Studie eingeschlossen werden. 70 % der Studienteilnehmer war männlich, das mittlere Alter betrug $44,9 \pm 21,8$ Jahre. Bei 7 der Patienten lag dem Polytrauma ein Verkehrsunfall, bei 3 der Patienten ein Suizidversuch zugrunde.

Der mittlere ISS betrug $33,0 \pm 12,7$ Punkte, dabei hatten 60 % der Patienten einen $ISS \geq 30$. Der mittlere GCS (*Glasgow coma scale*) am Unfallort lag bei $9,4 \pm 5,1$ Punkten. Im Schockraum belief sich der GCS im Mittel auf $7,3 \pm 5,9$ Punkte, hier fehlten bei zwei Patienten die Werte.

Bei allen Patienten lagen Verletzungen im Bereich der Extremitäten und des Beckengürtels mit einem mittleren AIS von $3,0 \pm 1,1$ vor. Die im Durchschnitt schwersten Verletzungen fanden sich im Thoraxbereich – 80 % der Patienten waren hier mit einem durchschnittlichen AIS von $3,9 \pm 0,8$ betroffen.

80 % der Patienten überlebten, in der Gruppe der Überlebenden belief sich der ISS im Mittel auf $27,9 \pm 7,3$ Punkte. Das überlebende Patientenkollektiv verbrachte im Schnitt $17,0 \pm 20,5$ Tage auf der Intensivstation und benötigte $3,6 \pm 2,3$ Operationen. 50% der Überlebenden entwickelte zeitweise ein MODS, wobei die Atmung bei allen MODS-betroffenen Patienten beeinträchtigt war. Ein Nieren- oder Leberversagen war bei keinem der Patienten zu beobachten. Auch eine Sepsis entwickelte keiner der Patienten.

Einen Überblick über die eingeschlossenen Patienten bietet **Tabelle 4**.

5.2 FEHLENDE MESSWERTE

Wie schon in 4.7 erwähnt, liegen nicht von allen der zehn eingeschlossenen Patienten für jeden der neun Zeitpunkte Messwerte vor. Die Gründe hierfür sind vielfältig: Zwei Patienten verstarben im Laufe des Klinikaufenthaltes nach zwei und nach fünf Messungen. Ein Patient wurde aus einem peripheren Krankenhaus zuverlegt, wodurch die erste Blutentnahme erst zum Zeitpunkt 3, also zwölf Stunden nach Trauma, durchgeführt werden konnte. Bei zwei weiteren Patienten fand die erste Blutentnahme erst zum Zeitpunkt 2 – sechs Stunden nach Trauma – statt. Zwei Patienten wurden bereits nach Zeitpunkt 8, sieben Tage nach Trauma, entlassen oder verlegt. Insgesamt ergeben sich daraus 18 fehlende Messzeitpunkte von möglichen 90.

Ergebnisse

Tabelle 4: Demographische Daten der eingeschlossenen Patienten.

Variable	Häufigkeit n	Mittelwert Standardabweichung	±
Patientenzahl	10		
Alter [Jahre]		44,9 ± 21,8	
< 55	7	33,9 ± 14,6	
≥ 55	3	70,7 ± 9,3	
Geschlecht			
männlich	7		
weiblich	3		
Unfallmechanismus			
Verkehrsunfall	7		
Suizidversuch	3		
GCS am Unfallort	10	9,4 ± 5,1	
GCS im Schockraum	8	7,3 ± 5,9	
AIS			
Kopf/Hals	6	3,3 ± 1,0	
Gesicht	5	2,8 ± 0,4	
Thorax	8	3,9 ± 0,8	
Abdomen/Beckeninhalt	4	2,5 ± 1,3	
Extremitäten/Beckengürtel	10	3,0 ± 1,1	
äußerlich	5	1,2 ± 0,4	
ISS		33,0 ± 12,7	
< 25	3	19,7 ± 2,1	
≥ 25	7	38,7 ± 10,7	
verstorben	2		
überlebend	8		
Intensivaufenthalt [Tage]		17,0 ± 20,5	
Anzahl der Operationen		3,6 ± 2,3	
MODS	4		

GCS: Glasgow Coma Scale, AIS: Abbreviated Injury Scale, ISS: Injury Severity Score, MODS: Multiple Organ Dysfunction Syndrome

Ergebnisse

5.3 KONTROLLPROBANDEN

Alle sechs Kontrollprobanden (vgl. 4.3) waren männlichen Geschlechts, ihr Alter lag im Mittel bei $32,7 \pm 15,1$ Jahren (MW \pm SD). Es waren – insbesondere in Hinblick auf Gerinnung und Immunologie – keine relevanten Vorerkrankungen bekannt.

5.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde verwendet, um Th17-Zellen und CD4+ Tregs im peripheren Blut der schwerverletzten Patienten zu quantifizieren und um ihre Expression von IL-17A zu evaluieren.

Ferner sollte eine mögliche Aktivierung der Thrombozyten anhand der Expression von CD62P, CD63 und TLR9 erkannt werden.

5.4.1 *Th17/ CD4+ Tregs*

5.4.1.1 Th17/CD4+-Quotient, CD4+ Treg/ CD4+-Quotient, Th17/ CD4+Treg-Quotient

Wie in 4.4.4.1 dargestellt, wurde zur Quantifizierung der Th17-Zellen und CD4+ Tregs jeweils ihr Anteil an der Gesamtzahl der CD4+ Lymphozyten bestimmt. Die statistischen Maßzahlen der Auswertung liefert **Tabelle 5**.

Der Anteil der Th17-Zellen an allen CD4+ Lymphozyten lag im Mittel über alle Zeitpunkte und Patienten bei $0,045 \pm 0,037$ (MW \pm SD). Über den Beobachtungszeitraum war keine signifikante Änderung zu verzeichnen (s. **Abb. 7**). Männer hatten mehr Th17-Zellen als Frauen. Auch das Alter der Patienten spielte eine Rolle, mit höherem Alter war auch eine höhere Th17-Zellzahl zu beobachten. Keinen signifikanten Einfluss hatte die Verletzungsschwere.

Bei den CD4+ Tregs lag der Anteil an CD4+ Lymphozyten im Mittel über alle Zeitpunkte und Patienten bei $0,040 \pm 0,015$ (MW \pm SD). Es war über den Beobachtungszeitraum ebenfalls keine signifikante Änderung zu beobachten (s. **Abb. 8**). Das Alter der Patienten hatte jedoch Einfluss: Höheres Alter ging mit höheren Zahlen von CD4+ Tregs einher. Weder beim Vergleich der Geschlechter, noch beim Vergleich der Verletzungsschwere waren signifikante Unterschiede zu beobachten.

Weiterhin wurde der Quotient aus Th17-Zellen und CD4+ Tregs bestimmt. Der Mittelwert dieses Quotienten lag über alle Zeitpunkte und Patienten bei $1,368 \pm 1,500$ (MW \pm SD). Er veränderte sich während des Beobachtungszeitraumes nicht signifikant (s. **Abb. 9**), war allerdings bei Männern höher als bei Frauen. Alter und Verletzungsschwere hatten keinen signifikanten Einfluss.

Ergebnisse

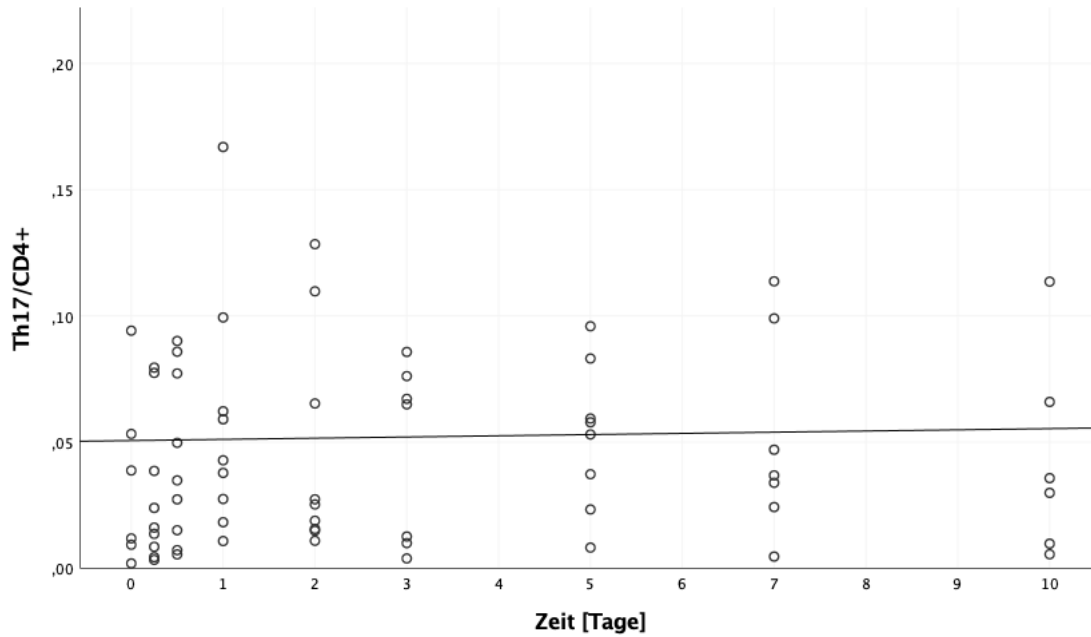


Abb. 7: Entwicklung des Anteils der Th17-Zellen an den CD4+ Lymphozyten im Laufe des Beobachtungszeitraumes. Jeder Kreis repräsentiert die Messung eines Patienten. Die Gerade entspricht näherungsweise der verallgemeinerten Schätzungsgleichung, der Anstieg über die Zeit ist nicht signifikant ($p = 0,549$).

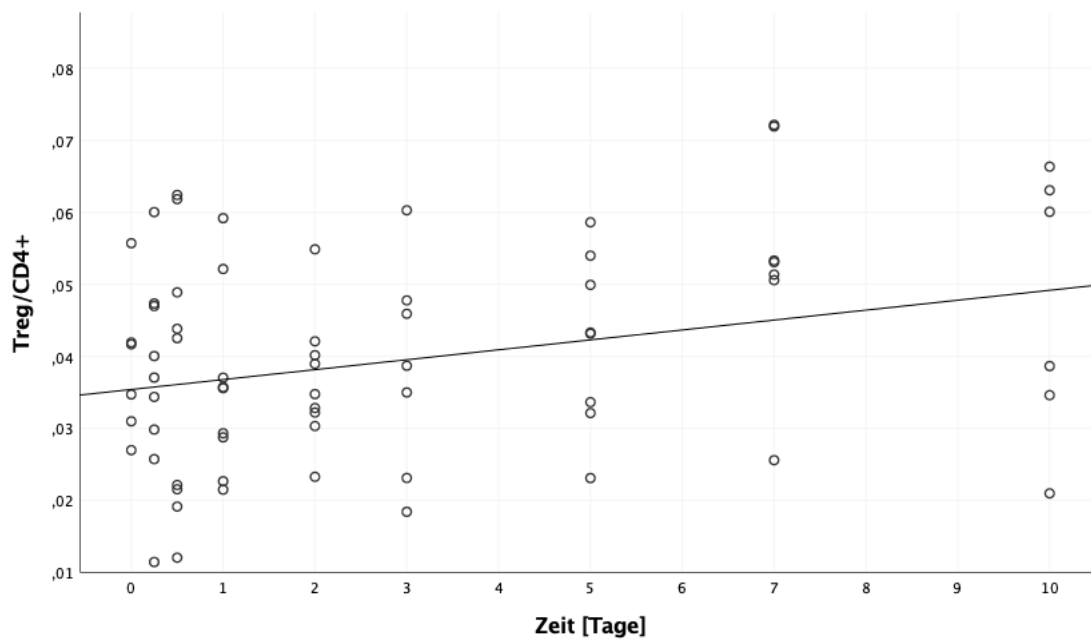


Abb. 8: Entwicklung des Anteils der CD4+ Tregs an den CD4+ Lymphozyten im Laufe des Beobachtungszeitraumes. Jeder Kreis repräsentiert die Messung eines Patienten. Die Gerade entspricht näherungsweise der verallgemeinerten Schätzungsgleichung, der Anstieg über die Zeit ist nicht signifikant ($p = 0,069$).

Ergebnisse

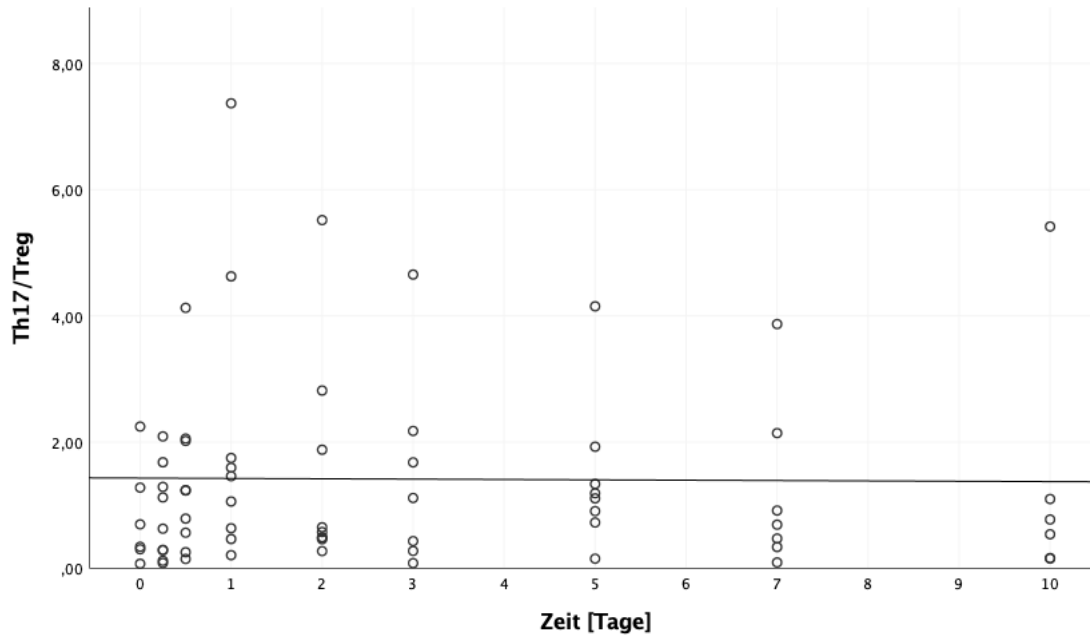


Abb. 9: Entwicklung des Th17/ CD4+ Treg-Quotienten im Laufe des Beobachtungszeitraumes. Jeder Kreis repräsentiert die Messung eines Patienten. Die Gerade entspricht näherungsweise der verallgemeinerten Schätzungsgleichung, die Abnahme über die Zeit ist nicht signifikant ($p = 0,873$).

Ergebnisse

Tabelle 5: Statistische Maßzahlen der verallgemeinerten Schätzgleichungen für den Anteil der Th17-Zellen und CD4+ Tregs an den CD4+ Lymphozyten sowie für den Th17/ CD4+ Treg-Quotienten.

	B	SE	95 % CI	p
Th17/ CD4				
Zeit	< 0,001	0,001	[-0,001; 0,002]	0,526
Alter	0,001	< 0,001	[<0,001; 0,002]	0,028
Geschlecht: m vs. w	0,051	0,016	[0,020; 0,082]	0,001
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS ≥ 25	0,022	0,022	[-0,020; 0,064]	0,309
CD4+ Treg/ CD4				
Zeit	0,001	0,001	[<0,000; 0,003]	0,069
Alter	<0,001	<0,001	[<0,001; 0,001]	0,008
Geschlecht: m vs. w	0,009	0,006	[-0,003; 0,022]	0,156
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS ≥ 25	-0,003	0,004	[-0,011; 0,006]	0,549
Th17/ CD4+ Treg				
Zeit	-0,006	0,045	[-0,094; 0,082]	0,901
Alter	0,010	0,015	[-0,020; 0,039]	0,521
Geschlecht: m vs. w	1,218	0,555	[0,130; 2,307]	0,028
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS ≥ 25	0,893	0,881	[-0,834; 2,619]	0,311

B: Regressionskoeffizient, SE: *standard error* (Standardfehler), 95 % CI: 95 %-Konfidenzintervall, m: männlich, w: weiblich, ISS: *injury severity score*

Ergebnisse

5.4.1.2 IL-17A-Expression

Zur weiteren Charakterisierung der Th17-Zellen und CD4+ Tregs wurde außerdem ihre Expression von IL-17A mittels der in Kapitel 3.4.4 erläuterten relativen MFI ermittelt. **Tabelle 6** listet die statistischen Maßzahlen dieser Auswertung auf.

Diese relative MFI lag bei den Th17-Zellen im Mittel über alle Zeitpunkte und Patienten bei $1,973 \pm 0,543$ (MW \pm SD). Im Laufe des Beobachtungszeitraumes war ein Anstieg der relativen MFI und damit der Expression von IL-17A auf Th17-Zellen zu verzeichnen (s. **Abb. 10**), die berücksichtigten Faktoren Geschlecht, Alter und Verletzungsschwere hatten jedoch keinen signifikanten Einfluss.

Bei den CD4+ Tregs lag die relative MFI im Mittel über alle Zeitpunkte und Patienten bei $1,861 \pm 0,805$ (MW \pm SD). Wie bei den Th17-Zellen stieg auch hier die relative MFI und damit die IL-17A-Expression über den Beobachtungszeitraum an (s. **Abb. 11**). Zudem war die MFI bei leicht verletzten Patienten höher als bei schwer verletzten Patienten. Das Alter und Geschlecht hatten keinen signifikanten Einfluss. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die relative MFI und damit die IL-17A-Expression auf allen CD4+ Lymphozyten bestimmt. Diese lag im Mittel über alle Zeitpunkte und Patienten bei $1,826 \pm 0,505$ (MW \pm SD) und stieg im Laufe des Beobachtungszeitraumes an (s. **Abb. 12**). Bei leicht verletzten Patienten war die MFI höher als bei schwer verletzten Patienten. Auch hier hatten Alter und Geschlecht keinen signifikanten Einfluss.

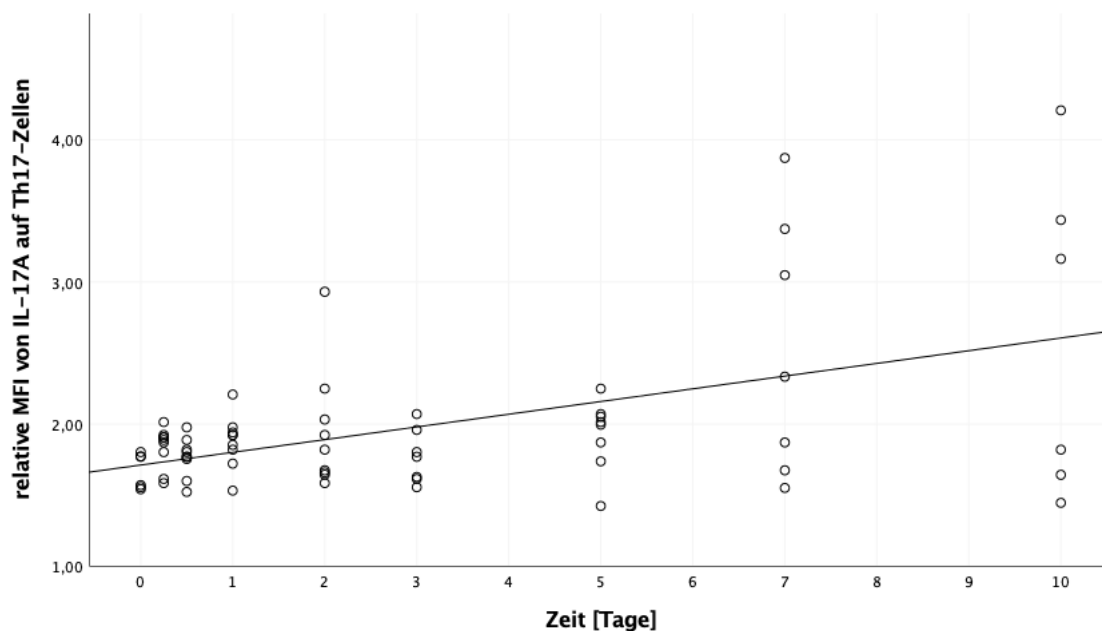


Abb. 10: Entwicklung der IL-17A-Expression auf den Th17-Zellen im Laufe des Beobachtungszeitraumes. Jeder Kreis repräsentiert die Messung eines Patienten. Die Gerade entspricht näherungsweise der verallgemeinerten Schätzungsgleichung, der Anstieg über die Zeit ist signifikant ($p = 0,009$).

