

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Experimentelle Unfallchirurgie

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar

## Teilautomatisierte Migrationsmessung neutrophiler Granulozyten

Eine Pilotstudie an Mono- und Polytraumapatienten zur Testung eines  
neuen teilautomatisierten Zellulosemembranmesssystems

Paul Delker

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende/-r der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Martijn van Griensven

2. apl. Prof. Dr. Katharina S. Götze

Die Dissertation wurde am 09.01.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.07.2019 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die neutrophilen Granulozyten .....	3
1.1.1 Morphogenese .....	3
1.1.2 Morphologie und Funktion.....	4
1.1.3 Bewegungen im Leben von neutrophilen Granulozyten.....	5
1.1.4 Priming.....	7
1.2 Migrationsmessung .....	9
1.2.1 Methode nach Egger.....	9
1.2.2 Chemoattraktant Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin .....	11
1.3 Monotrauma .....	12
1.4 Polytrauma .....	13
1.4.1 Trauma Scores .....	13
1.4.2 Labor- und Entzündungsparameter .....	14
1.5 Wissenschaftliche Fragestellungen .....	16
<b>2 Methoden und Materialien.....</b>	<b>17</b>
2.1 Studiendesign.....	17
2.1.1 Ethik.....	17
2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien.....	17
2.1.3 Messzeitpunkte .....	19
2.1.4 Patientenkollektiv .....	19
2.2 Versuchsablauf und Materialien .....	20
2.2.1 Lösungen und Verbrauchsmaterialien .....	20
2.2.2 Blutentnahme.....	21

2.2.3	Device .....	21
2.2.4	Immunstatus Inkubator .....	22
2.2.5	Reader .....	24
2.2.6	Bildauswertung .....	27
2.2.7	Migrationsparameter .....	28
2.2.8	Bestimmung der Vergleichsparameter.....	28
2.3	Statistische Auswertung .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
3.1	PMN-Migration.....	30
3.1.1	Adhäsionsindex.....	30
3.1.2	Totaler Migrationsindex.....	32
3.1.3	Totaler Migrationsindex alternativ .....	33
3.1.4	Distribution Charakteristik 50 .....	34
3.2	Laborparameter .....	36
3.2.1	Leukozyten- und PMN-Anzahl .....	36
3.2.2	C-reaktives Protein .....	37
3.2.3	Procalcitonin .....	38
3.2.4	Interleukin-6 .....	39
3.2.5	Interleukin-10 .....	40
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>41</b>
4.1	Einfluss von fMLP auf die PMN-Migration .....	41
4.2	Einfluss von Trauma auf die PMN-Migration .....	43
4.3	Vergleich von Labor- und Migrationsparametern.....	45
4.4	Kritik am Versuchsaufbau und Studiendesign .....	47
4.5	Schlussfolgerungen .....	49
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>58</b>

7.1	Ergebnisse tabellarisch .....	58
7.1.1	Polytrauma.....	58
7.1.2	Monotrauma.....	60
	<b>Danksagung .....</b>	<b>VIII</b>

# Abkürzungsverzeichnis

CARS	<i>Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome</i>
CHT	<i>Chemotaxis Messung</i>
CRP	<i>C-reaktives Protein</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DC	<i>Distribution Charakteristik, Distribution Charakteristik</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EZM	<i>Extrazellulären Matrix</i>
fMLP	<i>Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating Factor</i>
HBSS	<i>Hank´s Balanced Salt Solution</i>
IE	<i>Internationale Einheit</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
ISS	<i>Injury Severity Score</i>
LED	<i>Light-emitting diode</i>
MODS	<i>multi organ dysfunction syndrome</i>
MW	<i>Mittelwert</i>
NET	<i>neutrophile extracellular traps</i>
NK-Zellen	<i>Natürliche Killerzellen</i>
PCT	<i>Procalcitonin</i>
PTI	<i>post-traumatic immunosuppression</i>
RND	<i>Randomisierte Messung</i>
ROS	<i>reaktive Oxygen-Spezies</i>
SIRS	<i>Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom</i>
STD	<i>Standardabweichung</i>
TAN	<i>tumorassoziierte Neutrophile</i>
TEP	<i>Totalendoprothese</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
USB	<i>Universal Serial Bus</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
X GmbH	<i>Pseudonym für das kooperierende Unternehmen, welches den in der Arbeit verwendeten Versuchsaufbau bereitstellte.</i>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Migrationsrichtung durch Priorisierung der Signalwege.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Kammer von Egger .....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Device .....	21
Abbildung 4: Aufbau des Immunstatus Inkubators .....	23
Abbildung 5: Aufbau des Readers .....	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Bildaufnahme durch den Reader.....	25
Abbildung 7: Bildschirmanzeige Reader .....	26
Abbildung 8: Mittelwerte des Adhäsionsindex der Polytraumapatienten .....	30
Abbildung 9: Mittelwerte von TMIalt und TMI der Polytraumapatienten.....	33
Abbildung 10: Mittelwerte des DC50 der Polytraumapatienten.....	34
Abbildung 11: Mittelwerte der Leukozyten- und neutrophilen Granulozyten- (PMN) Anzahl der Polytraumapatienten .....	36
Abbildung 12: Mittelwerte der C-reaktiven Protein (CRP) Messung der Polytraumapatienten .....	37
Abbildung 13: Mittelwerte der Procalcitonin (PCT) Bestimmung der Polytraumapatienten .....	38
Abbildung 14: Mittelwerte der Interleukin-6 (IL-6) Bestimmung der Polytraumapatienten .....	39
Abbildung 15: Mittelwerte der Interleukin-10 (IL-10) Bestimmung der Polytraumapatienten .....	40
Abbildung 16: Artefakte in Form von Lufteinschlüssen im Immersionsöl.....	48

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verbrauchsmaterialien .....	20
Tabelle 2:	Migrationsparameter CHT- und RND-Messung Polytraumapatienten Tag 1 und Tag 2.....	58
Tabelle 3:	Migrationsparameter CHT- und RND-Messung Polytraumapatienten Tag 4 und Tag 6.....	58
Tabelle 4:	Migrationsparameter CHT- und RND-Messung Polytraumapatienten Tag 8 und Tag 10.....	58
Tabelle 5:	Migrationsparameter CHT- und RND-Messung Polytraumapatienten Tag 12 und Tag 14.....	59
Tabelle 6:	Laborwerte Polytraumapatienten Tag 1 bis Tag 6.....	59
Tabelle 7:	Laborwerte Polytraumapatienten Tag 8 bis Tag 14.....	59
Tabelle 8:	Migrationsparameter CHT- und RND-Messung Monotraumapatienten Tag 0 und Tag 1 .....	60
Tabelle 9:	Migrationsparameter CHT- und RND-Messung Monotraumapatienten Tag 2 und Tag 4.....	60
Tabelle 10:	Migrationsparameter CHT- und RND-Messung Monotraumapatienten Tag 0 bis Tag 4 .....	60

# 1 Einleitung

Die Professionalisierung der Unfall- und Notfallmedizin im 20. und 21. Jahrhundert hat zu einer sukzessiven Senkung der Mortalität und Morbidität nach Trauma geführt. Ursachen hierfür sind sowohl ein Zugewinn an Wissen in der Therapie, als auch viele Errungenschaften in der Bildgebung und Labordiagnostik.

Die Gruppe der Polytraumapatienten stellt aufgrund der größten Verletzungsschwere und gleichzeitig höchsten Mortalität ein besonders anspruchsvolles Patientenkollektiv in der Unfallchirurgie dar. Im Jahr 2015 waren im Jahresbericht der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie 17.630 Patienten mit einem Injury Severity Score (ISS) > 16 aufgeführt. Von diesen sind ca. 9 % an den Unfallfolgen im Akutkrankenhaus verstorben (Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie, 2016). Dabei ist das Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS), in der späten posttraumatischen Phase, eine der Haupttodesursachen (Frohlich et al., 2014). Die Entstehung eines MODS hat multifaktorielle Ursachen. Neben direkter Organschädigung durch das Trauma spielen immunologische Fehlregulationen eine wichtige Rolle. Bei der Fehlregulation unterscheidet man zwischen Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) und Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome (CARS). Für das SIRS ist eine massenhafte Ausschüttung von proinflammatorischen Substanzen und eine damit einhergehende Überaktivierung der neutrophilen Granulozyten, englisch polymorphonuclear Leukocytes (PMN), die Ursache. Eine hierzu gegensätzliche Übersteigerung der körpereigenen inhibitorischen Mechanismen führt zum CARS, wodurch wiederum eine verzögerte Wundheilung und eine gesteigerte Infektanfälligkeit bedingt ist. Trotz der vermeintlichen Gegensätzlichkeit können SIRS und CARS gleichzeitig auftreten (Binkowska, Michalak, & Slotwinski, 2015).

Neben der klinischen Einschätzung sind Laborparameter für die Evaluation des Immunstatus entscheidend. In der klinischen Routine finden derzeit vor allem Interleukin-6 (IL-6), C-reaktives Protein (CRP) und Procalcitonin (PCT) Verwendung. Außerdem werden Parameter wie z. B. Leberenzyme oder Retentionsparameter zur Einschätzung einzelner Organe herangezogen. In der Wissenschaft werden viele



verschiedene weitere Laborparameter wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-8 oder IL-10 diskutiert (van Griensven, 2014). Ein entscheidender Nachteil beim Herausgreifen einzelner Zytokine ist, dass sie immer nur einen kleinen Bruchteil des immunologischen Signalfeuerwerks abbilden können.

Die Annahme, dass neutrophile Granulozyten eine zentrale Rolle beim MODS spielen, macht sie interessant für die Ableitung eines diagnostischen Parameters. In der heutigen klinischen Praxis werden nur die Leukozytenzahl oder im Differenzialblutbild die Anteile der einzelnen Granulozyten-Fraktionen bestimmt. Eine Aussage über die Funktionsfähigkeit oder Aktivierbarkeit kann bis dato nur sehr eingeschränkt getroffen werden (Lam, Leenen, van Solinge, Hietbrink, & Huisman, 2012).