Ergebnisse

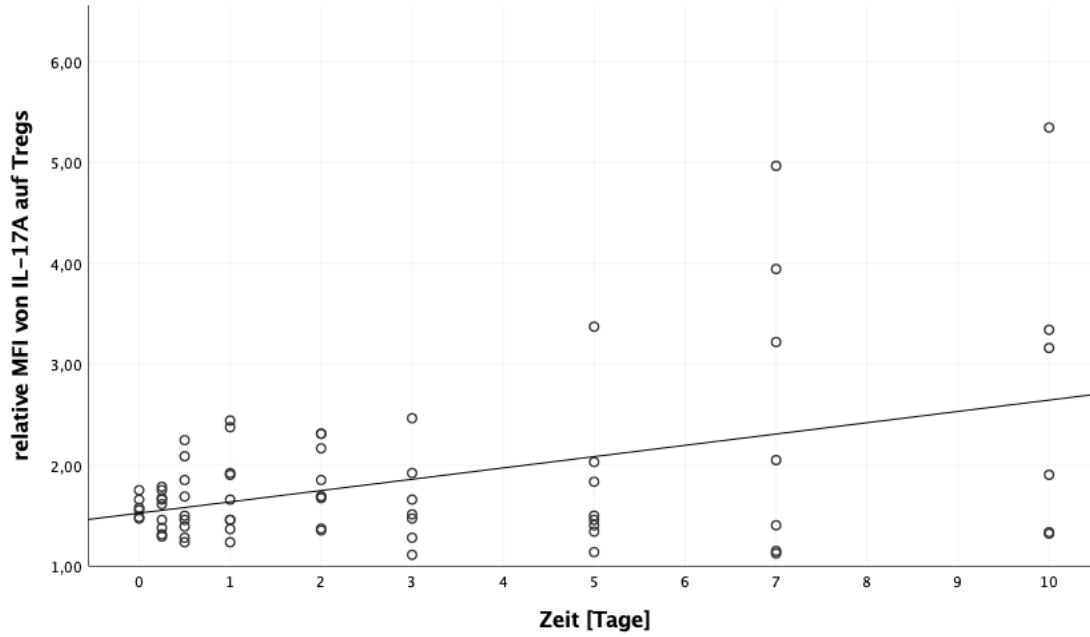


Abb. 11: Entwicklung der IL-17A-Expression auf den CD4+ Tregs im Laufe des Beobachtungszeitraumes. Jeder Kreis repräsentiert die Messung eines Patienten. Die Gerade entspricht näherungsweise der verallgemeinerten Schätzungsgleichung, der Anstieg über die Zeit ist signifikant ($p = 0,008$).

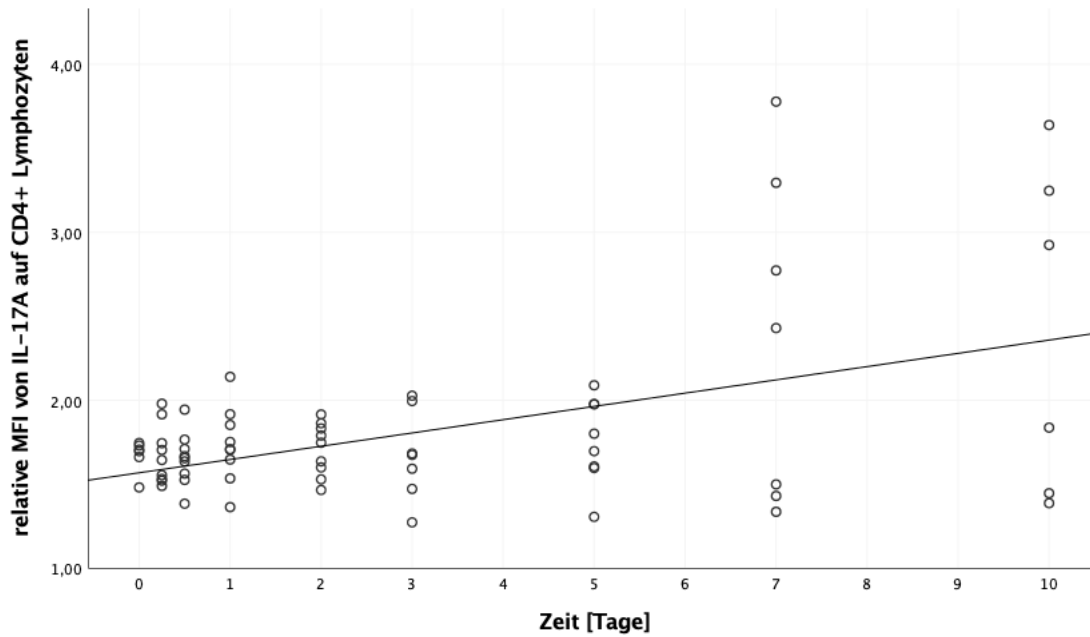


Abb. 12: Entwicklung der IL-17A-Expression auf den CD4+ Lymphozyten im Laufe des Beobachtungszeitraumes. Jeder Kreis repräsentiert die Messung eines Patienten. Die Gerade entspricht näherungsweise der verallgemeinerten Schätzungsgleichung, der Anstieg über die Zeit ist signifikant ($p = 0,004$).

Ergebnisse

Tabelle 6: Statistische Maßzahlen der verallgemeinerten Schätzungsgleichungen für die IL-17A-Expression auf Th17-Zellen, CD4+ Tregs und CD4+ Lymphozyten.

	B	SE	95 % CI	p
IL-17A auf Th17-Zellen				
Zeit	0,088	0,034	[0,020; 0,156]	0,011
Alter	0,002	0,006	[-0,011; 0,015]	0,742
Geschlecht: m vs. w	-0,099	0,236	[-0,561; 0,364]	0,675
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS ≥ 25	0,131	0,119	[-0,102; 0,363]	0,270
IL-17A auf CD4+ Tregs				
Zeit	0,112	0,042	[0,029; 0,195]	0,008
Alter	0,014	0,010	[-0,006; 0,034]	0,161
Geschlecht: m vs. w	-0,283	0,371	[-1,010; 0,444]	0,445
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS ≥ 25	0,707	0,205	[0,304; 1,109]	0,001
IL-17A auf CD4+ Lymphozyten				
Zeit	0,079	0,028	[0,024; 0,134]	0,005
Alter	0,006	0,007	[-0,007; 0,019]	0,381
Geschlecht: m vs. w	0,018	0,254	[-0,480; 0,516]	0,943
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS ≥ 25	0,300	0,121	[0,062; 0,537]	0,013

B: Regressionskoeffizient, SE: *standard error* (Standardfehler), 95 % CI: 95 %-Konfidenzintervall, m: männlich, w: weiblich, ISS: *injury severity score*

Ergebnisse

5.4.2 Thrombozyten

5.4.2.1 Positivkontrolle: Stimulation mit TRAP-6

In einem Vorversuch wurden Thrombozyten mit TRAP-6 in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert (siehe Kapitel 4.4.3.3), wonach sich eine signifikante Steigerung der Expression von CD62L und CD63, nicht aber von TLR9 zeigte. Nichtsdestoweniger entschieden wir uns dafür, auch TLR9 zu untersuchen, da wir eine Aktivierung durch andere, möglicherweise im Rahmen eines Traumas zirkulierende, Faktoren nicht ausschließen konnten.

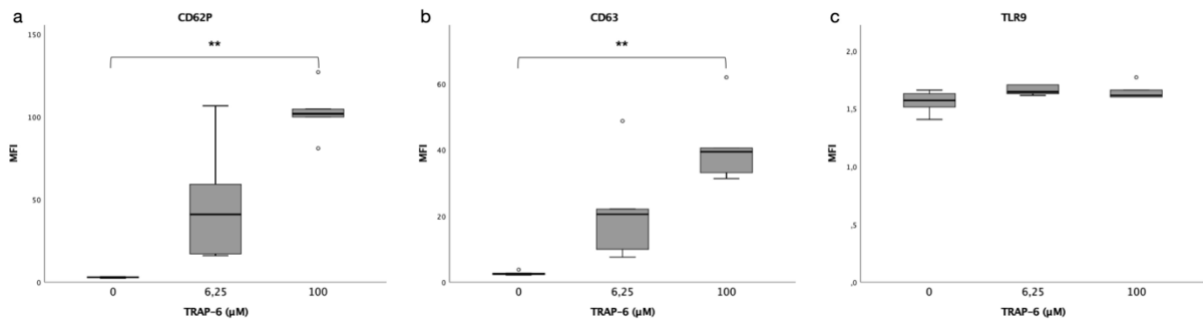


Abb. 13: Expression von CD62P, CD63 und TLR9 auf den Thrombozyten einer gesunden Kontrollgruppe nach Stimulation mit TRAP-6 in unterschiedlichen Konzentrationen sowie unstimuliert. Analysiert wurden die Daten mit dem Friedman-Test und post hoc nach Dunn. (a) Es war ein signifikanter ($p = 0,007$) Anstieg der CD62P-Expression zu sehen, in der post-hoc Analyse zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den unstimulierten und den mit $100 \mu\text{M}$ TRAP-6 stimulierten Proben ($p = 0,005$). (b) Es war ein signifikanter ($p = 0,007$) Anstieg der CD63-Expression zu sehen, in der post-hoc Analyse zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den unstimulierten und den mit $100 \mu\text{M}$ TRAP-6 stimulierten Proben ($p = 0,005$). (c) Die TLR9-Expression änderte sich nicht signifikant ($p = 0,092$). ** $p < 0,01$.

Ergebnisse

5.4.2.2 Thrombozytäre Expression von CD62L, CD63, TLR9

Die Bestimmung der Expression der Moleküle CD62L, CD63 und TLR9 sollte dazu dienen, eine mögliche posttraumatische Aktivierung der Thrombozyten zu erkennen.

Die MFI von CD62P lag im Mittel über alle Patienten und Zeitpunkte bei $1,299 \pm 0,436$, die von CD63 lag bei $2,314 \pm 0,539$ und die von TLR9 lag bei $1,209 \pm 0,236$ (jeweils MW \pm SD).

In der Auswertung der Proben der Traumapatienten waren in Bezug auf die Expression aller drei untersuchten Marker keine signifikanten Änderungen im Laufe des Beobachtungszeitraums nachweisbar. Auch die berücksichtigten Faktoren Alter, Geschlecht und Verletzungsschwere hatten keinen signifikanten Einfluss. Die statistischen Maßzahlen können **Tabelle 7** entnommen werden.

Tabelle 7: Statistische Maßzahlen der verallgemeinerten Schätzungsgleichungen für die Expression von CD62P, CD63 und TLR9 auf Thrombozyten.

	B	SE	95 % CI	p
CD62P				
Zeit	-0,006	0,003	[-0,013; >0,001]	0,058
Alter	0,009	0,009	[-0,009; 0,027]	0,329
Geschlecht: m vs. w	-0,042	0,448	[-0,921; 0,836]	0,925
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS \geq 25	0,047	0,316	[-0,572; 0,666]	0,881
CD63				
Zeit	0,004	0,023	[-0,041; 0,048]	0,876
Alter	0,002	0,006	[-0,009; 0,014]	0,691
Geschlecht: m vs. w	-0,253	0,230	[-0,704; 0,198]	0,271
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS \geq 25	-0,051	0,179	[-0,402; 0,299]	0,775
TLR9				
Zeit	<0,000	0,005	[-0,009; 0,009]	0,934
Alter	0,001	0,003	[-0,004; 0,006]	0,659
Geschlecht: m vs. w	0,050	0,100	[-0,146; 0,245]	0,619
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS \geq 25	0,026	0,109	[-0,188; 0,241]	0,810

B: Regressionskoeffizient, SE: *standard error* (Standardfehler), 95 % CI: 95 %-Konfidenzintervall, m: männlich, w: weiblich, ISS: *injury severity score*

Ergebnisse

5.5 ROTATIONSTHROMBELASTOMETRIE

Mittels der ROTEM® Rotationsthrombelastometrie wurde die Gerinnungs- und Thrombozytenfunktion der Patienten gemessen, der hier ausgewertete Parameter ist die MCF. Eine Subtraktion des in fibtem gemessenen MCF-Wertes von dem in extem gemessenen ermöglicht eine Abschätzung der thrombozytären Gerinnungskomponente (Lang and von Depka 2006).

5.5.1 Extem

Die in extem gemessene MCF lag im Mittel bei $63,67 \pm 9,56$ mm (MW \pm SD) und stieg im Laufe des Beobachtungszeitraums an (s. **Abb. 14**). Zudem hatten Männer höhere MCF-Werte als Frauen. Keinen signifikanten Einfluss hatten das Alter der Patienten und die Verletzungsschwere. Aus **Tabelle 8** können die entsprechenden statistischen Maßzahlen entnommen werden.

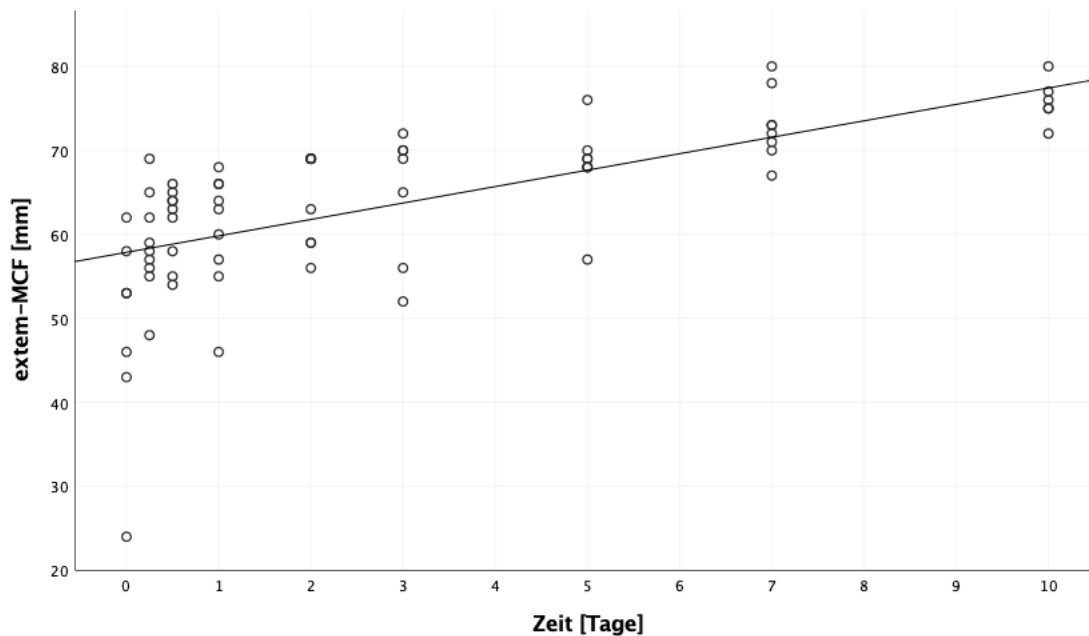


Abb. 14: Entwicklung der in extem gemessenen MCF im Laufe des Beobachtungszeitraumes. Jeder Kreis repräsentiert die Messung eines Patienten. Die Gerade entspricht näherungsweise der verallgemeinerten Schätzungsgleichung, der Anstieg über die Zeit ist signifikant ($p < 0,001$).

Ergebnisse

Tabelle 8: Statistische Maßzahlen der verallgemeinerten Schätzungsgleichung für die in extem gemessene MCF.

MCF in extem	B	SE	95 % CI	<i>p</i>
Zeit	1,957	0,196	[1,573; 2,340]	<0,001
Alter	0,082	0,077	[-0,070; 0,233]	0,290
Geschlecht: m vs. w	9,092	4,235	[0,793; 17,392]	0,032
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS ≥ 25	2,938	2,508	[-1,977; 7,853]	0,241

B: Regressionskoeffizient, SE: *standard error* (Standardfehler), 95 % CI: 95 %-Konfidenzintervall,
m: männlich, w: weiblich, ISS: *injury severity score*

Ergebnisse

5.5.2 Intem

Die in intem gemessene MCF lag im Mittel bei $61,70 \pm 9,26$ mm (MW \pm SD), im Laufe des Beobachtungszeitraumes war ein Anstieg zu sehen (s. **Abb. 15**). Auch hier hatten Männer höhere Werte als Frauen. Kein signifikanter Einfluss war für das Alter der Patienten und die Verletzungsschwere festzustellen. **Tabelle 9** listet die entsprechenden statistischen Maßzahlen auf.

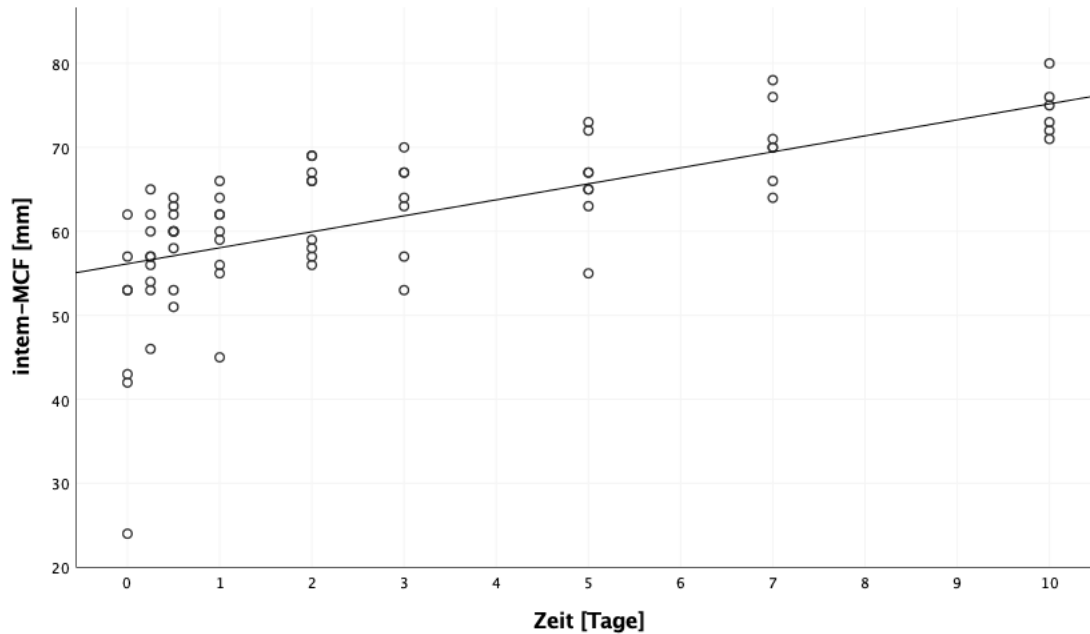


Abb. 15: Entwicklung der in intem gemessenen MCF im Laufe des Beobachtungszeitraumes. Jeder Kreis repräsentiert die Messung eines Patienten. Die Gerade entspricht näherungsweise der verallgemeinerten Schätzungsgleichung, der Anstieg über die Zeit ist signifikant ($p < 0,001$).

Tabelle 9: Statistische Maßzahlen der verallgemeinerten Schätzungsgleichung für die in intem gemessene MCF.

MCF in intem	B	SE	95 % CI	<i>p</i>
Zeit	1,904	0,218	[1,477; 2,330]	<0,001
Alter	0,075	0,067	[-0,056; 0,207]	0,262
Geschlecht: m vs. w	9,075	3,575	[2,069; 16,081]	0,011
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS \geq 25	3,645	2,476	[-1,209; 8,498]	0,141

B: Regressionskoeffizient, SE: *standard error* (Standardfehler), 95 % CI: 95 %-Konfidenzintervall, m: männlich, w: weiblich, ISS: *injury severity score*

Ergebnisse

5.5.3 Fibtem

In fibtem lag die MCF im Mittel bei $25,20 \pm 11,07$ mm (MW \pm SD), während des Beobachtungszeitraumes zeigte sich ein Anstieg (s. **Abb. 16**). Männer hatten höhere MCF-Werte als Frauen, mit steigendem Alter stiegen zudem auch die MCF-Werte an. Außerdem hatten leicht verletzte Patienten niedrigere Werte als schwer verletzte Patienten. Die entsprechenden statistischen Maßzahlen können **Tabelle 10** entnommen werden.

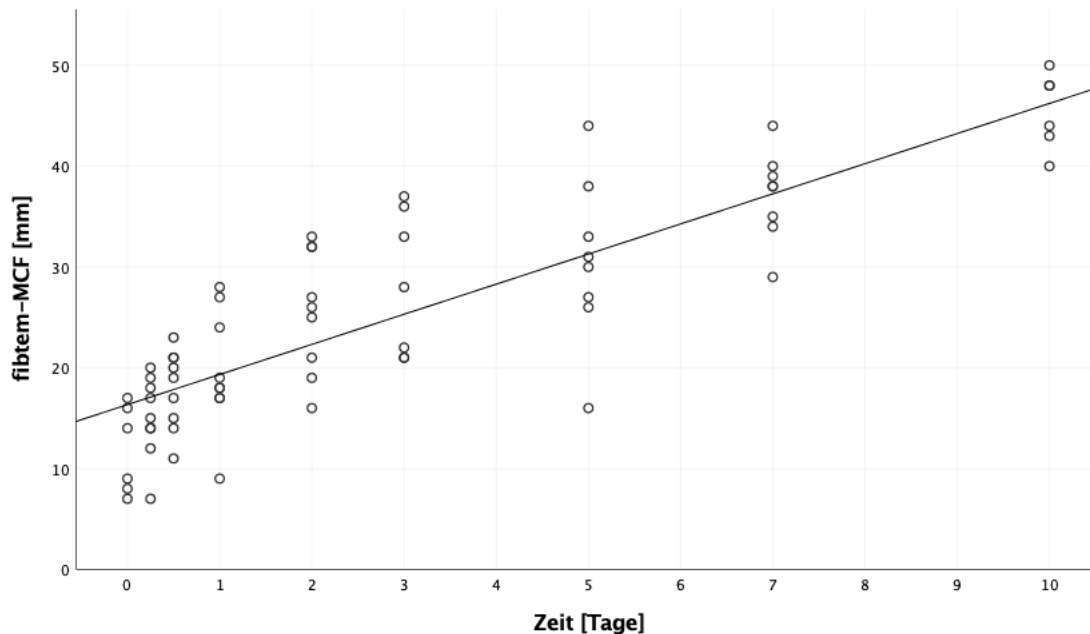


Abb. 16: Entwicklung der in fibtem gemessenen MCF im Laufe des Beobachtungszeitraumes. Jeder Kreis repräsentiert die Messung eines Patienten. Die Gerade entspricht näherungsweise der verallgemeinerten Schätzungsgleichung, der Anstieg über die Zeit ist signifikant ($p < 0,001$).

Tabelle 10: Statistische Maßzahlen der verallgemeinerten Schätzungsgleichung für die in fibtem gemessene MCF.

MCF in fibtem	B	SE	95 % CI	p
Zeit	2,988	0,148	[2,699; 3,277]	<0,001
Alter	0,094	0,035	[0,024; 0,163]	0,008
Geschlecht: m vs. w	5,765	1,694	[2,445; 9,085]	0,001
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS \geq 25	-2,386	0,974	[-4,295; -0,476]	0,014

B: Regressionskoeffizient, SE: *standard error* (Standardfehler), 95 % CI: 95 %-Konfidenzintervall,
m: männlich, w: weiblich, ISS: *injury severity score*

Ergebnisse

5.5.4 Extem – Fibtem

Die MCF aus den fibtem-Messungen wurde von der MCF aus den extem-Messungen subtrahiert, um den thrombozytären Anteil an der Gerinnung abschätzen zu können (Lang and von Depka 2006). Diese Thrombozyten-MCF lag im Mittel bei $39,03 \pm 6,16$ mm (MW \pm SD). Im Laufe des Beobachtungszeitraumes war eine Abnahme zu beobachten (s. **Abb. 17**). Mit dem Alter stieg auch die thrombozytäre MCF, zudem waren die Werte bei Männern höher als bei Frauen. Patienten mit einem ISS < 25 hatten höhere Thrombozyten-MCF-Werte als Patienten mit einem ISS ≥ 25 . Die statistischen Maßzahlen listet **Tabelle 11** auf.

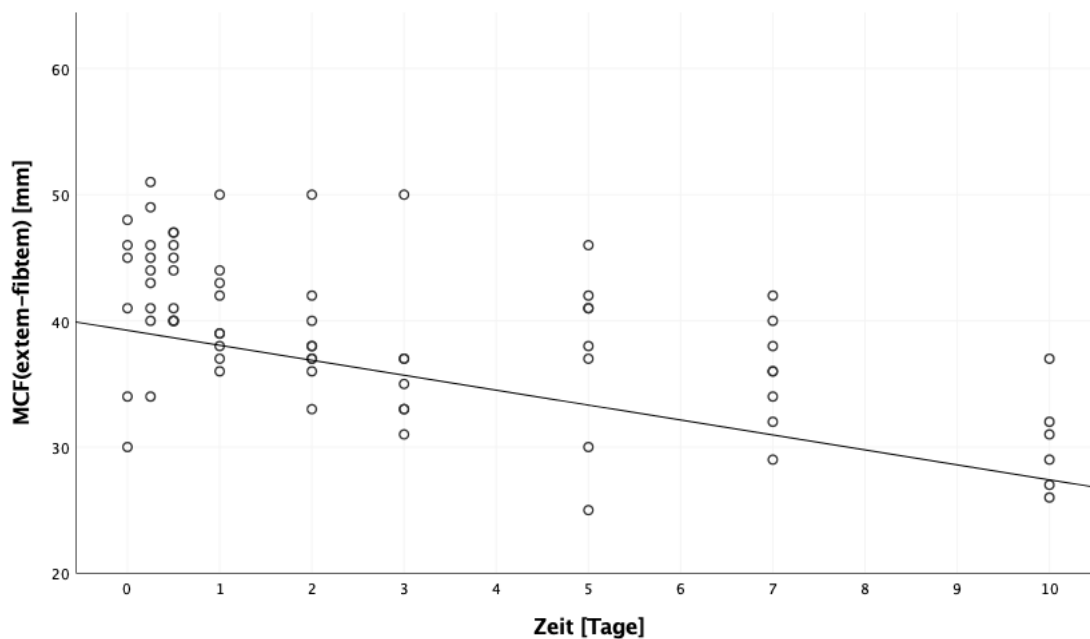


Abb. 17: Entwicklung der thrombozytären MCF, die man durch Subtraktion der fibtem-MCF von der extem-MCF erhält, im Laufe des Beobachtungszeitraumes. Jeder Kreis repräsentiert die Messung eines Patienten. Die Gerade entspricht näherungsweise der verallgemeinerten Schätzungsgleichung, die Abnahme über die Zeit ist signifikant ($p < 0,001$).

Tabelle 11: Statistische Maßzahlen der verallgemeinerten Schätzungsgleichung für die thrombozytäre MCF.

MCF (extem – fibtem)	B	SE	95 % CI	p
Zeit	-1,184	0,162	[-1,503; -0,866]	<0,001
Alter	0,050	0,018	[0,015; 0,084]	0,005
Geschlecht: m vs. w	2,236	0,903	[0,466; 4,006]	0,013
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS ≥ 25	5,110	1,691	[1,797; 8,423]	0,003

B: Regressionskoeffizient, SE: *standard error* (Standardfehler), 95 % CI: 95 %-Konfidenzintervall, m: männlich, w: weiblich, ISS: *injury severity score*

Ergebnisse

5.6 THROMBOZYTENZAHL

Die Thrombozytenzahl der Patienten lag im Mittel bei $185,93 \pm 130,79$ G/l (MW \pm SD) und stieg im Laufe des Beobachtungszeitraumes an (s. **Abb. 18**). Die höchste Thrombozytenzahl wurde im Mittel an Tag 10 gemessen: $437,14 \pm 202,61$ G/l (MW \pm SD). Der Norm entspricht eine Thrombozytenzahl zwischen 150 und 400 G/l, der untere Normwert wurde vom Mittelwert der gemessenen Thrombozytenzahlen bis einschließlich Tag 3 unterschritten. Für die Faktoren Alter, Geschlecht und Verletzungsschwere war kein signifikanter Einfluss nachweisbar. **Tabelle 12** führt die statistischen Maßzahlen auf.

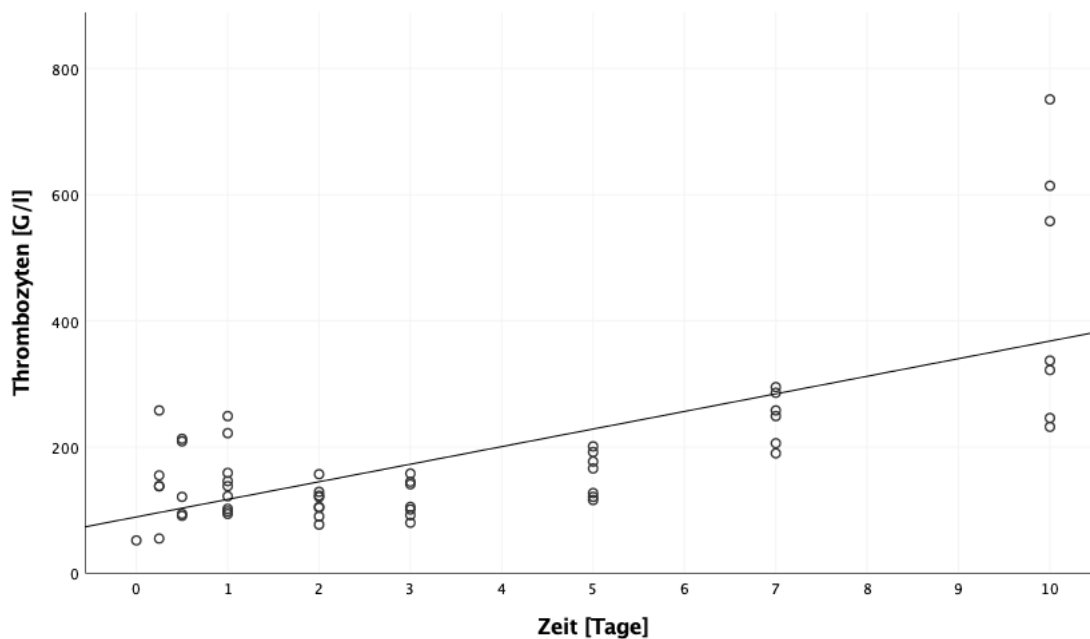


Abb. 18: Entwicklung der Thrombozytenzahl im Laufe des Beobachtungszeitraumes. Jeder Kreis repräsentiert die Messung eines Patienten. Die Gerade entspricht näherungsweise der verallgemeinerten Schätzungsgleichung, der Anstieg über die Zeit ist signifikant ($p < 0,001$).

Tabelle 12: Statistische Maßzahlen der verallgemeinerten Schätzungsgleichung für die Thrombozytenzahl.

Thrombozytenzahl	B	SE	95 % CI	<i>p</i>
Zeit	27,881	5,293	[17,506; 38,255]	<0,001
Alter	-0,158	0,835	[-1,795; 1,480]	0,850
Geschlecht: m vs. w	-1,270	34,086	[-68,078; 65,537]	0,970
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS \geq 25	61,935	55,131	[-46,119; 169,989]	0,261

B: Regressionskoeffizient, SE: *standard error* (Standardfehler), 95 % CI: 95 %-Konfidenzintervall, m: männlich, w: weiblich, ISS: *injury severity score*

Ergebnisse

5.7 ZYTOKINMESSUNG MITTELS LUMINEX MAGPIX®

Mittels der Luminex Magpix-Technologie erfolgte aus den gesammelten und eingefrorenen Serumproben der Traumapatienten die Bestimmung der Konzentration von 18 verschiedenen Zytokinen. Aufgrund schon erwähnter fehlender Blutentnahmezeitpunkte (vgl. 5.2) waren je Zytokin 72 Messungen von möglichen 90 vorhanden.

5.7.1 Ausgeschlossene Zytokine

Bei acht der untersuchten Zytokine lagen sämtliche Messwerte der Patienten unter dem vom Hersteller beschriebenen LLOQ (*lowest limit of quantification*, unterer Quantifizierungsgrenzwert). Obwohl in einigen dieser Fälle trotzdem exakte Werte gemessen wurden, ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse nicht hinreichend genau sind, weshalb wir diese Zytokine keiner weiteren Untersuchung unterzogen. Im Einzelnen waren dies: GM-CSF, IL-1 β , IL-9, IL-12p70, IL-13, IL-22, IL-23, IL-27. Die entsprechenden LLOQ-Werte sind **Tabelle 13** zu entnehmen.

Bei weiteren fünf Zytokinen lagen nur vereinzelt – in maximal vier der 72 Messungen – Werte innerhalb des Assaybereichs. Auch bei diesen Zytokinen erschien eine weiterführende Untersuchung nicht sinnvoll. Es handelte sich um TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 und IL-17A. LLOQ-Werte und Maximum listet **Tabelle 13** auf.

IL-21 lag bei einem der zehn untersuchten Patienten zu allen neun Zeitpunkten deutlich über dem LLOQ, bei allen anderen Patienten mit einer Ausnahme stets darunter. Auf eine weitere Auswertung wurde auch hier verzichtet. LLOQ-Wert und Maximum liefert **Tabelle 13**.

Die 7 bzw. 27 unter dem LLOQ liegenden Messwerte bei der Analyse der IL-6- und IL-10-Serumspiegel stellen in der Auswertung mittels verallgemeinerter Schätzungsgleichung ein Problem dar. Von einer statistischen Auswertung dieser Werte wurde deshalb abgesehen. Eine Übersicht bietet **Tabelle 13**.

Es verblieben die Parameter IFN- γ und IL-18 für die statistische Auswertung mittels verallgemeinerter Schätzungsgleichung.

Ergebnisse

Tabelle 13: Übersicht über die Messergebnisse des Luminex-Assays.

Zytokin	LLOQ [pg/ml]	unter LLOQ (n)	Minimum [pg/ml]	Maximum [pg/ml]	Median [1. Quartil; 3. Quartil]
GM-CSF	18	72	< LLOQ	< LLOQ	
IFN- γ	11	0	14,82	199,58	34,62 [24,92; 50,55]
TNF- α	6,98	69	< LLOQ	7,77	
IL-1 β	2,09	72	< LLOQ	< LLOQ	
IL-2	4,35	68	< LLOQ	15,58	
IL-4	11	71	< LLOQ	11,77	
IL-5	6,64	71	< LLOQ	7,01	
IL-6	11	7	< LLOQ	1068,80	43,79 [25,37; 96,07]
IL-9	11	72	< LLOQ	< LLOQ	
IL-10	2,49	27	< LLOQ	207,32	3,05 [< LLOQ; 7,47]
IL-12p70	6,67	72	< LLOQ	< LLOQ	
IL-13	2,59	72	< LLOQ	< LLOQ	
IL-17A	2,27	71	< LLOQ	2,37	
IL-18	9,01	0	10,69	184,61	29,22 [22,72; 41,40]
IL-21	11	63	< LLOQ	217,17	
IL-22	33	72	< LLOQ	< LLOQ	
IL-23	15	72	< LLOQ	< LLOQ	
IL-27	22	72	< LLOQ	< LLOQ	

LLOQ: *lowest limit of quantification*/unterer Quantifizierungsgrenzwert; pg/ml: Pikogramm pro Milliliter; n: Anzahl; MW \pm SD: Mittelwert \pm Standardabweichung.

Ergebnisse

5.7.2 IFN- γ

Die im Serum der Patienten gemessenen IFN- γ -Konzentrationen lagen in allen Fällen über dem LLOQ der Analyse und waren deshalb sämtlich auswertbar. Minimum, Maximum, Median sowie erstes und drittes Quartil können **Tabelle 13** entnommen werden.

Im Laufe des Beobachtungszeitraumes war keine signifikante Änderung der IFN- γ -Konzentration im Serum der Patienten nachweisbar. Auch für Alter und Geschlecht der Patienten konnte kein signifikanter Einfluss festgestellt werden. Allerdings hatten Patienten mit einem niedrigeren ISS niedrigere Serum-IFN- γ -Spiegel als Patienten mit einem höheren ISS. Die statistischen Messgrößen können **Tabelle 14** entnommen werden.

Tabelle 14: Statistische Maßzahlen der verallgemeinerten Schätzungsgleichung für die Serum-IFN- γ -Konzentration.

IFN- γ	B	SE	95 % CI	<i>p</i>
Zeit	2,464	2,263	[-1,971; 6,899]	0,276
Alter	0,019	0,524	[-1,009; 1,047]	0,971
Geschlecht: m vs. w	10,461	21,021	[-30,740; 51,661]	0,619
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS \geq 25	-24,775	8,575	[-41,582; -7,967]	0,004

B: Regressionskoeffizient, SE: *standard error* (Standardfehler), 95 % CI: 95 %-Konfidenzintervall,
m: männlich, w: weiblich, ISS: *injury severity score*

Ergebnisse

5.7.3 IL-18

Die im Serum der Patienten gemessenen IL-18-Konzentrationen lagen in allen Fällen über dem LLOQ der Analyse, weshalb alle Messergebnisse in die Auswertung mit einbezogen werden konnten. Minimum, Maximum, Median sowie erstes und drittes Quartil können **Tabelle 13** entnommen werden. Im Laufe des Beobachtungszeitraumes war keine signifikante Änderung der IL-18-Spiegel im Serum der Patienten feststellbar. Auch für das Alter und Geschlecht der Patienten konnte kein signifikanter Einfluss nachgewiesen werden. Allerdings verzeichneten Patienten mit einem niedrigeren ISS geringere IL-18-Serumkonzentrationen als Patienten mit einem höheren ISS. Die statistischen Maßzahlen können **Tabelle 15** entnommen werden.

Tabelle 15: Statistische Maßzahlen der verallgemeinerten Schätzungsgleichung für die Serum-IL-18-Konzentration.

IL-18	B	SE	95 % CI	<i>p</i>
Zeit	2,421	1,824	[-1,154; 5,995]	0,184
Alter	0,602	0,514	[-0,405; 1,609]	0,241
Geschlecht: m vs. w	9,386	21,448	[-32,651; 51,423]	0,662
Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS ≥ 25	-16,365	6,106	[-28,333; -4,396]	0,007

B: Regressionskoeffizient, SE: *standard error* (Standardfehler), 95 % CI: 95 %-Konfidenzintervall, m: männlich, w: weiblich, ISS: *injury severity score*

Ergebnisse

5.8 EINFLUSSFAKTOREN

Das folgende Kapitel fasst die statistisch signifikanten Änderungen und Unterschiede durch die miteinberechneten Faktoren Alter, Geschlecht und Verletzungsschwere zusammen.

Alter

Mit steigendem Alter war ein Anstieg des Anteils der Th17-Zellen und der CD4+ Tregs an allen CD4+ Lymphozyten zu beobachten. Auch die in fibtem gemessene MCF sowie die thrombozytäre MCF nahmen mit steigendem Alter zu.

Geschlecht: Männer vs. Frauen

Männer hatten, verglichen mit Frauen, einen höheren Anteil Th17-Zellen an allen CD4+ Lymphozyten, auch der Th17/ CD4+ Treg-Quotient war bei Männern höher als bei Frauen. Weiterhin hatten Patienten männlichen Geschlechts höhere MCF-Werte in extem, intem und fibtem, außerdem eine höhere thrombozytäre MCF.

Verletzungsschwere: ISS < 25 vs. ISS \geq 25

Bei den weniger schwer verletzten Patienten mit einem ISS < 25 war eine höhere IL-17A-Expression auf CD4+ Tregs und CD4+-Lymphozyten messbar als bei Patienten mit einem ISS \geq 25. Das weniger schwer verletzte Patientenkollektiv hatte außerdem niedrigere MCF-Werte in den fibtem-Messungen und eine höhere thrombozytäre MCF.

Außerdem wurden bei weniger schwer verletzten Patienten geringere Serumkonzentrationen von IFN- γ und IL-18 gemessen.

Ergebnisse

5.9 VERGLEICH MIT GESUNDER KONTROLLGRUPPE

Da nur für sechs der zehn eingeschlossenen Patienten im Geschlecht und Alter passende Kontrollprobanden rekrutiert werden konnten, wurden für den folgenden Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe auch nur diese Patienten herangezogen.

Entsprechend der Kontrollgruppe waren diese sechs Patienten männlichen Geschlechts, ihr Alter lag bei $32,3 \pm 16,6$ Jahren (vgl. Kontrollgruppe: $32,7 \pm 15,1$ Jahre, jeweils MW \pm SD). Die demographischen Daten der Patienten, die mit der gesunden Kontrollgruppe verglichen wurden, sind **Tabelle 16** zu entnehmen.