PMN Funktionen sind Phagozytose, Exozytose von Granula, das Binden von Mikroorganismen mittels neutrophilen extrazellulären Traps (NET) und die Kommunikation mit anderen Zellen. Zur Funktionserfüllung müssen die im Blutkreislauf befindlichen PMN an den Ort der Funktionsausübung gelangen. Die Wanderung vom Blutstrom bis zum Zielort im Gewebe, geschieht durch ein Zusammenspiel einer Vielzahl von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen. Sie wird in mehrere Phasen vom Entlangrollen bis zur Migration durch die extrazelluläre Matrix unterteilt. Wie PMN auf Umgebungssignale reagieren, also wie leicht sie mit dem „Rollen“ beginnen, ist abhängig vom Priming, was den Aktivierbarkeitsgrad beschreibt. Je stärker der Granulozyt geprimed ist, umso sensibler reagiert er auf extrazelluläre Signale wie Selektine und Chemokine (Gerd Egger, 2005).

Die Grundannahme dieser Doktorarbeit ist, dass durch die Messung der PMN-Migration auf den Primingzustand der PMN rückgeschlossen werden kann. Ein stärker geprimter neutrophiler Granulozyt wandert, unter gleichen Bedingungen, tiefer in ein Gewebe ein als ein weniger stark geprimter PMN. Dieser Rückschluss könnte eine genauere Aussage über den Immunstatus des Patienten ermöglichen. Ein schnelleres Erkennen einer Überfunktion beim SIRS und einer Unterfunktion beim CARS würde einen diagnostischen Vorteil in der Behandlung von Polytraumapatienten erbringen. Dies könnte durch eine schnellere Therapie zur Senkung der Morbidität und Mortalität beitragen. Derzeitige Messmethoden, wie z. B. der Boyden-Kammer, sind zeit- und kostenaufwendig.

Die Entwicklung eines anwenderfreundlichen Messsystems ist für die Erforschung der PMN-Migration als diagnostischen Marker sicherlich förderlich. Diese Doktorarbeit stellt einen Teil des „proof-of-principles“ der klinischen Anwendbarkeit eines vollautomatischen Analysesystems dar. Das System wird durch ein aufstrebendes Unternehmen, welches sich auf innovative Diagnostik-Lösungen spezialisiert hat, entwickelt. Auf Wunsch des Unternehmens wird dieses im Folgenden anonymisiert und in dieser Arbeit mit dem Pseudonym „X GmbH“ bezeichnet.

### 1.1 Die neutrophilen Granulozyten

Wie Deufel et al. (2013) ausführen, stellen Leukozyten den zellulären Anteil des Immunsystems im Blut dar. Sie werden anhand der Abstammung in eine lymphatische und myeloische Reihe unterteilt. Zu den Lymphozyten gehören die B- und T-Lymphozyten sowie die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Die myeloiden Zellen sind Monozyten, dendritische Zellen, Mastzellen und Granulozyten. Granulozyten stellen den größten Teil der Leukozyten dar, worunter die neutrophilen Granulozyten mit 40-75 % die größte Fraktion sind. Die eosinophilen Granulozyten machen ca. 1-6 % aus und die basophilen Granulozyten sind mit 0-1 % die kleinste Fraktion (Deufel et al., 2013).

#### 1.1.1 Morphogenese

Die neutrophilen Granulozyten durchlaufen in ihrem Lebenszyklus drei markante Aufenthaltsorte: das Knochenmark als Ort der Bildung, das Blut dient dem Transport sowie der Speicherung, im Interstitium schließlich finden Funktionsausübung sowie Apoptose statt. In 24 Stunden werden etwa ein bis zwei  $\times 10^{11}$  Zellen im Knochenmark gebildet (Lieschke et al., 1994).

Im Knochenmark befinden sich pluripotente Stammzellen, welche sich zu myelopoetische Stammzellen, Vorläuferzellen von Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten, entwickeln. Diese myelopoetischen Stammzellen entwickeln sich unter dem Einfluss von Granulocytecolony stimulating Factor (G-CSF), IL-3 und IL-6, über Zwischenschritte weiter zu Myeloblasten. Ab dem

Myeloblast-Stadium beginnt neben der Vermehrung und Reifung auch die Bildung der Granula. Dies setzt sich über zwei weitere Entwicklungsschritte, dem Promyelozyten- und dem Myelozyten-Stadium, fort. Ab dem Metamyelozyten-Stadium beginnt die Bewegungsfähigkeit der Zellen, so dass abschließend der stabkernige Granulozyt zum segmentkernigen Granulozyten im peripheren Blut heranreift. Die Vermehrung und Differenzierung dauert unter normalen Bedingungen sechs Tage, die Ausreifung und Speicherung weitere sechs Tage. Die Dauer der Entwicklung und Speicherung ist vom immunologischen Status abhängig. So können sich bei einem akuten Infektionsgeschehen beide Phasen um mehrere Tage verkürzen (Deufel et al., 2013; Gerd Egger, 2005).

### 1.1.2 Morphologie und Funktion

PMN sind im Ruhezustand kugelförmige Zellen, welche einen Durchmesser von 9-15  $\mu\text{m}$  aufweisen. Sie besitzen eine Zellmembran, einen Zellkern mit bis zu fünf untereinander verbundenen Lappen, wenig Mitochondrien, einen Golgi-Apparat sowie ein endoplasmatisches Retikulum. Außerdem besitzen sie eine schwach färbbare Granula, wodurch eine histologische Abgrenzung zu den eosinophilen und basophilen Granulozyten möglich ist.

Die Granula werden in Untergruppen gegliedert. Die primären oder auch azurophilen Granula enthalten die Myeloperoxidasen, Elastasen sowie weitere toxische Enzyme. Die sekundären Granula, auch spezifische Granula genannt, enthalten unter anderem Matrix-Metalloproteasen (Borregaard & Cowland, 1997; Lacy, 2006).

Die PMN sind als Phagozyten an der Immunabwehr beteiligt. Sie wandern vom Blut durch Endothel und Basalmembran und später im Gewebe zum Zielort. Dort versuchen die PMN mittels Phagozytose, Exozytose von toxischer Granula und dem netzartigen Auswerfen ihrer Desoxyribonukleinsäure (DNA), aus dem Zellkern eingedrungene Mikroorganismen zu fangen und abzutöten.

Neben der Phagozytenfunktion scheinen die neutrophilen Granulozyten noch weitere, weniger erforschte Funktionen, zu besitzen. Beispielsweise wirken sie in der Pathogenese verschiedenster Tumor- und Autoimmunerkrankungen mit. Hierbei kommunizieren sogenannte tumorassoziierte Neutrophile mit Tumorzellen (TAN). Es wird angenommen, dass die TANs eine wichtige Rolle beim Voranschreiten von

Tumorerkrankungen in Hinblick auf Angiogenese, Gewebsinvasion sowie Metastasierung einnehmen (Moses & Brandau, 2016).

### 1.1.3 Bewegungen im Leben von neutrophilen Granulozyten

Die Freisetzung der PMN aus den Sinusoiden im Knochenmark leitet die Blutphase im Leben der Granulozyten ein. Die Freisetzung erfolgt durch eine Vielzahl stimulierender Zytokinen und Faktoren wie C5a, Leukotrien B4 oder auch IL-8. Bei normalem Immunstatus befinden sich die Granulozyten ca. sechs bis acht Stunden in der Blutbahn, bevor sie in Leber, Milz oder Knochenmark abgebaut werden. Ein Teil der Zellen befindet sich randständig an der Gefäßwand, ein weiterer Teil mittig im Blutstrom. Wenn eine immunologische Situation vorliegt, welche PMN bedarf, verlassen diese die Blutbahn über hochendotheliale Venulen und migrieren zum Wirkungsort (Furze & Rankin, 2008; Summers et al., 2010; Terashima, English, Hogg, & van Eeden, 1998).

Das Verlassen der Blutbahn wird durch eine Marginalisierung der PMN an die Gefäßwand eingeleitet. Die PMN beginnen mit dem Rollen entlang der Gefäßwand. Dies wird durch schwache Bindungen mittels E- und P-Selektine auf den Endothelzellen und L-Selektine auf den PMN eingeleitet. L-Selektine sind auf den PMN konstant exprimiert, wohingegen die Selektine auf den Endothelzellen nur bei Bedarf ausgebildet werden. Makrophagen, welche im Gewebe Mikroben verdauen, schütten Zytokine wie IL-1 und TNF- $\alpha$  aus und regen so die Endothelzellen an, Selektine verstärkt zu exprimieren sowie Zytokine an der ins Gefäßlumen ragenden Zelloberfläche zu binden. Diese Zytokine wiederum aktivieren Integrine auf der PMN-Oberfläche und formieren eine feste Bindung mit der Endothelzelle. Dieser Zell-Zell-Kontakt wird durch vaskuläre Zelladhäsionsmoleküle (VCAM) und interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM) weiter stabilisiert (W. A. Muller, 2003).

Nach der stabilen Bindung können die PMN auf zwei Wegen die epitheliale Barriere überwinden. Es wird der parazelluläre Weg, bei welchem interepitheliale Verbindungen und Teile der „Extrazellulären Matrix“ (EZM) durch Proteasen gespalten werden, vom transzellulären Weg unterschieden. Bei Letzterem wandert

der Granulozyt durch die Epithelzelle hindurch und durchdringt anschließend die Basalmembran (Gong et al., 2017; William A. Muller, 2016).

Die zielgerichtete Wanderung im Gewebe, Chemotaxis genannt, erfolgt nun durch das stetige Ausbilden von Pseudopodien und dem Nachziehen der Zelle in Richtung des Liganden-Gradienten. Die PMN können diesen durch unterschiedliche Konzentrationen von Rezeptor-Liganden-Bindungen an der Zellmembran erkennen (Levine & Rappel, 2013). Die Liganden können in Chemoattraktante und Chemorepellente eingeteilt werden. Auf eine höhere Konzentration von Attraktanten bewegen sich PMN zu. Auf Chemorepellenten reagieren PMN genau entgegengesetzt und bewegen sich von der höheren Konzentration weg (M. J. V. White, China, Pilling, & Gomer, 2018).