Tabelle 16: Demographische Daten der Patientengruppe, die mit der Kontrollkohorte verglichen wurde.

Variable	Häufigkeit n	Mittelwert \pm Standardabweichung
Patientenzahl	6	
Alter [Jahre]		$32,3 \pm 16,6$
Geschlecht		
männlich	6	
GCS am Unfallort	6	$9,8 \pm 4,9$
GCS im Schockraum	5	$9,8 \pm 6,3$
AIS		
Kopf/Hals	4	$2,8 \pm 0,5$
Gesicht	3	$3,0 \pm 0,0$
Thorax	4	$3,8 \pm 1,0$
Abdomen/Beckeninhalt	3	$2,3 \pm 1,5$
Extremitäten/Beckengürtel	6	$2,7 \pm 1,0$
äußerlich	2	$1,0 \pm 0,0$
ISS		$28,3 \pm 7,2$
überlebend	6	
Intensivaufenthalt [Tage]		$14,8 \pm 19,5$
Anzahl der Operationen		$3,7 \pm 2,7$
MODS	3	

GCS: Glasgow Coma Scale, AIS: Abbreviated Injury Scale, ISS: Injury Severity Score, MODS: Multiple Organ Dysfunction Syndrome

Ergebnisse

5.9.1 Durchflusszytometrie an Th17-Zellen und CD4+ Tregs

Es wurden der Th17/ CD4-Quotient, der CD4+ Treg/ CD4-Quotient und der Th17/ CD4+ Treg-Quotient der Traumapatienten jeweils mit dem des entsprechenden Kontrollprobanden ins Verhältnis gesetzt. Zu keinem Zeitpunkt war hier ein signifikanter Unterschied im Sinne einer signifikanten Abweichung von 1 sichtbar.

Auf gleiche Weise wurde die IL-17A-Expression auf Th17-Zellen, Tregs und CD4+ Lymphozyten der Traumapatienten mit derjenigen der gesunden Kontrollgruppe verglichen. Auch hier konnten wir zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied feststellen.

Die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen sind in **Tabelle 17** aufgelistet.

Tabelle 17: Gegenüberstellung der Mittelwerte der in der Durchflusszytometrie an Lymphozyten gewonnenen Daten in der Vergleichsgruppe der Traumapatienten und der Kontrollgruppe.

	Mittelwert ± Standardabweichung	
	Vergleichsgruppe der Traumapatienten	Kontrollgruppe
Th17/ CD4	0,052 ± 0,041	0,038 ± 0,017
CD4+ Treg/ CD4	0,038 ± 0,015	0,033 ± 0,010
Th17/ CD4+ Treg	1,676 ± 1,690	1,263 ± 0,647
IL17A auf Th17-Zellen	1,976 ± 0,564	1,729 ± 0,200
IL17A auf Tregs	1,742 ± 0,600	1,985 ± 0,481
IL17A auf CD4+ Lymphozyten	1,817 ± 0,512	1,725 ± 0,176

Ergebnisse

5.9.2 Durchflusszytometrie an Thrombozyten

Die Expression von CD62P, CD63 und TLR9 auf Thrombozyten der polytraumatisierten Patienten wurde analog 5.9.1 mit den entsprechenden Werten der gesunden Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. CD63- und TLR9-Expression unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant. Bezüglich der CD62P-Expression jedoch war das entsprechende Verhältnis zu allen Zeitpunkten außer dem Zeitpunkt zehn Tage nach Trauma signifikant verschieden von 1. Es war ein Quotient < 1 zu sehen, der folglich einer signifikant geringeren Expression von CD62P auf den Thrombozyten der polytraumatisierten Patienten im Vergleich zur Expression auf den Thrombozyten der gesunden Kontrollgruppe entspricht (s. **Abb. 19**).

Die Mittelwerte und Standardabweichungen können **Tabelle 18** entnommen werden.

Tabelle 18: Gegenüberstellung der Mittelwerte der in der Durchflusszytometrie an Thrombozyten gewonnenen Daten in der Vergleichsgruppe der Traumapatienten und der Kontrollgruppe.

	Mittelwert \pm Standardabweichung	
	Vergleichsgruppe der Traumapatienten	Kontrollgruppe
CD62P	1,316 \pm 0,403	1,966 \pm 0,065
CD63	2,187 \pm 0,506	1,954 \pm 0,331
TLR9	1,191 \pm 0,271	1,167 \pm 0,056

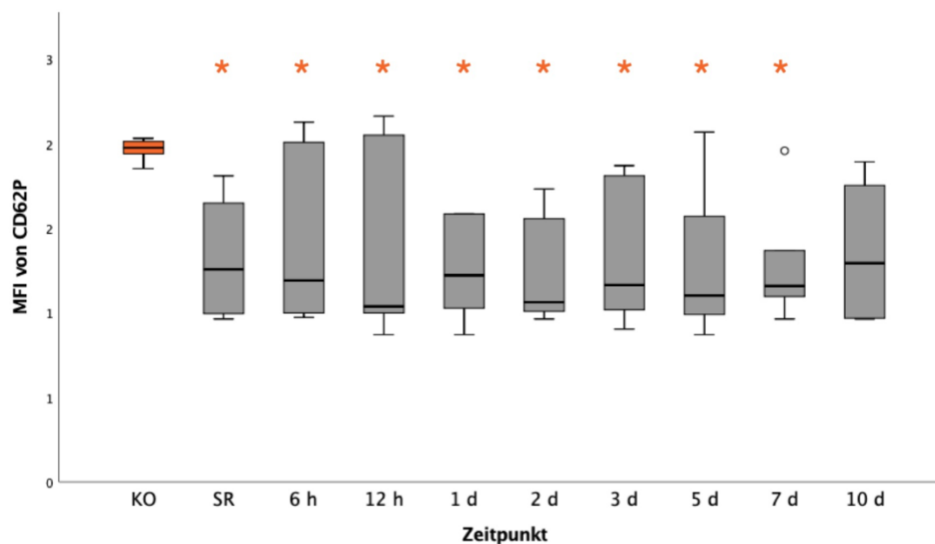


Abb. 19: Vergleich der Expression von CD62P auf den Thrombozyten polytraumatisierter Patienten mit der gesunden Kontrollgruppe. Für die statistische Testung wurden zu jedem Zeitpunkt die Quotienten aus den Werten der Traumapatienten und denen der gematchten Kontrollprobanden gebildet. Im Anschluss wurde mittels t-Test für eine Stichprobe gegen den Wert 1 getestet. Signifikante Unterschiede ergaben sich zu den mit einem Stern markierten Zeitpunkten: SR ($p = 0,036$), 6 h ($p = 0,037$), 12 h ($p = 0,040$), 1 d ($p = 0,003$), 2 d ($p = 0,002$), 3 d ($p = 0,009$), 5 d ($p = 0,010$), 7 d ($p = 0,015$). KO: Kontrollgruppe, SR: Schockraum, h: Stunden, d: Tage, MFI: mediane Fluoreszenzintensität.

Ergebnisse

5.9.3 MCF-Werte in der Thrombelastometrie

Es wurden die MCF-Werte in den extem-, intem-, und fibtem-Messungen sowie die thrombozytären MCF-Werte der polytraumatisierten Patienten entsprechend 0 mit den Werten der gesunden Kontrollprobanden verglichen.

Dabei unterschieden sich die gebildeten extem-Quotienten zu den Zeitpunkten zwei, fünf, sieben und zehn Tage nach Trauma signifikant von 1. Bei Quotienten > 1 sehen wir also mit Ausnahme des Zeitpunktes drei Tage nach Trauma signifikant erhöhte extem-MCF-Werte im Vergleich zur gesunden Kontrolle (s. **Abb. 20**).

Deutlicher stellt sich dieser Unterschied in den intem-Messungen dar. Hier konnten wir ab dem Zeitpunkt zwölf Stunden nach Trauma ausnahmslos signifikant höhere MCF-Werte als in der gesunden Kontrollgruppe beobachten (s. **Abb. 20**). Gleiche Ergebnisse zeigen die durchgeführten fibtem-Messungen. Auch hier war der gebildete Quotient aus der MCF der Traumatikpatienten zum entsprechenden Zeitpunkt mit dem passenden Kontrollprobanden ab dem Zeitpunkt zwölf Stunden nach Trauma signifikant größer als 1 (s. **Abb. 21**). Der mit der thrombozytären MCF gebildete Quotient hingegen war nur zu den Zeitpunkten sieben und zehn Tage nach Trauma signifikant kleiner als 1, womit also die thrombozytäre MCF der Traumatikpatienten zu diesen Zeitpunkten geringer war als die der Kontrollprobanden (s. **Abb. 21**).

Die Mittelwerte und entsprechenden Standardabweichungen listet **Tabelle 19** auf.

Tabelle 19: Gegenüberstellung der Mittelwerte der in der Thrombelastometrie gewonnenen Daten in der Vergleichsgruppe der Traumatikpatienten und der Kontrollgruppe.

	Mittelwert \pm Standardabweichung	
	Vergleichsgruppe der Traumatikpatienten	Kontrollgruppe
MCF in extem [mm]	64,82 \pm 8,32	58,17 \pm 4,31
MCF in intem [mm]	63,08 \pm 7,89	53,67 \pm 4,03
MCF in fibtem [mm]	25,61 \pm 10,94	13,33 \pm 2,34
thrombozytäre MCF [mm]	39,22 \pm 6,17	44,83 \pm 2,40

Ergebnisse

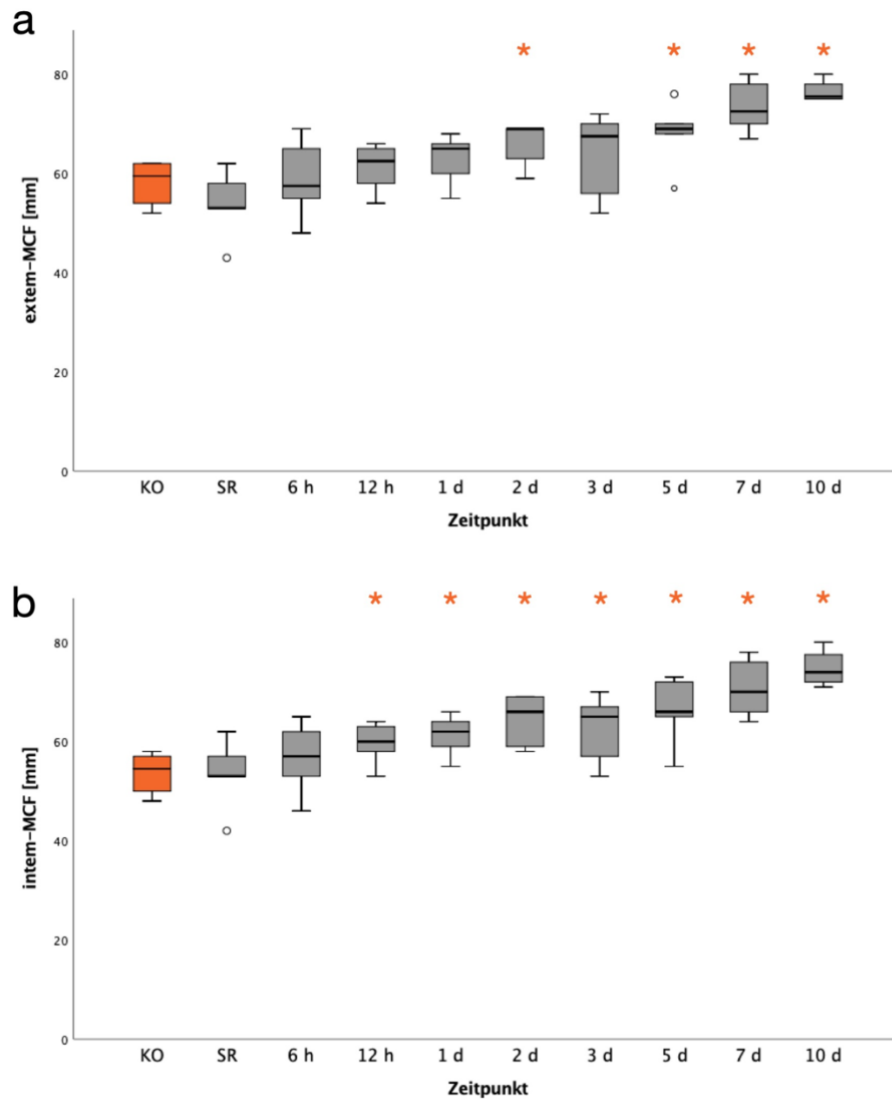


Abb. 20: Vergleich der bei polytraumatisierten Patienten gemessenen MCF-Werte in extem (a) und intem (b) mit den bei gesunden Kontrollprobanden gemessenen Werten. Für die statistische Testung wurden zu jedem Zeitpunkt die Quotienten aus den Werten der Traumapatienten und denen der gematchten Kontrollprobanden gebildet. Im Anschluss wurde mittels *t*-Test für eine Stichprobe gegen den Wert 1 getestet. Signifikante Unterschiede ergaben sich zu den mit einem Stern markierten Zeitpunkten: (a) 2 d ($p = 0,018$), 5 d ($p = 0,031$), 7 d ($p = 0,008$), 10 d ($p = 0,013$); (b) 12 h ($p = 0,030$), 1 d ($p = 0,049$), 2 d ($p = 0,014$), 3 d ($p = 0,036$), 5 d ($p = 0,017$), 7 d ($p = 0,006$), 10 d ($p = 0,017$). KO: Kontrollgruppe, SR: Schockraum, h: Stunden, d: Tage, MCF: maximale Gerinnselfestigkeit.

Ergebnisse

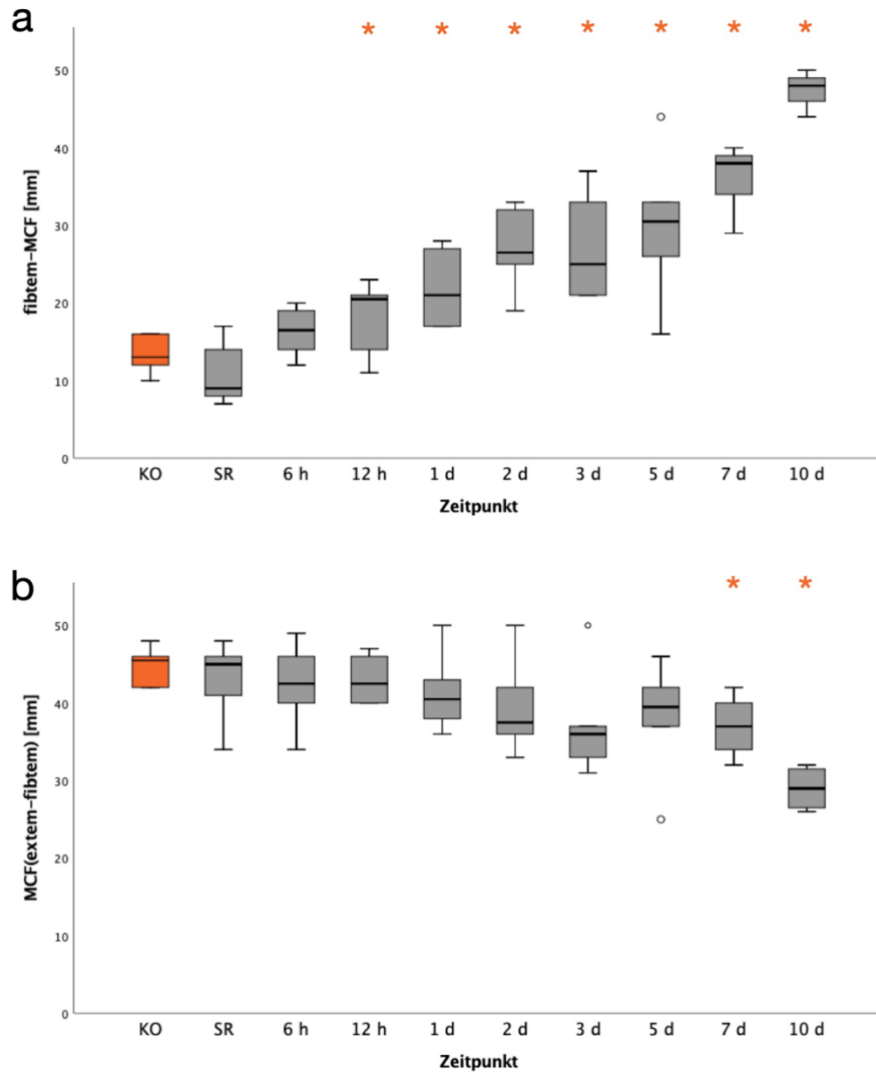


Abb. 21: Vergleich der bei polytraumatisierten Patienten in fibtem (a) gemessenen Werte sowie die thrombozytären (b) MCF-Werte mit denen der Kontrollprobanden. Für die statistische Testung wurden zu jedem Zeitpunkt die Quotienten aus den Werten der Traumapatienten und denen der gematchten Kontrollprobanden gebildet. Im Anschluss wurde mittels t-Test für eine Stichprobe gegen den Wert 1 getestet. Signifikante Unterschiede ergaben sich zu den mit einem Stern markierten Zeitpunkten: (a) 12 h ($p = 0,036$), 1 d ($p = 0,014$), 2 d ($p < 0,001$), 3 d ($p < 0,001$), 5 d ($p = 0,009$), 7 d ($p = 0,001$), 10 d ($p = 0,005$); (b) 7 d ($p = 0,018$), 10 d ($p = 0,004$). KO: Kontrollgruppe, SR: Schockraum, h: Stunden, d: Tage, MCF: maximale Gerinnselfestigkeit.

Ergebnisse

5.9.4 Luminex-Analyse der Serumzytokinkonzentrationen

Aus den in Kapitel 5.7.1 dargelegten Gründen wurden lediglich die Serumkonzentration der beiden Zytokine IFN- γ und IL-18 in der Gruppe der Traumapatienten analog 5.9.1 mit der Kontrollgruppe verglichen. Zu keinem Zeitpunkt war ein signifikanter Unterschied feststellbar.

Interessanterweise lagen sämtliche Messergebnisse der Kontrollprobanden für IL-6 und IL-10 unter dem jeweiligen LLOQ der Analyse, bei den gematchten Traumapatienten jedoch lediglich 3 bzw. 23 von möglichen 51 Messwerten, entsprechend 5,9 % bzw. 45,1 %.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messungen von IFN- γ und IL-18 sind **Tabelle 20** zu entnehmen.

Tabelle 20: Gegenüberstellung der Mittelwerte der in der Luminex-Serumanalyse gewonnenen Daten in der Vergleichsgruppe der Traumapatienten und der Kontrollgruppe.

	Mittelwert \pm Standardabweichung	
	Vergleichsgruppe der Traumapatienten	Kontrollgruppe
IFN- γ	41,89 \pm 27,09	39,90 \pm 26,42
IL-18	28,31 \pm 11,26	27,59 \pm 11,55

Diskussion

6 DISKUSSION

Die vorliegend beschriebene Studie wurde initiiert, um Th17-Zellen, CD4+ Tregs und Thrombozyten in ihrer Rolle im Rahmen der Immunantwort auf schwere Verletzungen – Polytraumata – näher zu charakterisieren. Für diese Pilotauswertung der ersten zehn eingeschlossenen Studienpatienten wurden verschiedene Fragen definiert (s. Fragestellung), die im Folgenden im Zusammenhang mit den Ergebnissen erörtert werden sollen.

6.1 TH17-ZELLZAHL, CD4+ TREG-ZELLZAHL

Die Zahl der Th17-Zellen und der CD4+ Tregs wurde durchflusszytometrisch erhoben. Die Durchflusszytometrie ist ein bewährtes Verfahren, das es ermöglicht, durch einen hohen Durchsatz von im vorliegenden Fall etwa 10 000 Ereignissen, also Einzelmessungen, pro Sekunde auch sehr kleine Zellpopulationen zu analysieren. Die Berücksichtigung mehrerer Oberflächenmarker erlaubt zudem eine sehr feine und genaue Differenzierung der Zellen. Der Anteil von CD4+ Tregs an CD4+ Lymphozyten im Blut gesunder Erwachsener bewegt sich im einstelligen Prozentbereich (Gregg, Smith et al. 2005), dasselbe gilt auch für Th17-Zellen (Zhang, Ma et al. 2009). Die in dieser Studie verwendeten Marker zur Identifikation der CD4+ Tregs – CD4, CD25, CD127 – sind gut etabliert (Liu, Putnam et al. 2006) und wurden in zahlreichen Studien verwendet.

Für Th17-Zellen hingegen wird zur Identifikation in den meisten Studien die CD4-Expression in Kombination mit der intrazellulären Expression von IL-17A nach Aktivierung benutzt, was für diese Arbeit keine Option war: Th17-Zellen sollten nicht nur quantitativ, sondern auch hinsichtlich ihres nativen, also unbeeinflussten, Expressionsprofils von IL-17A erfasst werden. Die Koexpression von CD4, CD161 und CD196 wurde bereits in einigen Untersuchungen zur Ermittlung der Th17-Zellen verwendet (Kerzel, Dehne et al. 2012, DaFonseca, Niessl et al. 2015, Kikuchi, Hashizume et al. 2015, Rito, Viehl et al. 2017), weshalb diese Kombination auch für die vorliegende Studie gewählt wurde. Ein direkter Vergleich der so selektierten Zellen mit den über die Zytokinproduktion identifizierten Zellen wurde allerdings bis dato nicht durchgeführt.

Bezüglich der Th17- und CD4+ Treg-Zahlen nach Trauma ist die Datenlage noch recht dünn. Während die meisten Studien quantitative Vergleiche zwischen (Trauma-)Patienten und gesunden Kontrollprobanden vollziehen, stand bisher insbesondere eine Beschreibung der Entwicklung dieser Messgrößen über einen längeren Zeitraum nach Trauma noch aus. Zudem ergeben sich in der Zusammenschau der aktuellen Literatur einige Herausforderungen: Zunächst muss zwischen humanen und Tier-Studien differenziert werden, die vorhandenen humanen Studien sind außerdem häufig nicht deckungsgleich in ihren Einschlusskriterien. Sowohl Beobachtungszeitraum als auch statistische und laboranalytische Methoden unterscheiden sich zum Teil deutlich. All diese Faktoren erschweren einen direkten Vergleich.

Diskussion

Im Themenbereich der Sepsis deuten aktuelle Forschungsarbeiten darauf hin, dass eine Verschiebung des immunologischen Gleichgewichts zugunsten der Th17-Zellen und hohe IL-17-Serumspiegel mit einem schlechteren Outcome und der Entwicklung von Komplikationen korreliert: In einer Untersuchung an Traumapatienten aus dem Jahr 2016 konnten bei Patienten, die eine Sepsis entwickelten, höhere Th17- und CD4+ Treg-Zahlen nachgewiesen werden als bei den gesunden Kontrollen. Kein signifikanter Unterschied war hingegen zwischen Traumapatienten ohne Sepsis und gesunden Kontrollprobanden zu sehen. In der Gruppe der nicht-überlebenden Patienten korrelierte zudem der Th17/ CD4+ Treg-Quotient an Tag 7 und Tag 14 mit dem SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*)-Score. (Gupta, Bhoi et al. 2016)

Eine weitere, 2017 publizierte, Studie an Sepsispatienten verglich die Anteile von Th17-Zellen und CD4+ Tregs sowie den Th17/ CD4+ Treg-Quotienten von überlebenden und nicht-überlebenden Patienten. Alle drei Messgrößen waren in der Gruppe der nicht-überlebenden Patienten erhöht. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden verzeichneten die Sepsispatienten höhere Werte, außerdem lagen die Werte derjenigen Patienten, die ein Multiorganversagen entwickelten, über denen der Patienten ohne Multiorganversagen. Th17-Zellzahl und Th17/ CD4+ Treg-Quotient korrelierten außerdem mit dem APACHE II-Score und den IL-6-Serumwerten der Patienten. (Guo, Tao et al. 2017) Als Erklärung für die beobachteten negativen Effekte der Th17-Zellen ist das proinflammatorische Profil dieser Zellen denkbar, welches bei Überhandnehmen dieser Zellen möglicherweise zur Entwicklung eines generalisierten hyperinflammatorischen Status führt. Andererseits stellt sich für die beiden oben genannten Studien auch die Frage, ob die Verschiebung des Th17/ CD4+ Treg-Gleichgewichts als Ursache oder als Folge des Sepsisgeschehens gewertet werden sollte.

In einem Polytraumamodell in der Ratte konnten ähnliche Ergebnisse wie in der Sepsis auch für das Trauma gezeigt werden: Es fand sich ein im Vergleich zu scheinoperierten Tieren verminderter CD4+ Treg/ Th17-Quotient – gleichzusetzen mit einem erhöhten Th17/ CD4+ Treg-Quotienten, wobei allerdings kein signifikanter Unterschied in der Zahl der Th17-Zellen zu beobachten war (Dai, Sun et al. 2013). Weitere Untersuchungen zeigten, dass durch Behandlung mit einem Anti-IL-17-Antikörper die in der Lunge beobachtete Entzündung reduziert werden konnte (Dai, Xu et al. 2015).

Andererseits ergab 2011 eine Untersuchung an Blutproben von Verbrennungsoptionen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden eine verminderte Th17-vermittelte Antwort auf Stimulation mit *Candida albicans*-Antigen. Die Suppression der Immunantwort schien durch erhöhte IL-10-Spiegel vermittelt zu sein und war durch den Zusatz von Patientenserum zu Kontrollprobanden-Blutproben auch auf die gesunde Gruppe übertragbar. (Inatsu, Kogiso et al. 2011)

In der hier vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Veränderung der Th17-Zellzahl und CD4+ Treg-Zahl im Laufe des Beobachtungszeitraumes nachgewiesen werden. Daraus ergaben sich insgesamt auch keine signifikanten Veränderungen im Th17/ CD4+ Treg-Quotienten. Es ist allerdings

Diskussion

zu berücksichtigen, dass keiner der eingeschlossenen Patienten eine Sepsis entwickelte, welche entsprechend der oben aufgeführten Literatur vorwiegend mit einer Entgleisung des Gleichgewichts dieser beiden Zelltypen assoziiert ist. Im Falle eines Einschlusses von septischen Patienten zu einem späteren Zeitpunkt im Laufe der Studie könnte eine diesbezügliche Subgruppenanalyse über mögliche Unterschiede in der Dynamik des Th17/ CD4+ Treg-Quotienten Aufschluss geben.

Andere Studien hingegen konnten posttraumatisch – im Gegensatz zu unseren Ergebnissen – signifikante Änderungen der CD4+ Treg-Zahlen nachweisen, widersprechen sich allerdings in der Richtung: Anstieg gegen Abfall. So verglich eine Studie an schwerverletzten Patienten aus dem Jahr 2006 den Anteil der CD4+ Tregs an den Tagen 1 und 7 nach Trauma miteinander und mit gesunden Kontrollprobanden; während an Tag 1 kein signifikanter Unterschied zur gesunden Kontrolle zu sehen war, war der CD4+ Treg-Anteil an Tag 7 signifikant erhöht (MacConmara, Maung et al. 2006). Andererseits wurde 2018 ein reduzierter Anteil von CD4+ Tregs bei Polytrauma-Patienten direkt, einen Tag, und drei Tage nach Trauma im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden nachgewiesen (Serve, Sturm et al. 2018).

Unser Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe erbrachte zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in den Th17/ CD4, CD4+ Treg/ CD4, und Th17/ CD4+ Treg-Quotienten. Ein Erklärungsansatz hierfür ist die zum jetzigen Zeitpunkt noch recht geringe Gruppengröße, weshalb der Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe zu einem späteren Zeitpunkt möglicherweise andere Resultate erbringen könnte. Andererseits lag in unserer Untersuchung der Mittelwert des prozentualen Anteils der CD4+ Tregs an den CD4+ Lymphozyten in der Vergleichsgruppe der Traumapatienten mit $3,8 \pm 1,5$ % über dem Mittelwert bei den gesunden Kontrollen ($3,3 \pm 1,0$ %), was, ohne einen statistischen Test durchgeführt zu haben, für eine tendenzielle Erhöhung des CD4+ Treg-Anteils nach Trauma spricht. Außerdem sahen wir in unserer Auswertung der ersten zwanzig eingeschlossenen Patienten im Unterschied zur hier durchgeführten Analyse der ersten zehn Patienten einen zwar sehr geringen, aber doch signifikanten Anstieg des Anteils der CD4+ Tregs im Zeitverlauf nach Trauma, was unsere Hypothese der Erhöhung des CD4+ Treg-Anteils nach Trauma stützt (Hefele, Ditsch et al. 2019).

6.2 IL-17A-EXPRESSION AUF TH17-ZELLEN UND CD4+ TREGS

Die Expression von IL-17A auf der Oberfläche von CD4+ Lymphozyten ist in der Literatur als Option beschrieben, um Th17-Zellen zu identifizieren und selektieren, da die Oberflächenexpression von IL-17A mit der intrazellulären Zytokinproduktion korreliert (Brucklacher-Waldert, Steinbach et al. 2009). Vermutet wird, dass die Präsentation von IL-17A auf der Oberfläche vorübergehend im Rahmen der Produktion und Ausschüttung dieses Zytokins durch die entsprechenden Zellen stattfindet. In bisherigen Studien wurden die Lymphozyten vor der IL-17A-Oberflächenfärbung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat und Ionomycin stimuliert (Kofler, Marson et al. 2014, Li, Mueller et al. 2014), was darauf schließen lässt, dass der Nachweis von IL-17A auf der Oberfläche eine gewisse Aktivierung der

Diskussion

entsprechenden Zellen voraussetzt. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass IL-17A sich auch als Maß für die Aktivität der Zellen, also ihrer IL-17-Produktion, eignen könnte.

Wie auch schon die Zahlen von Th17-Zellen und CD4+ Tregs, so wurde auch die Expression von IL-17A durchflusszytometrisch bestimmt. Der dafür verwendete Antikörper war PE-konjugiert, deshalb wurde jeweils die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) des Fluorochroms PE der entsprechend gegateten Zellpopulationen – Th17 und Treg – als Maßzahl für die IL-17A-Expression verwendet. Diese PE-MFI wurde jeweils in Relation zur PE-MFI identisch gegateter Zellen in einem zu jedem Messzeitpunkt mitgeführten Kontroll-Well gesetzt, welches ohne PE-konjugierten Antikörper inkubiert worden war. Daraus ergab sich für jeden Patienten zu jedem Messzeitpunkt die relative PE-MFI für Th17-Zellen, CD4+ Tregs und CD4+ Lymphozyten.

Im beobachteten Zeitraum stieg die Expression von IL-17A auf der Oberfläche der Th17-Zellen im peripheren Blut der schwerverletzten Patienten an. Zum gleichen Resultat führte unsere Analyse der ersten zwanzig Patienten (Hefele, Ditsch et al. 2019). Unter der oben erklärten Annahme, dass IL-17A im Rahmen der Abgabe an die Umgebung transient auf der Zelloberfläche exprimiert wird, vermuteten wir eine zunehmende Synthese und Freisetzung von IL-17A. In unserer Serumzytokinanalyse mittels Luminex-Technologie stellte sich allerdings heraus, dass die Serumspiegel von IL-17A der Patienten mit einer Ausnahme sämtlich unter der Nachweisgrenze des verwendeten Kits lagen, weshalb unsere Vermutung zum jetzigen Zeitpunkt nicht bestätigt werden kann. Auch in der Literatur gibt es aktuell noch keine Daten darüber, ob und in welchem Ausmaß sich posttraumatisch eine relevante Änderung der Serum-IL-17A-Spiegel vollzieht. Andererseits konnte kürzlich gezeigt werden, dass bei schwerverletzten Patienten der IL-17-Serumspiegel mit dem APACHE II-Score korreliert und sich gut als Prädiktionsmarker für das Auftreten einer Sepsis eignet (Ahmed Ali, Mikhael et al. 2018). In der letztgenannten Studie lag interessanterweise der Median des Serum-IL-17-Spiegels bei den nicht septischen Patienten bei 31 pg/ml und damit deutlich über dem für das von uns verwendete Kit angegebenen LLOQ von 2,27 pg/ml (Ahmed Ali, Mikhael et al. 2018). Wir verarbeiteten die gefrorenen Serumproben exakt gemäß der Herstelleranweisung, außerdem gelangen die Messungen der Standards, weshalb zum aktuellen Zeitpunkt kein Anhalt für methodische Fehler besteht. Im Falle einer erneuten Serumanalyse könnte ein Kit mit einem niedrigeren unteren Detektionsgrenzwert möglicherweise auswertbare Ergebnisse erbringen.

Für IL-17A sind vielfältige Funktionen beschrieben: Im Rahmen autoimmuner Gelenkerkrankungen trägt IL-17A zum Krankheitsprogress und über die Aktivierung von Osteoklasten zum Knochenabbau bei (Caetano-Lopes, Rodrigues et al. 2014). Im Mausmodell wurde zudem eine verzögernde Wirkung von IL-17A auf die Wundheilung festgestellt (Takagi, Kawakami et al. 2017). Diese eher ungünstigen Einflüsse von IL-17A lassen zunächst vermuten, dass ebendiese Effekte auch im Rahmen der posttraumatischen Immunreaktion im Vordergrund stehen und infolgedessen hohe IL-17-Spiegel mit einer schlechteren Prognose einhergehen. Andererseits kommt IL-17A eine Schlüsselfunktion in der Immunabwehr verschiedener bakterieller und Pilz-Infektionen zu (Ishigame, Kakuta et al. 2009), was

Diskussion

in einem durch Trauma geschädigten und dadurch für *second hits*, darunter auch Infektionen, anfälligeren Organismus durchaus von Bedeutung sein könnte.

In den letzten Jahren stellte sich außerdem heraus, dass die in vielen Bereichen des Organismus beschriebene Plastizität von Zellen auch für das Immunsystem und insbesondere die CD4⁺ Tregs eine zentrale Rolle einnimmt. Vor allem zwischen CD4⁺ Tregs und den in ihrer Funktion eigentlich gegensätzlichen Th17-Zellen scheint eine besondere Verbindung zu bestehen: *In vitro* gelang es, CD4⁺ Tregs zu transdifferenzieren und damit zur IL-17A-Produktion anzuregen (Koenen, Smeets et al. 2008). In der Literatur ist außerdem beschrieben, dass ein Teil der CD4⁺ Tregs durch Aktivierung zur IL-17A-Produktion angeregt werden kann (Voo, Wang et al. 2009).

Dieser beschriebene Nachweis einer Subpopulation von CD4⁺ Tregs, die zumindest teilweise proinflammatorische Merkmale aufweisen, führte uns zu der Frage, ob solche Zellen auch im Rahmen der posttraumatischen Immunantwort nachweisbar und von Bedeutung sind. Um dieser Fragestellung nachzugehen, bestimmten wir die IL-17A-Expression auf der Oberfläche von CD4⁺ Tregs als Maß für deren proinflammatorische Kapazität. Im Laufe des Beobachtungszeitraumes war hier ein signifikanter Anstieg zu messen. Unsere Analyse der ersten zwanzig Patienten erbrachte das gleiche Ergebnis (Hefele, Ditsch et al. 2019). Bisher ging man davon aus, dass den CD4⁺ Tregs in der posttraumatischen Immunreaktion eine rein suppressive Funktion zukommt, sie wurden als zentraler Zelltyp des CARS gesehen. Wir konnten nun zeigen, dass zumindest ein Teil der CD4⁺ Tregs im zeitlichen Verlauf der posttraumatischen Phase zunehmend IL-17A zu produzieren scheint, wobei in der Literatur beschrieben ist, dass IL-17A-produzierende CD4⁺Tregs keineswegs zwangsläufig ihre Fähigkeit verlieren, Immunreaktionen zu modulieren und zu unterdrücken (Beriou, Costantino et al. 2009). Insbesondere posttraumatisch ist die Erhaltung des immunologischen Gleichgewichts von elementarer Wichtigkeit – für CD4⁺ Tregs, die durch die bedarfsgerechte Ausschüttung von IL-17A sowohl pro- als auch antiinflammatorische Prozesse in Gang setzen können, ist durchaus eine Schlüsselrolle denkbar. Die zum jetzigen Zeitpunkt verfügbaren Daten können derartige Hypothesen nicht verifizieren, hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig. Weitere Studien, beispielsweise zum genauen Zytokinprofil unterschiedlicher CD4⁺ Treg-Populationen, oder auch Tiermodelle mit Depletion entsprechender Zell-Subgruppen, könnten weitere Erkenntnisse liefern. CD4⁺ Tregs sind aufgrund ihrer hohen Stoffwechselaktivität und Rezeptordichte auf ihrer Zelloberfläche im Vergleich zu konventionellen Effektor-T-Zellen imstande, außerordentlich rasch auf Umgebungsreize zu reagieren (Matarese, De Rosa et al. 2008). Bestätigen konnte dies eine Untersuchung, die sich eines murinen Verbrennungsmodells bediente: Eine Aktivierung von CD4⁺ Tregs in den drainierenden Lymphknoten ist schon sehr früh – 15 Minuten – nach Trauma nachweisbar (Hanschen, Tajima et al. 2011). Dieser Umstand macht die CD4⁺ Tregs zu geradezu idealen Kandidaten für eine Rolle als Sentinel-Zelle im immunologischen Feld.

Diskussion

6.3 THROMBOZYTENZAHL, EXPRESSIONSPROFIL DER THROMBOZYTEN UND THROMBELASTOMETRIE: MCF IN EXTEM, INTEM, FIBTEM, THROMBOZYTÄRE MCF

Die Thrombozytenzahl der Patienten wurde den jeweils routinemäßig durchgeführten Laboruntersuchungen entnommen. Gemittelt über alle Patienten und Zeitpunkte lag die Thrombozytenzahl bei $185,93 \pm 130,79$ G/l (MW \pm SD) und stieg über den Beobachtungszeitraum an. Diesen Anstieg im Zeitverlauf konnten wir auch in der Auswertung der ersten zwanzig eingeschlossenen Patienten sehen (Hefeke, Ditsch et al. 2019).

Zur Thrombozytenzahl brandverletzter Patienten wurde 2013 eine niederländische Studie publiziert: Das Thrombozytenminimum wurde an Tag 3 gemessen, wonach sie bis zum Maximum mit deutlicher Thrombozytose an Tag 15 stetig anstieg und sich dann bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes an Tag 50 auf normale Werte einpendelte. Dabei zeigte sich in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse ein niedrigeres Maximum als Mortalitätsprädiktor, die univariate Cox-Regressionsanalyse ergab zudem einen niedrigen Nadir als signifikanten positiven Vorhersagewert für eine höhere Mortalität. (Marck, Montagne et al. 2013)

Eine vergleichbare Dynamik zeigte eine weitere, kürzlich veröffentlichte Untersuchung an brandverletzten Patienten; die Ergebnisse dieser Arbeit deuten ferner auch eine Korrelation zwischen der Thrombozytenzahlen und der Entwicklung einer Sepsis an (Cato, Wearn et al. 2018).

Auch nach Trauma wurde in einer retrospektiven Studie bei einem Teil der Patienten eine Thrombozytose beschrieben. Die Thrombozytose trat bei 18,7 % der Patienten im Mittel nach 15,4 Tagen auf. Im Vergleich zum Patientenkollektiv ohne Thrombozytose verzeichneten die Patienten mit einer Thrombozytose höhere ISS-Werte. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung einer Thrombozytose einerseits mit einer signifikant höheren Komplikationsrate assoziiert ist, andererseits aber auch mit einer niedrigeren Mortalität einhergeht. (Salim, Hadjizacharia et al. 2009)

In der von uns untersuchten Patientengruppe war am zehnten posttraumatischen Tag bei drei der zu diesem Zeitpunkt noch untersuchten sieben Patienten eine Thrombozytose messbar, allerdings erscheint ein Gruppenvergleich angesichts der geringen Patientenzahl zu diesem Zeitpunkt nicht sinnvoll. Auch ein Vergleich der Mortalitäten der beiden Gruppen ist nicht möglich, da die beiden Todesfälle in dem von uns untersuchten Kollektiv schon zu recht frühen Zeitpunkten auftraten, sodass sich eine Thrombozytose nicht erst entwickeln konnte. Eine differenzierte Analyse zu einem späteren Zeitpunkt der Studie nach abgeschlossenem Patienteneinschluss wird diesbezüglich möglicherweise neue Erkenntnisse liefern.