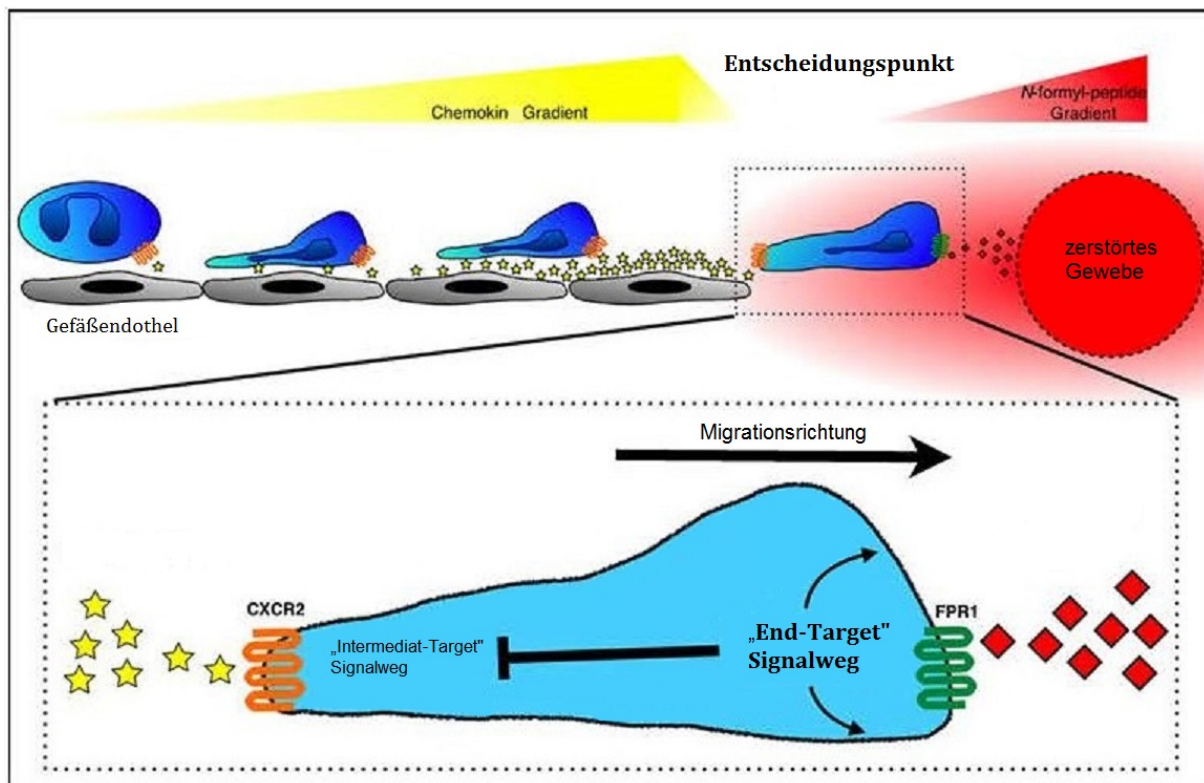


Abbildung 1: Migrationsrichtung durch Priorisierung der Signalwege

Adhäsion der neutrophilen Granulozyten am Gefäßendothel CXC-Rezeptorvermittelt. Entscheidung der Migrationsrichtung im Gewebe durch Priorisierung von FP-Rezeptorsignalen und Hemmung von Intermediate-Target Signalwegen (Abbildung modifiziert nach: McDonald & Kubes, 2011).

Die Liganden-Rezeptoren auf der PMN-Oberfläche können in vier Klassen eingeteilt werden. Unterschieden werden Chemokin-Rezeptoren (CXC-R1, CXC-R2, CXC-R4 und CC-R2<sup>a</sup>), Komplement-Rezeptoren (C5a-R und C3a-R), Lipid-Rezeptoren (BLT1

und PAF-R) und Formyl-Peptid-Rezeptoren (FPR1 und FPR2). Um nach der Diapedese in Richtung des Zielortes und nicht zurück zum Endothel zu wandern, muss der PMN entscheiden, welcher Liganden-Konzentrationsgradient priorisiert werden soll. Dabei haben die Formyl-Peptide-Rezeptoren einen stärkeren Einfluss auf die Migrationsrichtung als die Chemokin-Rezeptoren (McDonald & Kubes, 2011). Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) stellt ein sogenanntes „End-Target“ dar, grafisch dargestellt in Abbildung 1 (McDonald & Kubes, 2011).

### 1.1.4 Priming

Der Begriff Priming ist unscharf definiert. G. Egger, Mitterhammer, and Smolle (2004) haben die Grundlagen für das in dieser Arbeit angewendete Migrationsmessverfahren geschaffen, weshalb hier zunächst auf deren Verständnis eingegangen werden soll. Demnach befinden sich die PMN unter physiologischen Bedingungen in der Blutbahn in einem Grundzustand des normalen Priming. Das Priming beschreibt den Grad der Aktivierbarkeit. Ist ein PMN stärker geprimed, lässt er sich leichter aktivieren und beginnt eher mit dem Entlangrollen und Durchwandern der Gefäßwand. Der Primingzustand kann prinzipiell positiv sowie auch negativ gegenüber dem Normalzustand sein. Zeitlich wird zwischen kurzzeitigem Priming, welches in Sekunden bis Minuten einsetzt und langfristigem Priming, welches die PMN innerhalb mehrerer Stunden oder Tage aktiviert, unterschieden. Ersteres wird durch eine Bindung von Liganden oder eine Veränderung von Oberflächenmolekülen, wie der Integrine oder Selektine, hervorgerufen, wohingegen der längere Verlauf auf einer Neusynthese von Enzymen basiert, womit die zeitliche Latenz zu erklären ist. Auslösende Faktoren können Konzentrationsveränderungen von Liganden, aber auch mechanische, osmotische oder thermische Reize sein. So kann sich z. B. eine immunsupprimierende Therapie negativ primend auswirken (Gerd Egger, 2005; Gerd Egger, Kukovetz, Hayn, & Fabjan, 1997).

Miralda, Uriarte, and McLeish (2017) vertreten die Auffassung, dass Priming nicht als Zwischenzustand der gesteigerten Aktivierbarkeit gesehen werden sollte, sondern vielmehr eine Teilaktivierung der PMN darstellt. Priming ist demnach nicht nur eine Vorbereitung auf einen zweiten Stimulus, sondern stellt durch die gesteigerte Rezeptorexpression, die Steigerung der metabolischen Aktivität oder der Lebensdauer selbst, eine gewisse Aktivierung dar (Miralda et al., 2017).



## 1.2 Migrationsmessung

Das Priming der Granulozyten ist nicht direkt messbar, weshalb sich ein Rückschluss über eine Granulozytenfunktion anbietet. So kann zum Beispiel die Bildung von reaktiven Oxygen-Spezies (ROS) oder die Quantität der NET-DNA gemessen werden. In dieser Arbeit wird die Migration gemessen (El-Benna et al., 2016; McIlroy et al., 2014).

Die ersten Migrationsbewegungen von Leukozyten wurden laut Wilkinson von dem deutschen Augenarzt Dr. T. Leber im Jahr 1888 beschrieben (Wilkinson, 1998). Seitdem wurde die Migration vor allem mikroskopisch beobachtet. Erst mit Boyden (1962) und dem von ihm beschriebenen Filter Assay, wurde ein Versuchsaufbau veröffentlicht, welcher Migration messbar machen sollte. Boyden verwendete hierfür ein Zweikammersystem, bei welchem eine Plexiglaskammer durch eine Zellulose-Ester-Membran getrennt wurde. In der unteren Kammer befindet sich die zu untersuchende Substanz und in der oberen die Zellsuspension. Nach mehrstündiger Inkubation wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop. Hierfür wurde die Membran durch Xylol transparent gemacht und anschließend die Leukozyten in den verschiedenen Eindringtiefen gezählt (Boyden, 1962).

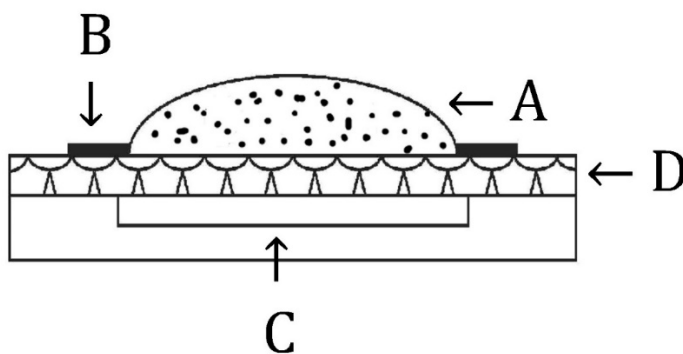
### 1.2.1 Methode nach Egger

Nach der Publikation der Zweikammermethode durch Boyden versuchten verschiedene Autoren eigene Ansätze zu entwickeln. So implementierten zum Beispiel Naidu and Newbould (1974) ein Zweikammersystem, bei welchem Granulozyten die Migrationsmembran gänzlich durchwanderten (Naidu & Newbould, 1974). Die PMN konnten in der zweiten Kammer gezählt und somit ein Index errechnet werden. Andere Autoren experimentierten mit dem Membranmaterial und verwendeten z. B. Polycarbonat-Membranen mit kleineren Poren welche die Migration genauer beschreiben sollten (Bignold, 1987). Andere versuchten Mehrkammersysteme zu entwickeln, wie Falk, Goodwin, and Leonard (1980), welche an einem 48-Well Aufbau arbeiteten (Falk et al., 1980).



Das in dieser Arbeit verwendete System basiert auf den Grundlagenarbeiten von G. Egger et al. (2004), welche verschiedene Versionen mit verschiedenen unterschiedlichen Vollblutsuspensionen sowie auch Lockstoffen und Versuchsaufbauten, gegeneinander testete.

Die X GmbH hat, auf Grundlage von der in Abbildung 2 visualisierten Version G. Egger et al. (2004), einen teilautomatisierten Versuchsaufbau entwickelt. Die Besonderheit an diesem Aufbau ist, dass die Testsubstanz in fester Form eingebracht und die PMN als Vollblutsuspension aufgebracht werden. Als Lockstoff wird in dieser Arbeit fMLP verwendet. Zudem kann das Device, ohne zerlegt werden zu müssen, mit einem Reader direkt ausgewertet werden (G. Egger et al., 2004). Durch das Aufbringen einer Vollblutsuspension muss keine Isolation der PMN erfolgen und ein mögliches in vitro Priming wird so gering wie möglich gehalten (Gerd Egger et al., 1997).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Kammer von Egger**

**A: Vollblutsuspension, B: Begrenzungsring, C: Testsubstanz in fester Form, D: Migrationsfilter in welchen die Zellen hinein migrieren**  
(Abbildung modifiziert nach: G. Egger et al., 2004).