Um die Funktionalität der Gerinnung und insbesondere der Thrombozyten zu untersuchen, führten wir thrombelastometrische Messungen durch. Während im Laufe des Beobachtungszeitraumes die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) in den extem-, intem- und fibtem-Messungen anstieg, sahen wir in der als Differenz aus extem- und fibtem-MCF errechneten thrombozytären MCF einen Rückgang über den Beobachtungszeitraum. Analoge Resultate zeigte unsere Auswertung der ersten zwanzig eingeschlossenen Patienten (Hefeke, Ditsch et al. 2019). Der Vergleich mit der Kontrollgruppe ergab

Diskussion

höhere MCF-Werte in extem, intem und fibtem an einigen – späteren – Zeitpunkten im Traumakollektiv. Insgesamt erschien der Unterschied in den intem-Messungen deutlicher als in den extem-Messungen. Die thrombozytäre MCF hingegen war in der Gruppe der Traumapatienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ab dem Zeitpunkt sieben Tage nach Trauma reduziert. Der Rückgang der thrombozytären MCF als Maß für die Thrombozytenfunktion lässt uns eine Verminderung der Thrombozytenfunktion im Zeitverlauf nach Trauma annehmen.

Mittels Durchflusszytometrie analysierten wir ferner die thrombozytäre Oberflächenexpression von CD62P, CD63 und TLR9. Hier ergaben sich keine signifikanten Änderungen im Laufe des Beobachtungszeitraumes. Im Vergleich mit der Gruppe der gesunden Kontrollprobanden sehen wir allerdings eine signifikant reduzierte CD62P-Expression auf den Thrombozyten der polytraumatisierten Patienten mit Ausnahme des letzten erhobenen Zeitpunktes zehn Tage nach Trauma.

Die posttraumatische Expression der oben genannten Oberflächenmarker untersuchte unsere Arbeitsgruppe bereits 2016 im Rahmen eines murinen Verbrennungsmodells. Im Gegensatz zu den Patientendaten dieser Studie konnte allerdings weder zwei Stunden noch sieben Tage nach Trauma ein signifikanter Unterschied zwischen der Verbrennungs- und Kontrollgruppe detektiert werden (Bergmann, Hefele et al. 2016). Einen Erklärungsansatz für diese offensichtlich differierenden Ergebnisse stellen einerseits speziesspezifische Unterschiede dar, andererseits wäre auch eine Abhängigkeit des thrombozytären Expressionsprofils von der Art des Traumas (Verbrennung versus stumpfe Gewalt) denkbar. Die Blutentnahmetechnik hingegen hat laut Literatur keinen signifikanten Einfluss auf die thrombozytäre Expression von CD62P (Welch, Crooks et al. 2018).

Aus unseren Vorversuchen an Thrombozyten, in welchen wir die Expression von CD62P, CD63 und TLR9 nach Aktivierung mit TRAP-6 untersuchten, geht hervor, dass CD62P und CD63 durch Aktivierung in ihrer Expression hochreguliert werden (s. Kapitel 5.4.2.1).

Unsere Ergebnisse in Hinblick auf die im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Traumapatienten reduzierten CD62P-Expression passen zu einer 2016 publizierten Studie, die eine niedrigere thrombozytäre CD62P-Expression von Traumapatienten im Vergleich zur einer gesunden Kontrollgruppe nach Stimulation mit Adenosindiphosphat beschreibt (Ramsey, Fabian et al. 2016).

In Zusammenschau unserer Ergebnisse der Thrombozytenuntersuchungen sehen wir also einen posttraumatischen Anstieg der Thrombozytenzahl. Die reduzierte CD62P-Expression deutet eine herabgesetzte Aktivierbarkeit an und passt damit gut zur thrombelastometrisch gemessenen verminderten thrombozytären Gerinnungsfunktion. Im Vergleich zur Thrombelastometrie war hinsichtlich der thrombozytären CD62P-Expression bereits direkt nach Trauma eine Reduktion nachweisbar, womit diese möglicherweise als Koagulopathiemarker zukünftig infrage käme.

Diskussion

6.4 SERUMSPIEGEL VON IFN- γ UND IL-18

Interferon-gamma (IFN- γ) ist ein Signalprotein aus der Gruppe der Interferone und das einzige Interferon der Klasse II. Die Klassenzuteilung der Interferone erfolgt auf Grundlage der Rezeptoren, mit denen sie interagieren, im Falle von IFN- γ handelt es sich um den Interferon-gamma-Rezeptor (IFNGR), einen heterodimeren Rezeptor aus zwei Ketten. IFN- γ spielt eine Rolle bei der Immunabwehr verschiedener Pathogene, besondere Bedeutung kommt ihm aufgrund seiner Virusreplikation-inhibierenden Eigenschaften bei der Bekämpfung viraler Infektionen zu. Außerdem hat IFN- γ eine immunmodulatorische Wirkung. Es wird von Zellen sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems produziert: Im Bereich des angeborenen Immunsystems sind hier die Natürlichen Killerzellen und die Natürlichen Killer-T-Zellen zu nennen, Hauptproduzenten im erworbenen Immunsystem sind CD4⁺ Th1-Zellen sowie CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, in geringerem Ausmaß auch Th17-Zellen. Für Th1-Zellen kommt dem IFN- γ eine definierende Rolle zu, indem es von diesen Zellen sezerniert wird und über einen positiven Feedback-Mechanismus für die Differenzierung nicht-polarisierter Th-Zellen zu Th1-Zellen sorgt. Gleichzeitig inhibiert IFN- γ die Polarisation in Th2-Richtung. (Schoenborn and Wilson 2007)

Interleukin 18 (IL-18) ist ein proinflammatorisches Zytokin der IL-1-Superfamilie, das erstmals 1989 als „Interferon gamma-induzierender Faktor“ beschrieben wurde. Es wird von Monozyten und Makrophagen, aber auch von Epithelzellen produziert. Über den heterodimeren IL-18-Rezeptor (IL-18R), bestehend aus IL-18R α und IL-18R β wirkt es insbesondere auf T-, NK-Zellen und dendritische Zellen. Wie schon von den Erstbeschreibern festgestellt, ist IL-18 in der Lage, zusammen mit IL-12 oder IL-15 die Ausschüttung von IFN- γ durch NK-Zellen zu induzieren. Damit kommt IL-18 eine wichtige Rolle in der Polarisation naiver T-Zellen in Th1-Richtung zu, welche, wie oben beschrieben, durch IFN- γ hervorgerufen wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Gamma-delta-T-Zellen ($\gamma\delta$ -T-Zellen) und Th17-Zellen durch Stimulation mit IL-18 zur Produktion von IL-17 angeregt werden. Aufgrund seiner proinflammatorischen Eigenschaften spielt IL-18 eine Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, auch scheint eine myokardiale Ischämie mit erhöhten IL-18-Serumspiegeln assoziiert zu sein. (Novick, Kim et al. 2013)

Ein Zusammenhang zwischen IFN- γ und IL-18 wird also insofern deutlich, dass beide Botenstoffe eine bedeutende Rolle für Th1-Zellen spielen.

Schon 2002 zeigte eine Studie an Patienten mit postoperativer Sepsis, dass bei denjenigen Patienten, die an der Sepsis starben, signifikant höhere IL-18-Werte messbar waren als bei Sepsis-Überlebenden; die an Tag 1 und 2 gemessenen IL-18-Werte zeigten sich als früher prognostischer Marker für das Outcome nach Sepsis (Emmanuilidis, Weighardt et al. 2002). 2009 wurden außerdem eine Studie an polytraumatisierten Patienten veröffentlicht, in der sich erhöhte IL-18-Werte zu einigen Zeitpunkten in der MODS- und Sepsis-Gruppe vergleichend mit Patienten ohne MODS oder Sepsis zeigten (Mommsen, Frink et al. 2009). Zu IFN- γ bei polytraumatisierten Patienten wurde 2016 die Resultate einer klinischen Studie publiziert: Bei Patienten, die ein Multiorganversagen entwickelten, wurden

Diskussion

höhere IFN- γ -Werte gemessen als bei in Hinblick auf Verletzungsschwere gematchte Patienten ohne Multiorganversagen (Manson, Cole et al. 2016). In unserer Studie waren IL-18 und IFN- γ die einzigen Zytokine von 18 untersuchten, deren Messwerte sämtlich über der Nachweisgrenze lagen und die wir deshalb auswerteten. Wir untersuchten, im Unterschied zu den erwähnten Studien, keine Unterschiede in Bezug auf die Entwicklung eines Multiorganversagens. Im Laufe des Beobachtungszeitraumes nach Trauma konnten wir keine signifikanten Änderungen der Zytokin-Serumspiegel feststellen. Auch konnten wir in dem Patientenkollektiv, das mit Kontrollprobanden gematcht war, zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zum gesunden Kontrollkollektiv feststellen.

6.5 EFFEKTE DER POTENTIELLEN EINFLUSSFAKTOREN ALTER, GESCHLECHT, VERLETZUNGSSCHWERE

In unsere statistische Analyse, wie sich die untersuchten Parameter über die Zeit bei den Traumapatienten entwickeln, berechneten wir die Faktoren Alter, Geschlecht und Verletzungsschwere mit ein, wobei die Verletzungsschwere anhand des ISS erhoben wurde. Der ISS ergibt sich aus den Quadraten dreier AIS-Werte und ist deshalb nicht stetig, außerdem korreliert er nicht linear mit der Schwere der Verletzung. Deshalb wurde der ISS nicht, wie das Alter, als linearer Faktor miteinkalkuliert, sondern dichotomisiert. Als Grenzwert wählten wir dabei einen ISS-Wert von 25, da diese Gruppierung häufiger verwendet wird und deshalb auch als Standard vorgeschlagen wurde (Rozenfeld, Radomislensky et al. 2014).

Die entsprechenden Ergebnisse dieser Einflussfaktoren-Analyse fasst Kapitel 5.8 zusammen.

Wir konnten für unser untersuchtes Patientenkollektiv zeigen, dass höheres Alter mit höheren Anteilen von Th17-Zellen und CD4+ Tregs an den CD4+-Lymphozyten einherging. Die Ergebnisse aus unserer Auswertung der ersten zwanzig eingeschlossenen Patienten decken sich damit (Hefele, Ditsch et al. 2019). In der Literatur gibt es diesbezüglich unterschiedliche Daten: Eine 2013 publizierte Studie fand erhöhte Th17-Zellzahlen und reduzierte CD4+ Treg-Zahlen bei älteren Patienten und vermutete deshalb eine höhere Anfälligkeit älterer Menschen für entzündliche Erkrankungen (Schmitt, Rink et al. 2013). In einer anderen Untersuchung zeigten sich hingegen niedrigere Th17-Zell-Anteile bei gesunden älteren im Vergleich zu gesunden jüngeren Probanden (Lee, Lee et al. 2011). Zwei Arbeiten wiesen außerdem höhere CD4+ Treg-Zahlen im Alter sowohl beim Menschen als auch in der Maus nach (Gregg, Smith et al. 2005, Sharma, Dominguez et al. 2006). Aufgrund dieser widersprüchlichen Datenlage sind sicher weitere Untersuchungen notwendig, um die altersbedingte Entwicklung verschiedener T-Zell-Untergruppen mit größerer Sicherheit charakterisieren zu können. Allgemein kann gesagt werden, dass mit steigendem Alter das Komplikations- und Infektionsrisiko auch posttraumatisch ansteigt, allerdings ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht beurteilbar, ob und welchen Einfluss die posttraumatisch höheren Zahlen von Th17-Zellen und CD4+ Tregs bei älteren Patienten auf dieses beobachtete schlechtere Outcome haben (Hildebrand, Pape et al. 2016).

Diskussion

Weitere Messgrößen, auf die das Alter einen signifikanten Einfluss hatte, waren die von uns gemessene MCF in fibtem sowie die rechnerisch erhobene thrombozytäre MCF. In unserer bereits publizierten Auswertung der ersten zwanzig Patienten verhielten sich die Werte der thrombozytären MCF genau so, allerdings war kein signifikanter Unterschied in der fibtem-MCF feststellbar (Hefeke, Ditsch et al. 2019). Zunächst mag dieses Ergebnis der thrombozytären MCF überraschen, erlaubt es doch den Schluss, dass jüngere Patienten ein größeres Risiko für die Entwicklung einer posttraumatischen thrombozytären Funktionsstörung tragen als ältere Patienten. Allerdings herrscht inzwischen Einigkeit darüber, dass sich mit steigendem Alter eine Verschiebung der hämostaseologischen Eigenschaften des Blutes in eine prokoagulatorische Richtung vollzieht. Die Konzentration verschiedener Gerinnungsfaktoren im Blut steigt an, zudem scheinen die Thrombozyten im Alter eine höhere Aktivierbarkeit aufzuweisen; aus diesen Änderungen erklärt sich auch die steigende Inzidenz venöser Thromboembolien bei älteren Menschen (Favaloro, Franchini et al. 2014). In einer Studie an gesunden Probanden zur Untersuchung altersassoziierter Unterschiede in thrombelastometrischen Messgrößen fand sich, passend zu unseren Ergebnissen, eine mit dem Alter ansteigende MCF in fibtem und im Unterschied zu unseren Messwerten auch in extem und intem (Theusinger, Nurnberg et al. 2010).

Auch in Bezug auf das Geschlecht waren bei einigen Messgrößen Unterschiede detektierbar. So hatten die männlichen Patienten verglichen mit den weiblichen einen höheren Anteil von Th17-Zellen an den CD4+ Lymphozyten, passend dazu auch einen höheren Th17/ CD4+ Treg-Quotienten. Die Ergebnisse der Auswertung der ersten zwanzig eingeschlossenen Patienten differieren etwas: Wir sahen ebenfalls einen höheren Anteil der Th17-Zellen bei Männern, aber auch höhere CD4+ Treg-Anteile; den Th17/ CD4+ Treg-Quotienten untersuchten wir nicht (Hefeke, Ditsch et al. 2019). In der Literatur sind zum aktuellen Zeitpunkt kaum Angaben über die geschlechtsspezifische Verteilung von T-Helferzell-Subgruppen zu finden. Allerdings beschreibt passend zu unseren Ergebnissen eine Studie über akute myeloische Leukämie in der gesunden Kontrollgruppe einen höheren Anteil an Th17-Zellen bei Männern als bei Frauen (Ersvaer, Liseth et al. 2010). Eine weitere Untersuchung an gesunden Probanden maß einen höheren Anteil von CD4+ Tregs bei Männern als bei Frauen und sah in diesem geschlechtsbezogenen Unterschied einen möglichen Grund für die größere Anfälligkeit von Frauen für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen (Afshan, Afzal et al. 2012). Für diese beobachteten Unterschiede konnten wir nun auch im posttraumatischen Setting Evidenz liefern.

Auch in der Gerinnung sahen wir Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Patienten, so waren sämtliche gemessene MCF-Werte ebenso wie die berechnete thrombozytäre MCF bei Männern höher als bei Frauen. In einer Auswertung der ersten zwanzig Patienten, die allerdings nur extem-, fibtem- und thrombozytäre MCF berücksichtigte, sahen wir diese Unterschiede nur in extem und fibtem, nicht aber in der thrombozytären MCF (Hefeke, Ditsch et al. 2019). Zu gegenteiligen Ergebnissen kam jedoch eine Untersuchung an gesunden Probanden, dort verzeichneten Frauen höhere MCF Werte in extem, intem und fibtem, wobei die Unterschiede nur in extem und intem statistisch signifikant waren (Theusinger, Nurnberg et al. 2010). In der Literatur herrscht zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Einigkeit

Diskussion

darüber, ob männliches Geschlecht allein als unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten thrombotischer und thromboembolischer Ereignisse zu werten ist (Tormene, Ferri et al. 2011). In einer Untersuchung hinsichtlich posttraumatischer Risikofaktoren für thromboembolische Komplikationen konnte allerdings kürzlich männliches Geschlecht als Risikofaktor für das Auftreten einer tiefen Venenthrombose nachgewiesen werden (Van Gent, Calvo et al. 2017). Dieses Ergebnis passt zu unseren Messungen, die Hinweise auf eine erhöhte Gerinnungskapazität des Blutes männlicher Patienten nach Trauma geben.

Zuletzt untersuchten wir auch den Einfluss der Verletzungsschwere auf die von uns erhobenen Messgrößen. In der Durchflusszytometrie sahen wir hier eine höhere IL-17A-Expression auf den CD4⁺ Tregs der weniger schwer verletzten Patienten mit einem ISS < 25 im Vergleich zu dem Patientenkollektiv mit einem ISS ≥ 25. Wir konnten in unserer Literaturrecherche keinerlei Daten zur posttraumatischen Expression von IL-17A auf CD4⁺ Tregs finden, dementsprechend auch keine Unterschiede in Bezug auf die Verletzungsschwere. Wir nehmen an, dass die IL-17A-Expression auf den CD4⁺ Tregs als Maß für deren proinflammatorische Kapazität gesehen werden kann, selbige also bei weniger schwer verletzten Patienten höher als bei den schwer verletzten ist. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass bisher experimentell erprobten Therapieansätzen zur posttraumatischen Immunmodulation eine Unterstützung der Inflammation gemein ist (siehe Kapitel 2.2), entzündliche Prozesse folglich durchaus notwendig in der Immunreaktion auf Trauma zu sein scheinen. In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen sind zwei Interpretationen möglich. Zum einen ist denkbar, dass ein durch ein Trauma geschädigter Organismus mit zunehmender Verletzungsschwere unter Umständen keine adäquate Inflammation mehr ausbilden kann. Zum anderen wäre möglich, dass sich die Rolle der CD4⁺ Tregs in Abhängigkeit der Verletzungsschwere kontrolliert ändert und bei schweren Verletzungen dieser T-Zell-Subpopulation eine eher antiinflammatorische Rolle zukommt. Andererseits konnten wir diese Ergebnisse in der Auswertung der ersten zwanzig eingeschlossenen Patienten nicht reproduzieren, hier zeigten sich keine signifikanten Verletzungsschwere-bedingten Unterschiede in der IL-17A Expression auf CD4⁺ Tregs (Hefele, Ditsch et al. 2019). Auch die Messungen der Serumkonzentrationen von IL-18 und IFN- γ der ersten zehn eingeschlossenen Patienten können diese Vermutung nicht stützen: die weniger schwer verletzten Patienten hatten niedrigere Konzentrationen dieser proinflammatorischen Zytokine als die schwerer verletzten Patienten, was für eine stärkere entzündliche Aktivität bei höheren ISS-Werten spricht. Berücksichtigt werden sollte allerdings, dass sowohl IL-18 als auch IFN- γ typische Th1-Zell-assoziierte Zytokine sind; es wäre also auch ein die verschiedenen T-Helferzell-Populationen in unterschiedliche Richtungen beeinflussender Effekt des Traumas denkbar. Möglicherweise ergibt sich eine Erklärung für diese eher widersprüchlichen Ergebnisse durch eine differenziertere Analyse der Expression verschiedener Oberflächenmarker auf Th17-Zellen und CD4⁺ Tregs im zeitlichen Verlauf unserer Studie. Die Bestimmung weiterer Zytokine im Serum der Patienten war – wie schon beschrieben – durch die Unterschreitung der unteren

Diskussion

Detektionsgrenzwerte des verwendeten Kits nicht möglich, was im Falle weiterer Messungen zu einem späteren Zeitpunkt für eine Anwendung sensitiverer Methoden spricht.

Hinsichtlich der Gerinnung wurde durch die Verletzungsschwere die MCF in fibtem und die thrombozytäre MCF beeinflusst: Bei Patienten mit einem ISS < 25 sahen wir eine niedrigere fibtem-MCF und passend dazu eine höhere thrombozytäre MCF als beim schwerer verletzten Patientenkollektiv. Gleiche Ergebnisse zeigte auch die Auswertung der ersten zwanzig Patienten, zusätzlich sahen wir dort noch eine höhere Thrombozytenzahl bei den weniger schwer verletzten Patienten (Hefele, Ditsch et al. 2019). Unsere Vermutung einer positiven Korrelation der thrombozytären Dysfunktion mit der Verletzungsschwere lässt sich also auch auf das hier ausgewertete kleinere Patientenkollektiv übertragen.

Limitationen und Schlussfolgerung

7 LIMITATIONEN UND SCHLUSSFOLGERUNG

Die hier vorliegende Pilotauswertung einer nicht-interventionellen klinischen Studie an schwerverletzten Patienten liefert zahlreiche neue Ansätze zum besseren Verständnis der immunologischen Vorgänge nach Trauma. Nichtsdestoweniger muss berücksichtigt werden, dass der deskriptive Charakter der Studie keine Ableitung von Kausalzusammenhängen erlaubt. Die Zahl der zu diesem Zeitpunkt in die Auswertung eingeschlossenen Patienten ist mit zehn Schwerverletzten als eher gering einzustufen, trotzdem ließen sich hinsichtlich der untersuchten Messgrößen zahlreiche – statistisch signifikante – Änderungen und Unterschiede erkennen. Ein Großteil der hier beschriebenen Entwicklungen war außerdem in der Auswertung eines größeren Patientenkollektivs, nämlich der ersten zwanzig eingeschlossenen Patienten, reproduzierbar (Hefele, Ditsch et al. 2019).

Bisher wurden lediglich die Daten von sechs der schwerverletzten Patienten mit hinsichtlich Alter und Geschlecht gematchten gesunden Probanden verglichen. Ein weiterer Einschluss von Kontrollprobanden, um die Auswertung eines größeren Kollektivs zu ermöglichen, sollte für die Zukunft geplant werden.

Weiterhin berücksichtigt diese vorliegende Auswertung die Art und Menge eventuell verabreichter Blutprodukte nicht. Gerade aufgrund von erwiesenermaßen auftretenden Störungen der Thrombozytenfunktion durch Lagerung der Konserven – sogenannten *platelet storage lesions* – sollten Transfusionen in weitere Auswertungen miteinbezogen werden (Devine and Serrano 2010).

Die Serumzytokinanalyse mittels Luminex-Technologie ergab leider im vorliegenden Fall nur zwei auswertbare von 18 untersuchten Zytokinen, weswegen eine Wiederholung der Messung – möglichst mit sensitiveren Methoden – in Betracht gezogen werden sollte.

Bemerkenswert hingegen sind unsere Ergebnisse der IL-17A-Expression auf CD4+ Tregs. Erstmals gelang der Nachweis dieses proinflammatorischen CD4+ Treg-Subtyps im Rahmen der Immunantwort nach Trauma, wobei sich im zeitlichen Verlauf eine Steigerung der IL-17A-Expression im Sinne einer Steigerung der proinflammatorischen Kapazität der CD4+ Tregs zeigte. Obwohl der Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede ergab, bleibt abzuwarten, welche Resultate die Auswertung eines größeren Kollektivs erbringen wird.

In unserer Untersuchung der Thrombozyten zeigte sich trotz steigender Zellzahl eine Minderung der hämostaseologischen Funktion; auch im Vergleich mit den gesunden Probanden war die Thrombozytenfunktion bei den Traumapatienten reduziert. Diese Beobachtungen lassen sich gut als traumainduzierte Koagulopathie erklären, deren Auftreten bereits beschrieben ist. Besonders CD62P, dessen Expression bei den schwerverletzten Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden reduziert war, sollte zudem als potentieller, sehr früher, Koagulopathiemarker weiter evaluiert werden. Untersuchungen der Korrelation der CD62P-Expression mit verschiedenen Gerinnungsparametern unter Einbeziehung der wiederholten Messungen pro Patient könnten dabei hilfreich sein (Bakdash and Marusich 2017). In anderen Bereichen der Medizin ist die Durchflusszytometrie inzwischen

Limitationen und Schlussfolgerung

Goldstandard in der Diagnostik verschiedener Erkrankungen; eine Anwendung in der Intensivmedizin zum Beispiel zur Diagnostik von Thrombozytenfunktionsstörungen ist also durchaus denkbar.

Zusammenfassung

8 ZUSAMMENFASSUNG

Unfälle und Unfallfolgen stellen weiterhin eine der häufigsten Todesursachen bei Menschen mittleren Alters dar. Die technische und operative Versorgung dieser schwerverletzten Patienten wird stetig verbessert, die immunologische Reaktion des Organismus auf das Trauma hingegen ist weiterhin nur teilweise verstanden und kann deshalb bis heute nicht adäquat moduliert und in die Therapie mit einbezogen werden. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass die Fehlreaktion des Immunsystems die Hauptursache des späten Versterbens von schwerverletzten Patienten – Tage oder Wochen nach dem eigentlichen Trauma – darstellt, kommt dem umfassenden Verständnis der posttraumatischen immunologischen Vorgänge besondere Bedeutung zu.

In früheren Tierversuchen konnte unsere Arbeitsgruppe bereits eine posttraumatische Interaktion von regulatorischen T-Zellen (CD4+ Tregs) und Thrombozyten zeigen. Um Hinweise auf Wechselwirkungen dieser beiden Zelltypen auch im humanen Organismus zu sammeln, wurde eine nicht-interventionelle, prospektive klinische Studie an schwerverletzten Patienten initiiert. Posttraumatisch wurde zu neun definierten Zeitpunkten Blut abgenommen, um mittels Durchflusszytometrie, Thrombelastometrie und Luminex-Technologie Thrombozyten, CD4+ Tregs und – im Unterschied zum Tierversuch – auch T-Helfer-17-Zellen (Th17-Zellen) hinsichtlich ihrer Funktion und der assoziierten Zytokine näher zu charakterisieren. Ziele der hier vorgestellten Pilotauswertung waren die Analyse der Anzahl und der IL-17-Expression von CD4+ Tregs und Th17-Zellen sowie die Untersuchung der Thrombozytenfunktion. Hierbei sollte insbesondere auch den Fragen nachgegangen werden, welcher Dynamik diese potentiell beobachtbaren Änderungen folgen und inwieweit bestimmte Patientencharakteristika die gemessenen Parameter beeinflussen.

Die Expression des proinflammatorischen Markers IL-17A stieg sowohl auf Th17-Zellen als auch auf CD4+ Tregs im Zeitverlauf an; zudem war sie auf den CD4+ Tregs von der Verletzungsschwere abhängig und bei weniger schwer verletzten Patienten höher. Die Zahl dieser beiden Zelltypen hingegen änderte sich im Laufe des Beobachtungszeitraumes nicht. Die Datenlage in der Literatur in Bezug auf die Zahl von Th17-Zellen und CD4+ Tregs im posttraumatischen Setting ist uneindeutig; die Auswertung unserer Daten zu einem späteren Zeitpunkt könnte hier richtungsweisende Ergebnisse liefern.

Ferner war eine Zunahme der thrombelastometrisch gemessenen maximalen Gerinnselfestigkeit (MCF) sowohl nach intrinsischer als auch nach extrinsischer Gerinnungsaktivierung zu sehen. Der rein thrombozytäre Anteil der Gerinnselfestigkeit hingegen nahm im Laufe des Beobachtungszeitraumes ab, obwohl die Thrombozytenzahl anstieg. Insgesamt passen die hämostaseologischen Messergebnisse zu einer schon vorbeschriebenen posttraumatischen Gerinnungsdiathese.

Mittels Luminex-Technologie und einem auf die verschiedenen T-Zell-Subgruppen zugeschnittenen Kit wurden die Serumkonzentrationen mehrerer Zytokine gemessen. Verwertbare Ergebnisse lieferten

Zusammenfassung

allerdings lediglich die Zytokine Interferon gamma (IFN- γ) und Interleukin 18 (IL-18). Die Serumlevel beider Zytokine waren bei Patienten mit einem ISS ≥ 25 höher als bei Patienten mit niedrigeren ISS-Werten, was auf eine positive Korrelation dieser Zytokine mit der Verletzungsschwere hindeutet.

Im Vergleich mit gesunden Kontrollprobanden zeigte sich schließlich die CD62P-Expression auf den Thrombozyten der schwerverletzten Patienten reduziert, was in Zusammenschau mit den Ergebnissen der Thrombelastometrie eine Verwendung als Koagulopathiemarker denkbar macht.

Als Pilotstudie konzipiert, bietet die vorliegende Untersuchung zahlreiche spannende neue Ansatzpunkte, deren weitere Untersuchung einerseits das Verständnis der posttraumatischen immunologischen Vorgänge verbessern, andererseits neue Marker zur leichteren Risikostratifizierung schwerverletzter Patienten liefern könnte.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham, E., P. F. Laterre, J. Garbino, S. Pingleton, T. Butler, T. Dugernier, B. Margolis, K. Kudsk, W. Zimmerli, P. Anderson, M. Reynaert, D. Lew, W. Lesslauer, S. Passe, P. Cooper, A. Burdeska, M. Modi, A. Leighton, M. Salgo, P. Van der Auwera and G. Lenercept Study (2001). "Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients." *Crit Care Med* **29**(3): 503-510.
- Afshan, G., N. Afzal and S. Qureshi (2012). "CD4+CD25(hi) regulatory T cells in healthy males and females mediate gender difference in the prevalence of autoimmune diseases." *Clin Lab* **58**(5-6): 567-571.
- Ahmed Ali, M., E. S. Mikhael, A. Abdelkader, L. Mansour, R. El Essawy, R. El Sayed, A. Eladawy and A. Mukhtar (2018). "Interleukin-17 as a predictor of sepsis in polytrauma patients: a prospective cohort study." *Eur J Trauma Emerg Surg* **44**(4): 621-626.
- Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi and S. Romagnani (2007). "Phenotypic and functional features of human Th17 cells." *J Exp Med* **204**(8): 1849-1861.
- Bakdash, J. Z. and L. R. Marusich (2017). "Repeated Measures Correlation." *Front Psychol* **8**: 456.
- Bardenheuer, M., U. Obertacke, C. Waydhas and D. Nast-Kolb (2000). "[Epidemiology of the severely injured patient. A prospective assessment of preclinical and clinical management. AG Polytrauma of DGU]." *Unfallchirurg* **103**(5): 355-363.
- Basu, S., R. J. Binder, R. Suto, K. M. Anderson and P. K. Srivastava (2000). "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." *Int Immunol* **12**(11): 1539-1546.
- Belkaid, Y. and K. Tarbell (2009). "Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*)." *Annu Rev Immunol* **27**: 551-589.
- Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance and H. D. Ochs (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." *Nat Genet* **27**(1): 20-21.
- Bergmann, C. B., F. Hefele, M. Unger, S. Huber-Wagner, P. Biberthaler, M. van Griensven and M. Hanschen (2016). "Platelets modulate the immune response following trauma by interaction with CD4+ T regulatory cells in a mouse model." *Immunol Res* **64**(2): 508-517.
- Beriou, G., C. M. Costantino, C. W. Ashley, L. Yang, V. K. Kuchroo, C. Baecher-Allan and D. A. Hafler (2009). "IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function." *Blood* **113**(18): 4240-4249.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." *Nature* **441**(7090): 235-238.
- Bock, M., C. B. Bergmann, S. Jung, M. Kalbitz, B. Relja, S. Huber-Wagner, P. Biberthaler, M. van Griensven and M. Hanschen (2018). "The posttraumatic activation of CD4+ T regulatory cells is modulated by TNFR2- and TLR4-dependent pathways, but not by IL-10." *Cell Immunol*.

Literaturverzeichnis

- Boilard, E., P. A. Nigrovic, K. Larabee, G. F. Watts, J. S. Coblyn, M. E. Weinblatt, E. M. Massarotti, E. Remold-O'Donnell, R. W. Farndale, J. Ware and D. M. Lee (2010). "Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production." *Science* **327**(5965): 580-583.
- Bone, L. B., K. D. Johnson, J. Weigelt and R. Scheinberg (1989). "Early versus delayed stabilization of femoral fractures. A prospective randomized study." *J Bone Joint Surg Am* **71**(3): 336-340.
- Bovenschen, H. J., P. C. van de Kerkhof, P. E. van Erp, R. Woestenenk, I. Joosten and H. J. Koenen (2011). "Foxp3+ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin." *J Invest Dermatol* **131**(9): 1853-1860.
- Brodde, M. F., K. Jurk and B. Kehrel (s.a.). Durchflusszytometrische Untersuchungen der Thrombozytenfunktion.
- Broos, K., H. B. Feys, S. F. De Meyer, K. Vanhoorelbeke and H. Deckmyn (2011). "Platelets at work in primary hemostasis." *Blood Rev* **25**(4): 155-167.
- Brucklacher-Waldert, V., K. Steinbach, M. Lioznov, M. Kolster, C. Holscher and E. Tolosa (2009). "Phenotypical characterization of human Th17 cells unambiguously identified by surface IL-17A expression." *J Immunol* **183**(9): 5494-5501.
- Caetano-Lopes, J., A. Rodrigues, A. Lopes, A. C. Vale, M. A. Pitts-Kiefer, B. Vidal, I. P. Perpetuo, J. Monteiro, Y. T. Kontinen, M. F. Vaz, A. Nazarian, H. Canhao and J. E. Fonseca (2014). "Rheumatoid arthritis bone fragility is associated with upregulation of IL17 and DKK1 gene expression." *Clin Rev Allergy Immunol* **47**(1): 38-45.
- Cato, L. D., C. M. Wearn, J. R. B. Bishop, M. J. Stone, P. Harrison and N. Moiemmen (2018). "Platelet count: A predictor of sepsis and mortality in severe burns." *Burns* **44**(2): 288-297.
- Cosmi, L., R. De Palma, V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, G. Rodolico, V. Querci, G. Abbate, R. Angeli, L. Berrino, M. Fambrini, M. Caproni, F. Tonelli, E. Lazzeri, P. Parronchi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato (2008). "Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor." *J Exp Med* **205**(8): 1903-1916.
- DaFonseca, S., J. Niessl, S. Pouvreau, V. S. Wacleche, A. Gosselin, A. Cleret-Buhot, N. Bernard, C. Tremblay, M. A. Jenabian, J. P. Routy and P. Ancuta (2015). "Impaired Th17 polarization of phenotypically naive CD4(+) T-cells during chronic HIV-1 infection and potential restoration with early ART." *Retrovirology* **12**: 38.
- Dai, H., T. Sun, Z. Liu, J. Zhang and M. Zhou (2013). "The imbalance between regulatory and IL-17-secreting CD4(+)T cells in multiple-trauma rat." *Injury* **44**(11): 1521-1527.
- Dai, H., L. Xu, Y. Tang, Z. Liu and T. Sun (2015). "Treatment with a neutralising anti-rat interleukin-17 antibody after multiple-trauma reduces lung inflammation." *Injury* **46**(8): 1465-1470.
- de Stoppelaar, S. F., C. van 't Veer and T. van der Poll (2014). "The role of platelets in sepsis." *Thromb Haemost* **112**(4): 666-677.
- Del Conde, I., M. A. Cruz, H. Zhang, J. A. Lopez and V. Afshar-Kharghan (2005). "Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system." *J Exp Med* **201**(6): 871-879.
- Devine, D. V. and K. Serrano (2010). "The platelet storage lesion." *Clin Lab Med* **30**(2): 475-487.
- El Mestoui, Z., H. Jalalzadeh, G. F. Giannakopoulos and W. P. Zuidema (2017). "Incidence and etiology of mortality in polytrauma patients in a Dutch level I trauma center." *Eur J Emerg Med* **24**(1): 49-54.

Literaturverzeichnis

- El-Behi, M., B. Ciric, H. Dai, Y. Yan, M. Cullimore, F. Safavi, G. X. Zhang, B. N. Dittel and A. Rostami (2011). "The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF." *Nat Immunol* **12**(6): 568-575.
- Emmanuilidis, K., H. Weighardt, E. Matevossian, C. D. Heidecke, K. Ulm, H. Bartels, J. R. Siewert and B. Holzmann (2002). "Differential regulation of systemic IL-18 and IL-12 release during postoperative sepsis: high serum IL-18 as an early predictive indicator of lethal outcome." *Shock* **18**(4): 301-305.
- Ersvaer, E., K. Liseth, J. Skavland, B. T. Gjertsen and O. Bruserud (2010). "Intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia differentially affects circulating TC1, TH1, TH17 and TREG cells." *BMC Immunol* **11**: 38.
- Favaloro, E. J., M. Franchini and G. Lippi (2014). "Aging hemostasis: changes to laboratory markers of hemostasis as we age - a narrative review." *Semin Thromb Hemost* **40**(6): 621-633.
- Feuerer, M., J. A. Hill, D. Mathis and C. Benoist (2009). "Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes." *Nat Immunol* **10**(7): 689-695.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 330-336.
- Frink, M., M. van Griensven, P. Kobbe, T. Brin, C. Zeckey, B. Vaske, C. Krettek and F. Hildebrand (2009). "IL-6 predicts organ dysfunction and mortality in patients with multiple injuries." *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* **17**: 49.
- Fujimi, S., M. P. MacConmara, A. A. Maung, Y. Zang, J. A. Mannick, J. A. Lederer and P. H. Lapchak (2006). "Platelet depletion in mice increases mortality after thermal injury." *Blood* **107**(11): 4399-4406.
- Ghoreschi, K., A. Laurence, X. P. Yang, C. M. Tato, M. J. McGeachy, J. E. Konkel, H. L. Ramos, L. Wei, T. S. Davidson, N. Bouladoux, J. R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W. T. Watford, H. W. Sun, G. Eberl, E. M. Shevach, Y. Belkaid, D. J. Cua, W. Chen and J. J. O'Shea (2010). "Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling." *Nature* **467**(7318): 967-971.
- Gregg, R., C. M. Smith, F. J. Clark, D. Dunnion, N. Khan, R. Chakraverty, L. Nayak and P. A. Moss (2005). "The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age." *Clin Exp Immunol* **140**(3): 540-546.
- Guo, J., W. Tao, D. Tang and J. Zhang (2017). "Th17/regulatory T cell imbalance in sepsis patients with multiple organ dysfunction syndrome: attenuated by high-volume hemofiltration." *Int J Artif Organs* **40**(11): 607-614.
- Gupta, D. L., S. Bhoi, T. Mohan, S. Galwnkar and D. N. Rao (2016). "Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with post traumatic sepsis." *Cytokine* **88**: 214-221.
- Hanschen, M., G. Tajima, F. O'Leary, K. Ikeda and J. A. Lederer (2011). "Injury induces early activation of T-cell receptor signaling pathways in CD4+ regulatory T cells." *Shock* **35**(3): 252-257.
- Hefele, F., A. Ditsch, N. Krysiak, C. C. Caldwell, P. Biberthaler, M. van Griensven, S. Huber-Wagner and M. Hanschen (2019). "Trauma Induces Interleukin-17A Expression on Th17 Cells and CD4+ Regulatory T Cells as Well as Platelet Dysfunction." *Front Immunol* **10**: 2389.
- Hernandez-Santos, N. and S. L. Gaffen (2012). "Th17 cells in immunity to *Candida albicans*." *Cell Host Microbe* **11**(5): 425-435.

Literaturverzeichnis

- Hildebrand, F., H. C. Pape, K. Horst, H. Andruszkow, P. Kobbe, T. P. Simon, G. Marx and T. Schurholz (2016). "Impact of age on the clinical outcomes of major trauma." *Eur J Trauma Emerg Surg* **42**(3): 317-332.
- Hovhannisyan, Z., J. Treatman, D. R. Littman and L. Mayer (2011). "Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases." *Gastroenterology* **140**(3): 957-965.
- Huber-Wagner, S., P. Biberthaler, S. Haberle, M. Wierer, M. Dobritz, E. Rummeny, M. van Griensven, K. G. Kanz, R. Lefering and D. G. U. TraumaRegister (2013). "Whole-body CT in haemodynamically unstable severely injured patients--a retrospective, multicentre study." *PLoS One* **8**(7): e68880.
- Hussmann, B. and S. Lendemans (2014). "Pre-hospital and early in-hospital management of severe injuries: changes and trends." *Injury* **45 Suppl 3**: S39-42.
- Inatsu, A., M. Kogiso, M. G. Jeschke, A. Asai, M. Kobayashi, D. N. Herndon and F. Suzuki (2011). "Lack of Th17 cell generation in patients with severe burn injuries." *J Immunol* **187**(5): 2155-2161.
- Ishigame, H., S. Kakuta, T. Nagai, M. Kadoki, A. Nambu, Y. Komiyama, N. Fujikado, Y. Tanahashi, A. Akitsu, H. Kotaki, K. Sudo, S. Nakae, C. Sasakawa and Y. Iwakura (2009). "Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoc epithelial bacterial infection and allergic responses." *Immunity* **30**(1): 108-119.
- Israels, S. J. and E. M. McMillan-Ward (2005). "CD63 modulates spreading and tyrosine phosphorylation of platelets on immobilized fibrinogen." *Thromb Haemost* **93**(2): 311-318.
- Ivanov, II, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua and D. R. Littman (2006). "The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." *Cell* **126**(6): 1121-1133.
- Keel, M. and O. Trentz (2005). "Pathophysiology of polytrauma." *Injury* **36**(6): 691-709.
- Kerzel, S., J. Dehne, T. Rogosch, B. Schaub, R. F. Maier and M. Zemlin (2012). "Th17 cell frequency in peripheral blood from children with allergic asthma correlates with the level of asthma control." *J Pediatr* **161**(6): 1172-1174.
- Kikuchi, J., M. Hashizume, Y. Kaneko, K. Yoshimoto, N. Nishina and T. Takeuchi (2015). "Peripheral blood CD4(+)CD25(+)CD127(low) regulatory T cells are significantly increased by tocilizumab treatment in patients with rheumatoid arthritis: increase in regulatory T cells correlates with clinical response." *Arthritis Res Ther* **17**: 10.
- Kinoshita, M., N. Kuranaga, A. Matsumoto, S. Ono, N. Shinomiya, H. Hiraide and S. Seki (2006). "Multiple interleukin-18 injections promote both mouse Th1 and Th2 responses after sublethal *Escherichia coli* infection." *Clin Exp Immunol* **143**(1): 41-49.
- Kirchhoff, C., P. Biberthaler, W. E. Mutschler, E. Faist, M. Jochum and S. Zedler (2009). "Early down-regulation of the pro-inflammatory potential of monocytes is correlated to organ dysfunction in patients after severe multiple injury: a cohort study." *Crit Care* **13**(3): R88.
- Koenen, H. J., R. L. Smeets, P. M. Vink, E. van Rijssen, A. M. Boots and I. Joosten (2008). "Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells." *Blood* **112**(6): 2340-2352.