### **1.2.2 Chemoattraktant Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin**

Als Testsubstanz wurde Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), ein bakterielles Protein, verwendet. Formylierte Peptide sind lang bewährte Chemoattraktante und wirken stark anziehend auf PMN (Schiffmann, Corcoran, & Wahl, 1975). Sie werden durch „formyl peptide receptors“ (FPR) auf der Oberfläche der PMN erkannt. Es sind derzeit FPR1 und FPR2 bekannt (Dahlgren, Gabl, Holdfeldt, Winther, & Forsman, 2016; Miralda et al., 2017).

Chemoattraktante können in zwei Subgruppen unterteilt werden. Zum einen in „intermediate-targets“ und zum anderen in „end-targets“. FMLP gehört zur zweiten Gruppe und stellt somit ein übergeordnetes Ziel dar. Muss der PMN sich entscheiden, wird er, wie in Abbildung 1, dem übergeordneten End-target-Gradienten folgen (Heit et al., 2008).

### **1.3 Monotrauma**

Im Rahmen dieser Pilotstudie wird der neue teilautomatisierte Versuchsaufbau an einem auf das Immunsystem gesichert einflussnehmendem Ereignis, einem Trauma, getestet. Dabei wird betrachtet, ob bei einer stärkeren Traumaschwere und damit einhergehend, ein stärkerer Einfluss auf das PMN-Priming und auch ein Unterschied in der PMN-Migration detektiert werden kann.

Ein Monotrauma ist eine singuläre Verletzung einer Körperregion und soll hier das weniger schwere Trauma darstellen. Hierfür wurde die Implantation einer Hüfttotalendoprothese als Monotrauma gewählt. Bei dieser geplanten Operation wird die Haut auf einer Länge von ca. 15 cm eröffnet, durch Faszie und Muskel präpariert, der Femurkopf abgesägt und das Acetabulum passend gefräst. Die Prothese wird in den Schaft und das Acetabulum eingebracht, die Position der Prothese kontrolliert und die einzelnen Gewebeschichten wieder verschlossen.

Durch das standardisierte Vorgehen bei dieser Operationstechnik kann die Traumaschwere als gleichwertig angesehen werden.

## 1.4 Polytrauma

Das Polytrauma ist im Gegensatz zum Monotrauma eine schwerere Verletzung. Sie wird nach Tscherne, als Verletzung von mindestens zwei Körperregionen, welche einzeln oder zusammen potentiell tödlich sind, definiert (Tscherne & Regel, 1997). Zur Objektivierung der Verletzungsschwere werden in der Literatur und Praxis neben der klinischen Einschätzung, Scores und Labormarker verwendet.

### 1.4.1 Trauma Scores

#### **Abbreviated Injury Scale (AIS)**

Der AIS wurde Ende der 60er Jahre entwickelt, um Verletzungen bei Autounfällen besser vergleichen zu können. Über die Jahre ist der AIS mehrfach überarbeitet worden, wobei die Version von 2008 in dieser Doktorarbeit verwendet wird. Der AIS kodiert die Art der Verletzung, wie z. B. eine Fraktur oder Blutung, in Schweregrade. Der Schweregrad wird in keine Verletzung - 0, geringe - 1, mäßig - 2, schwer - 3, bedeutend (überleben wahrscheinlich) - 4, kritisch (überleben unsicher) - 5 und nicht überlebbar - 6 eingeteilt (Gennarelli & Wodzin, 2008).

#### **Injury Severity Score (ISS)**

Der ISS wurde auf Basis des AIS 1974 von Baker, O'Neill, Haddon, and Long (1974) entwickelt. Der ISS ermöglicht eine Einschätzung der Verletzungsschwere und Abschätzung der Überlebenschancen von Polytraumapatienten. Dabei werden alle Verletzungen sechs Körperregionen zugeordnet und der AIS jeder Körperregion bestimmt. Die drei Körperregionen mit den höchsten AIS-Werten werden quadriert und addiert. Insgesamt ist ein Maximum von 75 Punkten zu erreichen. Wird eine Region mit 6, also einer nicht überlebaren Verletzung, bewertet, dann wird der ISS automatisch 75. Damit bei einer Verletzung von Polytrauma gesprochen wird, müssen mindestens zwei Körperregionen verletzt sein und mindestens ein ISS von  $> 16$  erreicht werden (Baker et al., 1974).

Die sechs Körperregionen sind Kopf mit Nacken, Gesicht, Brustkorb, Abdomen, Extremitäten mit Becken und als sechste Region das Externe (z. B. Verletzung der Haut oder Hypothermie).

### 1.4.2 Labor- und Entzündungsparameter

Neben der Einschätzung der Traumaschwere mittels Scores, ist die Bewertung des Immunsystems für den behandelnden Arzt essentiell. Auf die, in der klinischen Anwendung häufig verwendeten Laborparameter, soll an dieser Stelle kurz eingegangen werden. Sie dienen gleichzeitig als Vergleichswerte für die Migrationsparameter der PMN in dieser Arbeit.

Eine große Gruppe der in den letzten Jahren etablierten Laborparameter, ist die Gruppe der Zytokine. Unter Zytokinen versteht man Moleküle, welche durch Zellen als Signalmoleküle ausgeschüttet werden und Einfluss auf andere Zellen nehmen. Folgen können Proliferation oder Differenzierung, aber auch Zellaktivierung, Zellformänderung oder Änderungen am Priming von PMN sein. Nach einem schweren Trauma laufen viele Signalreaktionen parallel ab, welche bei übersteigerter proinflammatorischer Reaktion zu einem SIRS und bei zu geringer, zu einem CARS und letztendlich MODS führen können. Einzelne Marker bzw. Laborwerte geben Hinweise auf den immunologischen Zustand. Sie lassen bisher jedoch nur eine begrenzte Abschätzung des wahren Entzündungsgeschehens zu, da nicht zuletzt diverse Signalkaskaden noch nicht entdeckt bzw. verstanden worden sind und daher nur unvollständig durch einzelne Marker abgebildet werden können (Guisasola, Alonso, Bravo, Vaquero, & Chana, 2017; Lausevic, Lausevic, Trbojevic-Stankovic, Krstic, & Stojimirovic, 2008).

#### IL-6 / IL-10

Interleukin-6 und Interleukin-10 sind Zytokine, welche eine zentrale Rolle in der posttraumatischen Immunreaktion spielen. IL-6 wirkt meistens proinflammatorisch und ist ein etablierter Marker in der klinischen Laborbestimmung nach Polytrauma. Ein Zusammenhang zwischen initial hohem posttraumatischen IL-6-Spiegel und der Mortalität ist beschrieben (Cuschieri et al., 2010; Qiao et al., 2017; van Griensven, 2014). IL-10 wirkt antiinflammatorisch und hemmt proinflammatorische Zytokine wie IL-6 oder TNF- $\alpha$ . In den letzten Jahren geht der Trend zur Bestimmung einer IL-6/IL-10-Ratio, welche Mortalitätsrisiken von SIRS und CARS besser beschreiben soll (Sapan et al., 2017).

### **CRP**

Das C-reaktive Protein zählt zu den Akut-Phase-Proteinen. Es wird in der Leber synthetisiert und gilt als ein unspezifischer Entzündungsparameter. Nach Infektion oder Trauma können mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 12 bis 24 Stunden erhöhte Werte im Blut festgestellt werden. Erhöhte CRP-Werte korrelieren mit einer gesteigerten Mortalität und Organdysfunktion bei kritisch kranken Patienten (Lobo et al., 2003).

### **Procalcitonin (PCT)**

PCT ist die Vorstufe des Hormons Calcitonin, welches in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet wird. PCT wird nach Trauma oder Infektion vermutlich in der Leber gebildet und kann einen prognostischen Aufschluss sowie frühzeitig als Hinweis auf das Vorliegen einer Infektion und Sepsis dienen. Da der Anstieg bei einer bakteriellen Infektion höher als bei einer viralen ausfällt, ist PCT im Vergleich zum CRP ein spezifischerer Sepsis-Parameter und kann helfen den Einsatz von Antibiotika besser zu steuern (Ahmed, Soliman, & Samir, 2016; Albrich & Mueller, 2011; Nargis, Ibrahim, & Ahamed, 2014). Bei ausgedehnten Weichteiltraumen kann es jedoch zu erhöhten PCT-Werten ohne Vorliegen einer Sepsis kommen (Hoshino et al., 2017).

### **Immunaktive Zellen**

Die quantitative Bestimmung der Leukozytenzahl ist ein bewährter Parameter, welcher einen Hinweis auf ein akutes entzündliches Geschehen geben kann. Leukozyten werden im Differentialblutbild zudem in Unterfraktionen aufgegliedert, wie z. B. Lymphozyten, Monozyten und die einzelnen Granulozyten-Fraktionen, zu welchen als größte Fraktion die PMN zählen. Ein Leukozytenanstieg gibt Hinweise auf das Vorliegen einer immunologisch fordernden Situation. Durch Trauma, Infektion oder aber autoimmunen entzündlichen Reaktionen, können Leukozyten innerhalb von Stunden steigen und fallen. Dabei ist die Differenzierung zwischen infektiöser Genese und Traumaeinfluss nicht immer eindeutig (Bosch et al., 2018; Mare et al., 2015).

## 1.5 Wissenschaftliche Fragestellungen

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es, den neu entwickelten teilautomatisierten Versuchsaufbau von der X GmbH zur Messung der PMN-Migrationsaktivität, in Form einer Pilotstudie, am Patienten zu testen. Die Teilkomponenten sollen in Zukunft in einem vollautomatisierten Prototyp integriert werden. Zur Testung erstellte die X GmbH, eine multizentrische Pilotstudie, in der die Migrationsaktivität bei Polytrauma, Sepsis und rheumatoider Arthritis untersucht wird. Das Ziel am Standort München war es, einen Teil des Polytrauma-Studienarmes im Rahmen dieser Doktorarbeit zu erheben. Zusätzlich ist das System, durch ein eigens erstelltes Studienprotokoll, an Monotraumapatienten bei einer Hüft-TEP-Implantation getestet worden. Dabei wurden folgende wissenschaftliche Fragestellungen adressiert:

### **Kann ein Einfluss von fMLP auf die PMN-Migration und Adhäsion nachgewiesen werden?**

In die Migration Devices wurden zwei, in zwei der 4 Wells fMLP als Chemoattraktant in fester Form eingebracht. So kann jeder Messzeitpunkt mit und ohne fMLP gemessen werden.

### **Kann mit dem Versuchsaufbau ein Unterschied der PMN-Migration zwischen nicht verletzten und verletzten Patienten festgestellt werden?**

In der multizentrischen Studie hat die X GmbH eine gesunde Vergleichsgruppe an einem anderen Studienzentrum erstellen lassen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine nicht verletzte Vergleichsgruppe, durch die präoperative Messung der Hüft-TEP-Patienten, erstellt.

### **Wie verhält sich die PMN-Migration zu den gängigen Laborparametern?**

Wie verhalten sich Leukozyten- und Granulozytenzahl zur PMN-Migration. Außerdem sollen die Migrationsparameter mit Laborwerten wie CRP, IL-6 und IL-10 verglichen werden.

## 2 Methoden und Materialien

### 2.1 Studiendesign

Zur Testung des teilautomatisierten Messsystems wurden zwei Gruppen und zwar, zum einen Polytrauma- und zum anderen Monotraumapatienten, untersucht. Das Studiendesign der Polytrauma-Gruppe wurde gemeinsam mit der X-GmbH erarbeitet, die Teilstudie mit den Monotraumapatienten wurde separat eigenständig erstellt.

#### 2.1.1 Ethik

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Technischen Universität München geprüft und unter der Antragsnummer 140/14 genehmigt. In der Polytrauma-Gruppe wurden alle nicht einwilligungsfähigen Patienten initial einem unabhängigen Arzt vorgestellt. Bei fortbestehender fehlender Einwilligungsfähigkeit erfolgte die Aufklärung des gesetzlichen Vertreters. Sobald der Patient einwilligungsfähig war, erfolgte die Patientenaufklärung und Einwilligung.

In der Monotrauma-Gruppe waren alle Patienten einwilligungsfähig. Sie wurden direkt aufgeklärt und willigten selbst ein. Alle Aufklärungen erfolgten durch einen Prüfarzt. Alle Patienten erhielten eine Kopie der schriftlichen Aufklärung.

#### 2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

##### **Alter: 18 – 95 Jahre**

Es handelt sich um eine klinische Studie an erwachsenen Patienten. Ein Einschluss von Jugendlichen oder Kindern erfolgte nicht.

##### **Einschlusskriterium Monotraumapatienten**

Das Monotrauma wurde als geplante Implantation einer Hüft-TEP bei Coxarthrose festgelegt. Die Patienten haben deshalb beim ersten Messzeitpunkt, im Folgenden als Tag 0 bezeichnet, kein Trauma erlitten. Eine nicht verletzte Vergleichsgruppe konnte somit erstellt werden. Durch den Einschluss von Hüft-TEP Patienten wurde das Trauma vom Schweregrad innerhalb der Monotrauma-Gruppe standardisiert.



### **Einschlusskriterium Polytraumapatienten**

Um den Schweregrad der Verletzung besser zu klassifizieren, wurde der ISS verwendet. Da die Gruppe der Patienten mit Polytrauma eine klare Abgrenzung im Schweregrad der Verletzung zu den Monotraumen darstellen sollte, wurde das Einschlusskriterium mit > 25 Punkte gewählt.

### **Ausschlusskriterium Mindeststudiendauer**

Wenn die ersten drei Messzeitpunkte nicht erhoben werden konnten, wurde der Patient in beiden Studienarmen ausgeschlossen.

### **Polytrauma Ausschluss von AIS $\geq 3$ in der Kopfregion**

Eine Begrenzung des AIS im Kopfbereich auf < 3 sollte den Einfluss der Verletzung des ZNS oder der Bluthirnschranke auf das Immunsystem minimieren.

### **Ausschluss bei Sepsis, SIRS, MODS oder Infektionen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses**

Patienten mit bereits bestehender schwerer Infektion, Sepsis, SIRS oder MODS, wurden nicht in die Studie eingeschlossen, weil die PMN-Migration vor allem in Hinblick auf Traumen und die damit verbundenen Immunsystemmodulationen untersucht werden sollte. Bereits bestehende Einflüsse auf das Immunsystem sollten minimal gehalten werden, um den Einfluss des Traumas bewerten zu können.

### **Sonstige Ausschlusskriterien**

Um den Einfluss von äußeren Faktoren auf das Immunsystem möglichst gering zu halten, wurde eine Modulation des Immunsystems auf Grund einer Erkrankung, Therapie mittels Glucocorticoiden oder Impfung in den letzten 14 Tagen, als Ausschlusskriterium festgelegt. Auch eine Spende von Blutprodukten, wie Erythrozyten, Plasma oder Granulozyten führte, wenn in den letzten 14 Tagen stattgefunden, zum Ausschluss.

Der Erhalt von Blutprodukten als Eckpfeiler der Polytraumatherapie war aus behandlungstechnischen Gründen nicht auszuschließen.

### **2.1.3 Messzeitpunkte**

In der Gruppe der Polytraumapatienten wurde die Messung über einen Zeitraum von 14 Tagen durchgeführt. Der Einschluss in die Studie erfolgte innerhalb von 12 Stunden nach Trauma mit der ersten Messung. Die erste Messung wird im Folgenden als Messzeitpunkt Tag 1 bezeichnet. Im Verlauf erfolgten 7 weitere Messungen an den Tagen 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14.

In der Gruppe der Monotraumapatienten wurden die Messzeitpunkte Tag 0, 1, 2 und 4 erhoben. Tag 0 ist ein präoperativer Messzeitpunkt, d. h. einen Tag vor der Operation oder am OP-Tag präoperativ. Der Messzeitpunkt Tag 1 stellte die erste postoperative Messung dar, sie erfolgte noch am OP-Tag.

### **2.1.4 Patientenkollektiv**

Der Einschluss der Polytraumapatienten erfolgte von 02/2015 bis 12/2015. Die Monotraumapatienten wurden von 03/2016 bis 04/2016 eingeschlossen.

Für die Polytrauma-Gruppe konnten sechs Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Ein Patient verstarb am zweiten Studientag und wurde auf Grund der nicht erfüllten Mindeststudiendauer ausgeschlossen. Die fünf ausgewerteten Patienten waren alle männlich, im Durchschnitt  $35 \pm 12,6$  Jahre und wiesen einen ISS von  $38,5 \pm 4,7$  auf.

In der Monotrauma-Gruppe wurden zehn Patienten eingeschlossen, sechs Männer und vier Frauen. Das Durchschnittsalter lag bei  $67,9 \pm 13,5$  Jahren.

Es traten in beiden Studienarmen keine Fälle von MODS oder Sepsis auf, alle ausgewerteten Patienten überlebten.

## 2.2 Versuchsablauf und Materialien

Für die multizentrische Pilotstudie „PMN-Migration bei Polytrauma, Sepsis und Rheumatoider Arthritis“ entwickelte die X GmbH einen teilautomatisierten Versuchsaufbau mit mehreren Einzelkomponenten zur Messung der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten. Der Messaufbau in dieser Arbeit bestand aus einem Objektträger, im Folgenden Device genannt, welches nach auftragen des Blutes durch den Inkubator prozessiert wurde. Im Anschluss erfolgte die Auswertung durch einen Reader und ein Bildanalyseprogramm.

Die für die Messung notwendigen Materialien und Lösungen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

### 2.2.1 Lösungen und Verbrauchsmaterialien

<u>Trivialname</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Gemischname</u>
Blueing Solution	X GmbH	50mM Tris-HCl pH 9,0
Clearing Solution	Carl Roth, X897	Salzsäure-Lösung für HPCE 0,1 M HCl
Hämatoxylin	Sigma, GHS316	Hämatoxylin Solution, Gill No.3
Histofix	Carl Roth, P087	Formaldehydlösung 4,0 %, säurefrei (pH 7), phosphatgepufferte Formaldehydlösung 4%
HBSS	Sigma, H6648	Hank´s Balanced Salt Solution
Immersionsöl	Carl Roth	Zedernholzölbasis
Ethanol	Carl Roth	≥99,8% EtOH
Wattetupfer	Carl Roth	Wattetupfer aus Baumwolle
Spritze	B. Braun Feindosierungsspritzen, 1 ml, 2-teilig	
Kanüle	B. Braun Sterican® G 22 x 1 1/2"	

Tabelle 1 Verbrauchsmaterialien

### 2.2.2 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte über bereits bestehende arterielle oder venöse Zugänge oder Punktion einer peripheren Vene. Entnommen wurde für den Migrationsversuch eine S-Monovette 4,5 ml mit 16 Internationalen Einheiten (IE)  $\text{NH}_4$ -Heparin pro ml Blut. Bei den Polytraumapatienten wurde zusätzlich an jedem Messzeitpunkt eine Serum-Gel 7,5ml S-Monovette von Sarstedt zur IL-10 Bestimmung abgenommen.

Für die Bestimmung der Vergleichsparameter wurde in beiden Gruppen eine Serum-Gel 7,5 ml S-Monovette von Sarstedt, sowie eine 2,7 ml S-Monovette mit Kalium-EDTA von Sarstedt je Messzeitpunkt abgenommen.

### 2.2.3 Device

Das von X GmbH entwickelte Device bestand aus zwei Kunststoffelementen, zwischen welchen eine doppelagige Nitrit-Zellulose-Membran eingebracht war. Durch Aussparungen an der Oberseite entstanden vier Wells, welche mit f 1, f 2, c 1 und c 2 benannt wurden, siehe Abbildung 3. Die doppelagige Membran besteht aus einem oberflächlichen Migrationsfilter mit  $0,8 \mu\text{m}$  Porengröße und einem darunterliegenden Depotfilter mit  $3 \mu\text{m}$  Porengröße. In die Wells f 1 und f 2 wurde fMLP als Feststoff in den Depotfilter eingebracht. Die Wells c 1 und c 2 sind zur Kontrolle ohne fMLP.

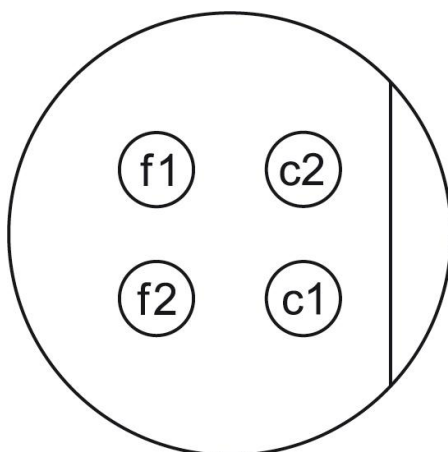


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Device

Darstellung der 4 Wells f 1 und f 2 mit Chemoattraktant Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), c 1 und c 2 ohne fMLP, A: Device Beschriftung

## **2.2.4 Immunstatus Inkubator**

Der Immunstatus Inkubator stellte den ersten Teil des Versuchsaufbaus dar. Im nachfolgenden Abschnitt wird der teilautomatische Messvorgang erklärt. Der Inkubator erfüllte die Funktion der Inkubation, Fixierung, Färbung und Zellyse der Erythrozyten.

Das NH<sub>4</sub>-Heparin enthaltende abgenommene Blut wird mit Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) verdünnt. Hierfür wurde HBSS auf 37°C im Wasserbad für 10 Minuten erwärmt. Anschließend erfolgte die Verdünnung des Blutes in einem Verhältnis von 1:5 (60 µl Blut: 300 µl HBSS).

Das Device wurde in die ausziehbare auf 37°C beheizte Wanne hineingelegt. In dieser befanden sich vier Silikonwärmeleitpads. Sie stellten sicher, dass innerhalb der vier Wells eine gleichmäßige Temperatur von 37°C vorlag. Anschließend wurde jedes der 4 Wells auf dem Device mit 30 µl HBSS benetzt und 60 µl verdünntes Blut aufgetragen. Anschließend wurde die Wanne in den Inkubator geschoben und der Inkubationsvorgang konnte über den integrierten Touchscreen gestartet werden.

### **Aufbau des Immunstatus Inkubators**

Die benötigten Reagenzien erhielt der Inkubator über Leitungen an der Rückseite des Gerätes, siehe Abbildung 4. Diese führten Histofix, destilliertes Wasser, Hämatoxylin, HCl und Blueing Solution zu. Verbrauchte Reagenzien wurden an der Rückseite des Inkubators ausgeleitet. Die Reagenzien wurden nach Eintritt in den Inkubator durch eine Reagenzien Heizung geleitet. Von dort führten Schläuche die Reagenzien in drei Regler. Jeder Regler verfügte über zwei Anschlüsse. Insgesamt gab es fünf Anschlüsse für Reagenzien und der sechste war für Raumluft. Die Regler steuerten wieviel von welchem Reagenz in den zylinderförmigen Verteiler gelangte. An der Unterseite des Verteilers führten Ausgänge zu vier Piezopumpen. Diese wiederum dosierten die Reagenzien über die Nadeln direkt auf die auf Körperkerntemperatur beheizten Wells. Nach jedem Inkubationsschritt saugte eine Pumpe das überschüssige Reagenz vom Device.



Abbildung 4: Aufbau des Immunstatus Inkubators

A: Zwei Inkubatoren. B: Ausziehbare beheizte Wanne, in welche das Device eingelegt wird. C: Touchscreen zur Steuerung der Inkubatoren. D: Reagenzien E: Abfallsauger

### Funktion des Immunstatus Inkubators

Der erste Arbeitsschritt ist die Inkubation bei 37°C. Innerhalb der folgenden 30 Minuten migrierten die neutrophilen Granulozyten in die Membranen ein. Als nächster Schritt erfolgte die Fixierung. Durch Histofix wurden alle an die Membran adhären oder in die Membran eingewanderten PMN fixiert. Damit die Fixierung erfolgreich verlief, mussten alle Wells komplett mit Histofix benetzt sein. Ab dem 5. Polytraumapatienten und in der gesamten Monotrauma-Gruppe erfolgte die Fixierung manuell, da die automatische Benetzung nicht richtig funktionierte. Hierfür wurde nach der Inkubation der Prozess gestoppt und 40µl Histofix auf jedes Well gegeben. Nach 5 Minuten Fixierung wurde der teilautomatisierte Vorgang fortgesetzt.

An die Zellfixierung schloss sich die Lyse der Erythrozyten mit Hilfe von destilliertem Wasser an. Anschließend wurde die Färbung mit Hämatoxylin durchgeführt.

Nach der Färbung musste mittels HCl, ein Clearing des unspezifisch an die Membran und Zellbestandteile gebundenen Hämatoxylin, durchgeführt werden. Die Färbung der PMN Zellkerne war vom Clearing nicht betroffen.

Die Hämatoxylin Farbe ist durch den sauren pH-Wert beim Clearing rot. Durch Applikation von Blueing Solution wurde der pH-Wert basisch und die gefärbten PMN stellten sich blau dar, weshalb die spätere Bildauswertung verbessert werden konnte. Abschließend wurde das Device durch Absaugen aller überflüssiger Reagenzien getrocknet.

### 2.2.5 Reader

Die Auswertung des Devices, also das Bestimmen der Anzahl der neutrophilen Granulozyten in den verschiedenen Ebenen, erfolgte mittels dem von der X-GmbH zur Verfügung gestellten Readers und des Bildanalyseprogramms.



**Abbildung 5: Aufbau des Readers**

**A: Tastatur, B: Universal Serial Bus (USB)-Stick, C: Touchscreen zur Bedienung, D: Device Einlegeslot, der weiße Ausschnitt anonymisiert das Firmenlogo der X GmbH**



### Aufbau des Readers

Der von der X GmbH entwickelte Reader bestand hauptsächlich aus einem Mikroskop mit verbauter Kamera und einer LED-Leuchte für die Belichtung, der Gesamtaufbau ist in Abbildung 5 dargestellt. Das Device wurde in einen im  $\mu\text{m}$ -Bereich steuerbaren Drehteller eingelegt. Zur Speicherung der Bilder diente ein externer USB-Stick, welcher mit dem mit Linux betriebenen Computer verbunden war. Der Reader erfasste je Well 3 Bilderstapel rechts und drei Stapel links von der Nut. Jeder Bildstapel bestand aus 25 Bildern, wobei jedes Bild mit  $10\mu\text{m}$  Tiefenunterschied im Kamerafokus aufgenommen wurde. Somit konnten  $250\mu\text{m}$  hohe Bildstapel der Membranen aufgenommen werden. Bei der Messung eines Devices entstanden 6 Bilderstapel mit 25 Bildern. Folglich ergab dies für alle vier Wells 600 Bilder mit einem Datenvolumen von 2,81 GB. Dies ist unten in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

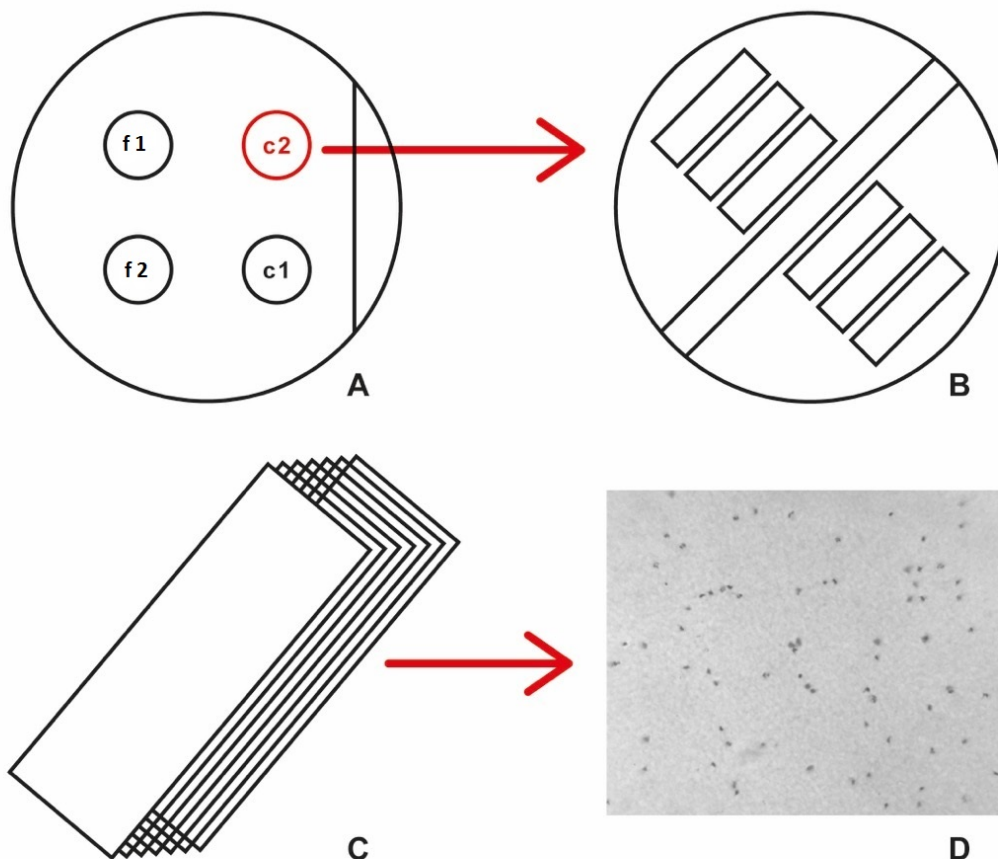


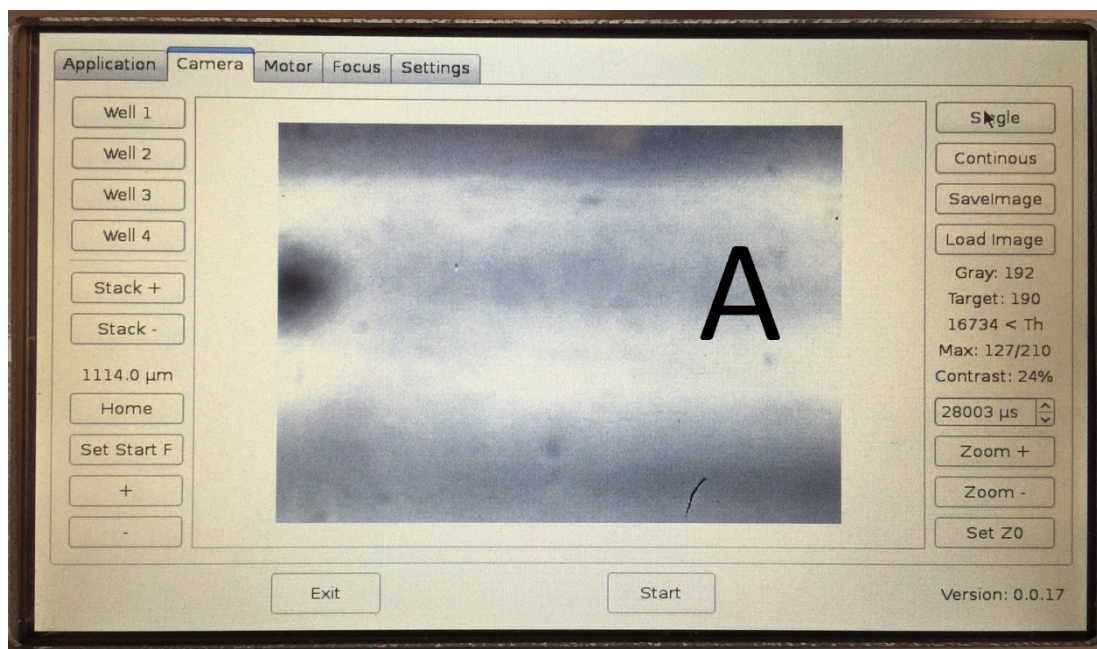
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Bildaufnahme durch den Reader



**A:** Device mit 4 Wells (f 1 und f 2 mit Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), c 1 und c 2 ohne fMLP als Kontrolle), **B:** Darstellung eines Wells mit 6 Bildstapel, **C:** Jeder Bildstapel besteht aus 25 Bildern, **D:** Einzelbild mit fixierten neutrophilen Granulozyten (PMN)

### Funktion des Readers

Das Device musste vor dem Einlegen in den Reader vorbereitet werden. Mit Hilfe von Ethanol und einem Wattetupfer wurde das Device an der Unterseite der vier Wells manuell gereinigt. Durch diesen Schritt wurde sichergestellt, dass dort keine Rückstände von den Wärmeleitpads vorhanden waren. Nach der Reinigung der Unterseite wurde die Zellulosenitrat-Membran durch das Auftragen von Immersionsöl transparent. Hierzu wurde, mit Hilfe einer 1 ml Spritze mit Kanüle, das Immersionsöl auf die Membranen geträufelt und diese an den Außenseiten der vier Wells durchstochen, damit das Immersionsöl sich auch in der Nut an der Unterseite jedes Wells verteilen konnte. Das Befüllen der Nut war notwendig, um den Kontrastunterschied zwischen der ansonsten mit Luft gefüllten Nut und dem restlichen Well gering zu halten. Nach dem Benetzen der Membranen, bis zur Auswertung durch den Reader, wird ein Zeitfenster von einigen 10 Minuten gelassen. Dieses Zeitfenster verhindert mögliche Luftblasen im Immersionsöl.



**Abbildung 7: Bildschirmanzeige Reader**

**Ausrichtung der mit Immersionsöl gefüllte Nut (A) des im Reader einliegenden Devices, bei zentraler Lage der Nut, erfolgt das Festlegen der Startposition mit „Set Z0“.**

Nach der Vorbereitung des Devices erfolgte die Auswertung im Reader. Dabei wurde Well 1 (auf dem Device als f 1 bezeichnet) an der Nut ausgerichtet, siehe Abbildung 7 Bereich A. Die Nut war an der richtigen Stelle positioniert, wenn sie mittig im Bild zu sehen war. Die Position konnte durch manuelle Rotation am Drehteller angepasst werden, bei richtiger Lage wurde die Starposition mit „Set Z0“ festgelegt. Danach erfolgte die Einstellung der Start-Fokusebene mit „Set Start F“. Hierfür wurde die Fokusebene so gewählt, dass die PMN noch unscharf zu sehen waren. Durch produktionsbedingte geringste Höhenunterschiede der Membranen musste sichergestellt werden, dass der Startfokus auf dem höchsten Well festgelegt wurde. Hierfür wurde jedes Well angesteuert und kontrolliert, ob die PMN bei der Startfokusebene unscharf sind. Falls dies nicht der Fall war, wurde mit „Zoom -“ herausgezoomt und mit „Set Start F“ der Startfokus neu definiert.

Wurden die oben beschriebenen Schritte durchgeführt, konnte unter „Applications“ der Dateiname eingegeben und das „Lesen“ des Devices gestartet werden.

### **2.2.6 Bildauswertung**

Der Reader speicherte die mit Device, Messwiederholung, Well und Bildnummer benannten Fotos auf dem angeschlossenen USB Stick, mit welchem die Daten auf den Computer übertragen wurden. Die Auswertung erfolgte mit dem Bildanalyseprogramm Digi Trace (IMATEC Bildanalyzesysteme GmbH, Miesbach).

Für das Programm Digi Trace erarbeitete die X GmbH ein neues Makro, welches anhand von Größe, Kontrast und Farbe die Zellen erkannte und damit von Artefakten abgrenzte. Aus den 25 Bildern pro Stapel wurden 12 Räume, die sogenannten „fields of view“ (FOVs), erstellt. Es erfolgte eine Zuordnung der gezählten PMN zu dem jeweiligen FOV. Um eine doppelte Zuordnung der PMN zu vermeiden, wurden die PMN dem FOV zugeordnet, in welchem sie die beste Schärfe, also einen hohen Kontrast bei einem geringen Durchmesser, hatten.

Damit die Oberfläche annäherungsweise korrekt abgebildet wurde und somit als Referenz für die Migrationstiefe Verwendung fand, musste diese definiert werden. Die X GmbH legte sie als Ebene fest bis zu welcher 10% der PMN detektiert wurden. Diese Definition war nötig, da die Wellhöhe innerhalb eines und zwischen den Devices leicht variierte. Die Fokusebene, in welcher die erste Aufnahme durch den

Reader erfolgte, hatte somit keinen einheitlichen Abstand zur Membran und konnte nicht als Referenzhöhe verwendet werden.

Die Ausgabe durch das Programm Digi Trace erfolgte als Textdatei, welche die Auflistung der gezählten PMN in den unterschiedlichen FOVs jedes Stapels enthält.

### **2.2.7 Migrationsparameter**

Aus den vom Bildauswertungsprogramm erhobenen Daten sollten Migrationsparameter errechnet werden. Hierfür legte man sich auf Parameter fest, welche in den Arbeiten von Egger bereits publiziert wurden (Gerd Egger et al., 2004). Dies waren der Adhäsionsindex (AI), die Distribution Charakteristik 50 (DC50), der Totale Migrationsindex (TMI) und der Totale Migrationsindex alternativ (TMIalt).

#### **Adhäsionsindex (AI)**

Der AI beschreibt den Anteil der Zellen auf und in der Migrationsmembran (adhärierte und migrierte) in Gegenüberstellung zu den applizierten Zellen.

#### **Distribution Charakteristik 50 (DC50)**

Der DC50 beschreibt die mediane Migrationstiefe der Zellen in die Migrationsmembran.

#### **Totaler Migrationsindex (TMI)**

Als Totaler Migrationsindex (TMI) wird das Verhältnis der migrierten zu den applizierten Zellen in Prozent angegeben.

#### **Totaler Migrationsindex alternativ (TMIalt)**

Der TMIalt beschreibt das Verhältnis der migrierten Zellen (zurückgelegte Migrationsstrecke > 10µm) zu den adhärierten Zellen.

### **2.2.8 Bestimmung der Vergleichsparameter**

Als Vergleichsparameter wurden bei den Polytraumapatienten PCT, CRP, IL-6, Leukozytenzahl und PMN-Zahl festgelegt. Zusätzlich wurde IL-10 durch das Studienzentrum in Regensburg mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) gemessen. Bei den Monotraumapatienten wurden CRP, IL-6, PCT, Leukozyten- und PMN-Zahl bestimmt. Die Vergleichsparameter wurden durch das Zentrallabor des Klinikums Rechts der Isar, erhoben.

## **2.3 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung und Errechnung der Migrationsparameter erfolgte eine Umwandlung der vom Bildverarbeitungsprogramm ausgegebenen Text- in eine Microsoft-Excel-Datei.

Zur Auswertung wurde eine Excel-Vorlage erstellt. Diese errechnet, mit Hilfe der Granulozytenzahl, die verschiedenen Migrationsparameter.

Die Zusammenfassung und deskriptive statistische Auswertung und Darstellung erfolgte mittels Microsoft Excel 2010. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (STD) angegeben.

Für die analytische statistische Auswertung wurde SPSS Statistics 25 von IBM verwendet. Als statistische Tests wurden zum Vergleich der Streuungsparameter, bei gepaarten Stichproben der Wilcoxon-Test und bei nicht gepaarten der Mann-Whitney-Test, verwendet. Unterschiede wurden bei  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

## 3 Ergebnisse

Die auf dem Device befindlichen Wells f 1 und f 2 mit fMLP werden als Chemotaxis-Messung (CHT) und die Wells c 1 und c 2 ohne fMLP als Randomisierte-Messung (RND) bezeichnet.

### 3.1 PMN-Migration

#### 3.1.1 Adhäsionsindex

Bei den polytraumatisierten Patienten wurden am Tag des Traumas durchschnittliche AI-Werte von  $28,88 \pm 18,32\%$  in CHT- und  $21,73 \pm 21,33\%$  in der RND-Messung festgestellt. Das Minimum lag am Tag 2 mit  $12,72 \pm 12,01\%$  adhären Zellen in CHT und  $13,05 \pm 13,40\%$  in RND. Das Maximum von CHT ( $65 \pm 0,32\%$ ) und RND ( $60 \pm 0,29\%$ ) wurde am Tag 12 gemessen. Wie in Abbildung 8 dargestellt, zeigte sich im Verlauf eine Erholungstendenz. Minimum und Maximum unterschieden sich nicht signifikant (CHT: Wilcoxon-Test  $p = 0,068$ , RND: Wilcoxon-Test  $p = 0,068$ ).

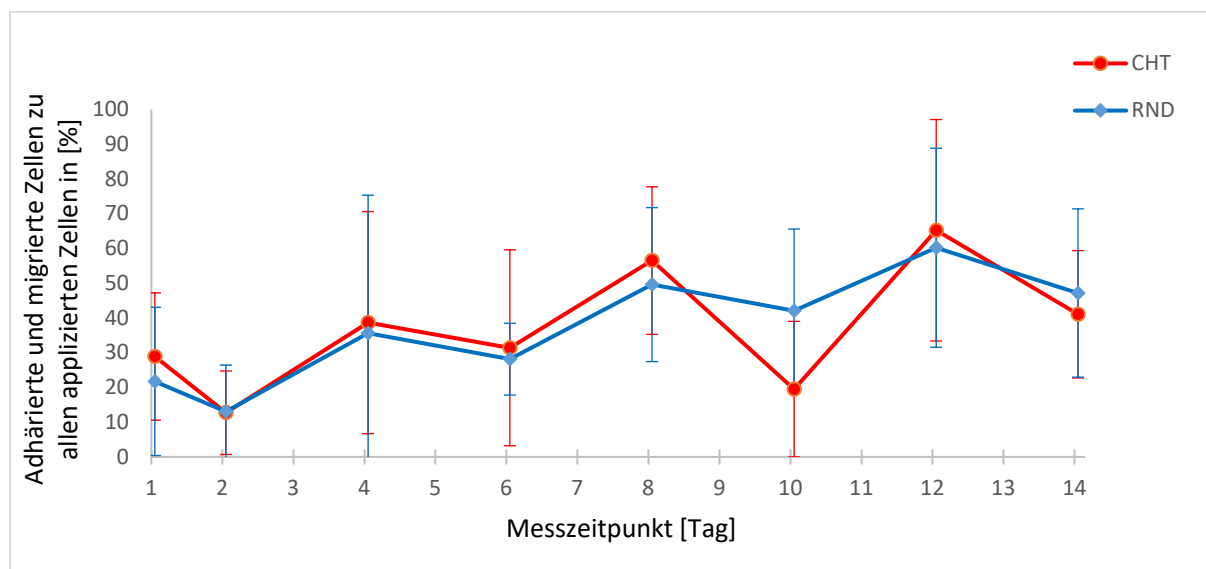


Abbildung 8: Mittelwerte des Adhäsionsindex der Polytraumapatienten

Darstellung des Adhäsionsindex (AI), Chemotaxis Messung (CHT) mit Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) und Randomisierte Messung ohne fMLP (RND). Die Whisker stellen die Standardabweichungen des jeweiligen Messzeitpunkt dar



In der Monotrauma-Gruppe wurden am Tag 0 in der CHT  $52,64 \pm 18,41\%$  und in der RND  $51,12 \pm 16,25\%$  detektiert. Der AI sank signifikant (Wilcoxon-Test: CHT:  $p = 0,028$ , RND:  $p = 0,028$ ) am Tag 1 auf  $25,70 \pm 22,72\%$  in der CHT und auf  $24,96 \pm 20,14\%$  in der RND. Im Verlauf ergab sich eine Steigerung am Tag 2 mit  $41,99 \pm 25,15\%$  in CHT und  $42,54 \pm 19,35\%$  in RND. Am Tag 4 fiel der AI in CHT auf  $24,38 \pm 17,90\%$  und RND auf  $24,91 \pm 14,65\%$ .

Beim Vergleich von den nicht verletzten Monotraumapatienten am Tag 0 und dem minimalen AI der Polytrauma-Gruppe am Tag 2 zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der CHT- (Man-Whitney-Test  $p = 0,03$ ) und ein deutlicher aber nicht signifikanter Unterschied in den RND-Messungen (Man-Whitney-Test  $p = 0,06$ ).

Ein Unterschied zwischen RND- und CHT-Messung und somit einem Einfluss durch fMLP auf den AI ist weder bei den Mono- noch bei den Polytraumapatienten erkennbar.

### 3.1.2 Totaler Migrationsindex

Das Verhalten des TMI ist ähnlich zum AI. In der Polytrauma-Gruppe war am Tag 1 in der CHT  $23,79 \pm 14,57\%$  und in der RND  $18,13 \pm 18,80\%$  detektiert worden. Das Minimum war am Tag 2 mit  $10,26 \pm 9,75\%$  in CHT und mit  $10,25 \pm 10,26\%$  in der RND festgestellt worden. Im Verlauf stieg der TMI, wie in Abbildung 9 dargestellt, an. Das Maximum befindet sich am Tag 12 mit einem TMI in der CHT von  $52,40 \pm 24,55\%$  und in der RND  $50,07 \pm 21,84\%$ .

Bei den Monotrauma Patienten waren die Messergebnisse im Verlauf auch ähnlich zu denen des AI. Das Maximum war am Tag 0 mit  $52,64 \pm 18,41\%$  in der CHT und mit  $51,12 \pm 16,25\%$  in der RND. Es folgte ein Abfall am Tag 1 (CHT:  $25,70 \pm 22,72\%$ , RND:  $24,96 \pm 20,14\%$ ), ein Anstieg am Tag 2 (CHT:  $41,99 \pm 25,15\%$ , RND:  $42,54 \pm 19,35\%$ ) und ein erneutes Fallen am Tag 4 (CHT:  $24,38 \pm 17,90\%$ , RND:  $24,91 \pm 14,65\%$ ).

Ein signifikanter Unterschied zwischen CHT und RND konnte weder in der Mono- noch in der Polytrauma-Gruppe detektiert werden.

Im Vergleich von Tag 0 in der Monotrauma-Gruppe und Minimum am Tag 2 in der Polytrauma-Gruppe, zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den CHT (Mann-Whitney-Test  $p = 0,002$ ) und den RND (Mann-Whitney-Test  $p = 0,006$ ).

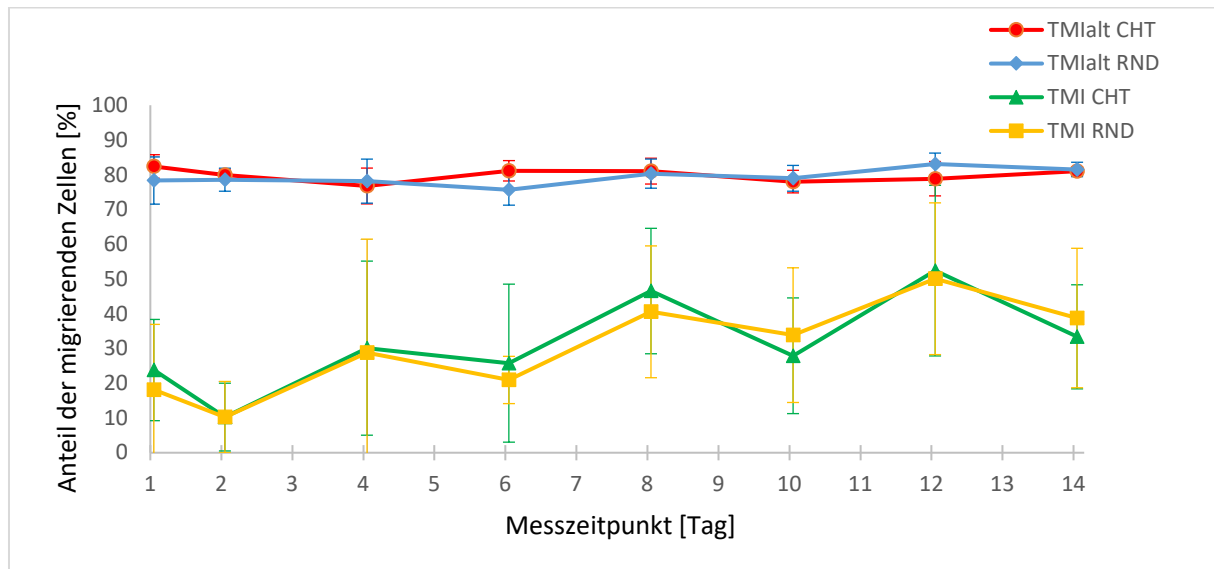


Abbildung 9: Mittelwerte von TMIalt und TMI der Polytraumapatienten

Der Totale Migrationsindex alternativ (TMIalt) ist der Prozentsatz der migrierten zu den adhärenierten Zellen. Der Totale Migrationsindex (TMI) ist der Prozentsatz der migrierten zu den applizierten Zellen. Chemotaxis Messung (CHT) mit Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) und Randomisierte Messung ohne fMLP (RND), die Whisker stellen die Standardabweichungen des jeweiligen Messzeitpunkt dar.

### 3.1.3 Totaler Migrationsindex alternativ

Beim TMIalt zeigten sich bei den Polytraumapatienten keine signifikanten Änderungen im Verlauf. Die Werte waren über den gesamten Messzeitraum, sowohl bei der CHT als auch in der RND, um 80%, siehe Abbildung 9. Die größten Unterschiede zwischen CHT und RND e am Tag 6 und Tag 12. Am Tag 6 mit in der CHT  $81,13 \pm 2,93\%$  und RND  $75,66 \pm 4,42\%$  und Tag 12 (CHT:  $78,85 \pm 4,95\%$ , RND:  $83,09 \pm 3,14\%$ ). Die detektierten Unterschiede waren weder am Tag 6 (Wilcoxon-Test  $p = 0,144$ ) noch am Tag 12 (Wilcoxon-Test  $p = 0,144$ ) signifikant.

In der Monotrauma-Gruppe wurde am Tag 0 ein TMIalt von  $85,08 \pm 2,98\%$  in der CHT und  $84,35 \pm 3,60\%$  in der RND detektiert. Am Tag 1 waren  $83,76 \pm 4,31\%$  in der CHT und  $82,57 \pm 4,22\%$  in der RND festgestellt worden. Es konnte kein signifikanter Einfluss des Traumas in CHT (Wilcoxon-Test  $p = 0,237$ ) und RND (Wilcoxon-Test



$p = 0,499$ ) festgestellt werden. Im Verlauf waren die Messwerte am Tag 2 (CHT:  $83,00 \pm 3,86\%$ , RND:  $82,67 \pm 3,01\%$ ) und am Tag 4 (CHT:  $81,08 \pm 4,67\%$ , RND:  $81,48 \pm 4,08\%$ ) nahezu konstant.

### 3.1.4 Distribution Charakteristik 50

Der durchschnittlich gemessene DC50 bei den Polytraumapatienten ist am Tag 1 in der CHT mit  $11,37 \pm 4,68 \mu\text{m}$  und in der RND mit  $13,12 \pm 5,96 \mu\text{m}$  detektiert worden. Das Maximum lag am Tag 2 (CHT:  $16,34 \pm 10,46 \mu\text{m}$ , RND:  $13,01 \pm 12,38 \mu\text{m}$ ). Im Verlauf zeigte sich ein nicht signifikanter Abfall am Tag 6 (CHT:  $7,52 \pm 1,25 \mu\text{m}$ , RND:  $5,70 \pm 1,65 \mu\text{m}$ ) und erneuter dezenter Anstieg bis zum Tag 12 (CHT:  $10,35 \pm 7,40 \mu\text{m}$ , RND:  $11,58 \pm 4,79 \mu\text{m}$ ). Eine klare posttraumatische Erholungstendenz wie beim AI oder TMI konnte, wie in Abbildung 10 dargestellt, nicht gemessen werden.