Literaturverzeichnis

- Kofler, D. M., A. Marson, M. Dominguez-Villar, S. Xiao, V. K. Kuchroo and D. A. Hafler (2014). "Decreased RORC-dependent silencing of prostaglandin receptor EP2 induces autoimmune Th17 cells." *J Clin Invest* **124**(6): 2513-2522.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." *Annu Rev Immunol* **27**: 485-517.
- Krijgsveld, J., S. A. Zaat, J. Meeldijk, P. A. van Veelen, G. Fang, B. Poolman, E. Brandt, J. E. Ehlert, A. J. Kuijpers, G. H. Engbers, J. Feijen and J. Dankert (2000). "Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines." *J Biol Chem* **275**(27): 20374-20381.
- Lang, T. and M. von Depka (2006). "[Possibilities and limitations of thrombelastometry/-graphy]." *Hamostaseologie* **26**(3 Suppl 1): S20-29.
- Langley, R. G., B. E. Elewski, M. Lebwohl, K. Reich, C. E. Griffiths, K. Papp, L. Puig, H. Nakagawa, L. Spelman, B. Sigurgeirsson, E. Rivas, T. F. Tsai, N. Wasel, S. Tyring, T. Salko, I. Hampele, M. Notter, A. Karpov, S. Helou, C. Papavassilis, E. S. Group and F. S. Group (2014). "Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials." *N Engl J Med* **371**(4): 326-338.
- Lee, J. S., W. W. Lee, S. H. Kim, Y. Kang, N. Lee, M. S. Shin, S. W. Kang and I. Kang (2011). "Age-associated alteration in naive and memory Th17 cell response in humans." *Clin Immunol* **140**(1): 84-91.
- Lenschow, D. J., T. L. Walunas and J. A. Bluestone (1996). "CD28/B7 system of T cell costimulation." *Annu Rev Immunol* **14**: 233-258.
- Leonardi, C. L., A. B. Kimball, K. A. Papp, N. Yeilding, C. Guzzo, Y. Wang, S. Li, L. T. Dooley, K. B. Gordon and P. s. investigators (2008). "Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1)." *Lancet* **371**(9625): 1665-1674.
- Li, C. R., E. E. Mueller and L. M. Bradley (2014). "Islet antigen-specific Th17 cells can induce TNF-alpha-dependent autoimmune diabetes." *J Immunol* **192**(4): 1425-1432.
- Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins and L. A. Fouser (2006). "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides." *J Exp Med* **203**(10): 2271-2279.
- Lievens, D., A. Zerneck, T. Seijkens, O. Soehnlein, L. Beckers, I. C. Munnix, E. Wijnands, P. Goossens, R. van Kruchten, L. Thevissen, L. Boon, R. A. Flavell, R. J. Noelle, N. Gerdes, E. A. Biessen, M. J. Daemen, J. W. Heemskerk, C. Weber and E. Lutgens (2010). "Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis." *Blood* **116**(20): 4317-4327.
- Lindemann, S. and M. Gawaz (2007). "The active platelet: translation and protein synthesis in an anucleate cell." *Semin Thromb Hemost* **33**(2): 144-150.
- Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler and J. A. Bluestone (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." *J Exp Med* **203**(7): 1701-1711.
- Lord, J. M., M. J. Midwinter, Y. F. Chen, A. Belli, K. Brohi, E. J. Kovacs, L. Koenderman, P. Kubes and R. J. Lilford (2014). "The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment." *Lancet* **384**(9952): 1455-1465.

Literaturverzeichnis

- Lyons, A., A. Goebel, J. A. Mannick and J. A. Lederer (1999). "Protective effects of early interleukin 10 antagonism on injury-induced immune dysfunction." *Arch Surg* **134**(12): 1317-1323; discussion 1324.
- MacConmara, M. P., A. A. Maung, S. Fujimi, A. M. McKenna, A. Delisle, P. H. Lapchak, S. Rogers, J. A. Lederer and J. A. Mannick (2006). "Increased CD4+ CD25+ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity." *Ann Surg* **244**(4): 514-523.
- Maggi, L., V. Santarlasci, M. Capone, A. Peired, F. Frosali, S. Q. Crome, V. Querci, M. Fambrini, F. Liotta, M. K. Levings, E. Maggi, L. Cosmi, S. Romagnani and F. Annunziato (2010). "CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC." *Eur J Immunol* **40**(8): 2174-2181.
- Malard, F., C. Bossard, E. Brissot, P. Chevallier, T. Guillaume, J. Delaunay, J. F. Mosnier, P. Moreau, M. Gregoire, B. Gaugler and M. Mohty (2014). "Increased Th17/Treg ratio in chronic liver GVHD." *Bone Marrow Transplant* **49**(4): 539-544.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb and C. T. Weaver (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." *Nature* **441**(7090): 231-234.
- Manson, J., E. Cole, H. D. De'Ath, P. Vulliamy, U. Meier, D. Pennington and K. Brohi (2016). "Early changes within the lymphocyte population are associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in trauma patients." *Crit Care* **20**(1): 176.
- Marck, R. E., H. L. Montagne, W. E. Tuinebreijer and R. S. Breederveld (2013). "Time course of thrombocytes in burn patients and its predictive value for outcome." *Burns* **39**(4): 714-722.
- Matarese, G., V. De Rosa and A. La Cava (2008). "Regulatory CD4 T cells: sensing the environment." *Trends Immunol* **29**(1): 12-17.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." *Annu Rev Immunol* **12**: 991-1045.
- McGeachy, M. J., K. S. Bak-Jensen, Y. Chen, C. M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan and D. J. Cua (2007). "TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology." *Nat Immunol* **8**(12): 1390-1397.
- McGuirk, P., S. C. Higgins and K. H. Mills (2010). "The role of regulatory T cells in respiratory infections and allergy and asthma." *Curr Allergy Asthma Rep* **10**(1): 21-28.
- Mommsen, P., M. Frink, H. C. Pape, M. van Griensven, C. Probst, R. Gaulke, C. Krettek and F. Hildebrand (2009). "Elevated systemic IL-18 and neopterin levels are associated with posttraumatic complications among patients with multiple injuries: a prospective cohort study." *Injury* **40**(5): 528-534.
- Moore, F. A., E. E. Moore and R. A. Read (1993). "Postinjury multiple organ failure: role of extrathoracic injury and sepsis in adult respiratory distress syndrome." *New Horiz* **1**(4): 538-549.
- Moore, F. A., A. Sauaia, E. E. Moore, J. B. Haenel, J. M. Burch and D. C. Lezotte (1996). "Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon." *J Trauma* **40**(4): 501-510; discussion 510-502.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Annu Rev Immunol* **7**: 145-173.

Literaturverzeichnis

- Neely, C. J., R. Maile, M. J. Wang, S. Vadlamudi, A. A. Meyer and B. A. Cairns (2011). "Th17 (IFN γ - IL17+) CD4+ T cells generated after burn injury may be a novel cellular mechanism for postburn immunosuppression." *J Trauma* **70**(3): 681-690.
- Novick, D., S. Kim, G. Kaplanski and C. A. Dinarello (2013). "Interleukin-18, more than a Th1 cytokine." *Semin Immunol* **25**(6): 439-448.
- Nowak, E. C., C. T. Weaver, H. Turner, S. Begum-Haque, B. Becher, B. Schreiner, A. J. Coyle, L. H. Kasper and R. J. Noelle (2009). "IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease." *J Exp Med* **206**(8): 1653-1660.
- Nurieva, R., X. O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A. D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S. S. Watowich, A. M. Jetten and C. Dong (2007). "Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells." *Nature* **448**(7152): 480-483.
- O'Suilleabhain, C., S. T. O'Sullivan, J. L. Kelly, J. Lederer, J. A. Mannick and M. L. Rodrick (1996). "Interleukin-12 treatment restores normal resistance to bacterial challenge after burn injury." *Surgery* **120**(2): 290-296.
- Palabrica, T., R. Lobb, B. C. Furie, M. Aronovitz, C. Benjamin, Y. M. Hsu, S. A. Sajer and B. Furie (1992). "Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets." *Nature* **359**(6398): 848-851.
- Pape, H. C., D. Rixen, J. Morley, E. E. Husebye, M. Mueller, C. Dumont, A. Gruner, H. J. Oestern, M. Bayeff-Filoff, C. Garving, D. Pardini, M. van Griensven, C. Krettek, P. Giannoudis and E. S. Group (2007). "Impact of the method of initial stabilization for femoral shaft fractures in patients with multiple injuries at risk for complications (borderline patients)." *Ann Surg* **246**(3): 491-499; discussion 499-501.
- Papp, K. A., K. Reich, C. Paul, A. Blauvelt, W. Baran, C. Bolduc, D. Toth, R. G. Langley, J. Cather, A. B. Gottlieb, D. Thaci, J. G. Krueger, C. B. Russell, C. E. Milmont, J. Li, P. A. Klekotka, G. Kricorian and A. Nirula (2016). "A prospective phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis." *Br J Dermatol* **175**(2): 273-286.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." *Nat Immunol* **6**(11): 1133-1141.
- Pfeifer, R., I. S. Tarkin, B. Rocos and H. C. Pape (2009). "Patterns of mortality and causes of death in polytrauma patients--has anything changed?" *Injury* **40**(9): 907-911.
- Ramsey, M. T., T. C. Fabian, C. P. Shahan, J. P. Sharpe, S. E. Mabry, J. A. Weinberg, M. A. Croce and L. K. Jennings (2016). "A prospective study of platelet function in trauma patients." *J Trauma Acute Care Surg* **80**(5): 726-732; discussion 732-723.
- Rito, D. C., L. T. Viehl, P. M. Buchanan, S. Haridas and J. M. Koenig (2017). "Augmented Th17-type immune responses in preterm neonates exposed to histologic chorioamnionitis." *Pediatr Res* **81**(4): 639-645.
- Rixen, D., E. Steinhausen, S. Sauerland, R. Lefering, M. G. Maegele, B. Bouillon, G. Grass, E. A. M. Neugebauer and G. and members of the Damage Control Study (2016). "Randomized, controlled, two-arm, interventional, multicenter study on risk-adapted damage control orthopedic surgery of femur shaft fractures in multiple-trauma patients." *Trials* **17**: 47.
- Rozenfeld, M., I. Radomislensky, L. Freedman, A. Givon, I. Novikov and K. Peleg (2014). "ISS groups: are we speaking the same language?" *Inj Prev* **20**(5): 330-335.

Literaturverzeichnis

- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-1164.
- Salim, A., P. Hadjizacharia, J. DuBose, L. Kobayashi, K. Inaba, L. S. Chan and D. R. Margulies (2009). "What is the significance of thrombocytosis in patients with trauma?" *J Trauma* **66**(5): 1349-1354.
- Scaffidi, P., T. Misteli and M. E. Bianchi (2002). "Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation." *Nature* **418**(6894): 191-195.
- Schmitt, V., L. Rink and P. Uciechowski (2013). "The Th17/Treg balance is disturbed during aging." *Exp Gerontol* **48**(12): 1379-1386.
- Schoenborn, J. R. and C. B. Wilson (2007). "Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses." *Adv Immunol* **96**: 41-101.
- Segal, B. M., C. S. Constantinescu, A. Raychaudhuri, L. Kim, R. Fidelus-Gort, L. H. Kasper and M. S. I. Ustekinumab (2008). "Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study." *Lancet Neurol* **7**(9): 796-804.
- Semple, J. W., J. E. Italiano, Jr. and J. Freedman (2011). "Platelets and the immune continuum." *Nat Rev Immunol* **11**(4): 264-274.
- Serve, R., R. Sturm, L. Schimunek, P. Stormann, D. Heftrig, M. P. J. Teuben, E. Oppermann, K. Horst, R. Pfeifer, T. P. Simon, Y. Kalbas, H. C. Pape, F. Hildebrand, I. Marzi and B. Relja (2018). "Comparative Analysis of the Regulatory T Cells Dynamics in Peripheral Blood in Human and Porcine Polytrauma." *Front Immunol* **9**: 435.
- Sharma, S., A. L. Dominguez and J. Lustgarten (2006). "High accumulation of T regulatory cells prevents the activation of immune responses in aged animals." *J Immunol* **177**(12): 8348-8355.
- Shevach, E. M. and A. M. Thornton (2014). "tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences." *Immunol Rev* **259**(1): 88-102.
- Sollazzo, D., S. TrabANELLI, A. Curti, N. Vianelli, R. M. Lemoli and L. Catani (2011). "Circulating CD4+CD161+CD196+ Th17 cells are not increased in immune thrombocytopenia." *Haematologica* **96**(4): 632-634.
- Steinhausen, E., R. Lefering, T. Tjardes, E. A. Neugebauer, B. Bouillon, D. Rixen, I. Committee on Emergency Medicine and S. Trauma Care of the German Society for Trauma (2014). "A risk-adapted approach is beneficial in the management of bilateral femoral shaft fractures in multiple trauma patients: an analysis based on the trauma registry of the German Trauma Society." *J Trauma Acute Care Surg* **76**(5): 1288-1293.
- Stoecklein, V. M., A. Osuka and J. A. Lederer (2012). "Trauma equals danger--damage control by the immune system." *J Leukoc Biol* **92**(3): 539-551.
- Stubig, T., P. Mommsen, C. Krettek, C. Probst, M. Frink, C. Zeckey, H. Andruszkow and F. Hildebrand (2010). "[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* **113**(11): 923-930.
- Takagi, N., K. Kawakami, E. Kanno, H. Tanno, A. Takeda, K. Ishii, Y. Imai, Y. Iwakura and M. Tachi (2017). "IL-17A promotes neutrophilic inflammation and disturbs acute wound healing in skin." *Exp Dermatol* **26**(2): 137-144.

Literaturverzeichnis

- Theusinger, O. M., J. Nurnberg, L. M. Asmis, B. Seifert and D. R. Spahn (2010). "Rotation thromboelastometry (ROTEM) stability and reproducibility over time." *Eur J Cardiothorac Surg* **37**(3): 677-683.
- Tormene, D., V. Ferri, S. Carraro and P. Simioni (2011). "Gender and the risk of venous thromboembolism." *Semin Thromb Hemost* **37**(3): 193-198.
- Van Gent, J. M., R. Y. Calvo, A. L. Zander, E. J. Olson, C. B. Sise, M. J. Sise and S. R. Shackford (2017). "Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism after traumatic injury: A competing risks analysis." *J Trauma Acute Care Surg* **83**(6): 1154-1160.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley and B. Stockinger (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." *Immunity* **24**(2): 179-189.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, R. A. Flavell and B. Stockinger (2006). "Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease." *Nat Immunol* **7**(11): 1151-1156.
- Vignali, D. A., L. W. Collison and C. J. Workman (2008). "How regulatory T cells work." *Nat Rev Immunol* **8**(7): 523-532.
- Voo, K. S., Y. H. Wang, F. R. Santori, C. Boggiano, Y. H. Wang, K. Arima, L. Bover, S. Hanabuchi, J. Khalili, E. Marinova, B. Zheng, D. R. Littman and Y. J. Liu (2009). "Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(12): 4793-4798.
- Welch, E. L., M. G. Crooks and S. P. Hart (2018). "Agreement between blood draw techniques for assessing platelet activation by flow cytometry." *Platelets*: 1-5.
- White, N. J. (2013). "Mechanisms of trauma-induced coagulopathy." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2013**: 660-663.
- Wilke, C. M., K. Bishop, D. Fox and W. Zou (2011). "Deciphering the role of Th17 cells in human disease." *Trends Immunol* **32**(12): 603-611.
- Woo, E. Y., C. S. Chu, T. J. Goletz, K. Schlienger, H. Yeh, G. Coukos, S. C. Rubin, L. R. Kaiser and C. H. June (2001). "Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer." *Cancer Res* **61**(12): 4766-4772.
- Wood, K. J. (2011). "Regulatory T cells in transplantation." *Transplant Proc* **43**(6): 2135-2136.
- Wutzler, S., T. Lustenberger, B. Relja, M. Lehnert and I. Marzi (2013). "[Pathophysiology of multiple trauma : intensive care medicine and timing of treatment]." *Chirurg* **84**(9): 753-758.
- Yang, X. O., A. D. Panopoulos, R. Nurieva, S. H. Chang, D. Wang, S. S. Watowich and C. Dong (2007). "STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells." *J Biol Chem* **282**(13): 9358-9363.
- Yang, X. O., B. P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H. S. Kang, Y. Chung, L. Ma, B. Shah, A. D. Panopoulos, K. S. Schluns, S. S. Watowich, Q. Tian, A. M. Jetten and C. Dong (2008). "T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma." *Immunity* **28**(1): 29-39.

Literaturverzeichnis

Yao, Z., W. C. Fanslow, M. F. Seldin, A. M. Rousseau, S. L. Painter, M. R. Comeau, J. I. Cohen and M. K. Spriggs (1995). "Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor." *Immunity* **3**(6): 811-821.

Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J. J. Peschon and J. K. Kolls (2001). "Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense." *JExpMed* **194**(4): 519-527.

Zacher, M. T., K. G. Kanz, M. Hanschen, S. Haberle, M. van Griensven, R. Lefering, V. Buhren, P. Biberthaler, S. Huber-Wagner and D. G. U. TraumaRegister (2015). "Association between volume of severely injured patients and mortality in German trauma hospitals." *Br J Surg* **102**(10): 1213-1219.

Zhang, J., D. Ma, X. Zhu, X. Qu, C. Ji and M. Hou (2009). "Elevated profile of Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with immune thrombocytopenic purpura." *Haematologica* **94**(9): 1326-1329.

Zhang, Q., M. Raouf, Y. Chen, Y. Sumi, T. Sursal, W. Junger, K. Brohi, K. Itagaki and C. J. Hauser (2010). "Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury." *Nature* **464**(7285): 104-107.

Zhou, L., Ivanov, II, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D. E. Levy, W. J. Leonard and D. R. Littman (2007). "IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways." *Nat Immunol* **8**(9): 967-974.

Zielinski, C. E., F. Mele, D. Aschenbrenner, D. Jarrossay, F. Ronchi, M. Gattorno, S. Monticelli, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2012). "Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta." *Nature* **484**(7395): 514-518.

Danksagung

10 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn PD Dr. med. Marc Hanschen für das äußerst spannende Dissertationsthema und die exzellente Betreuung meiner Promotion.

Herrn Professor Biberthaler danke ich für die Ermöglichung der Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar und die Betreuung der Arbeit.

Bei Herrn Professor Huber-Wagner bedanke ich mich für das Mentoring meiner Dissertation.

Herrn Professor van Griensven danke ich für die freundliche Aufnahme in die Experimentelle Unfallchirurgie und sein stets offenes Ohr für meine zahlreichen Fragen während der Dissertation.

Außerdem danke ich dem Team der Experimentellen Unfallchirurgie, insbesondere Herrn Fritz Seidl und Frau Marina Unger.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung.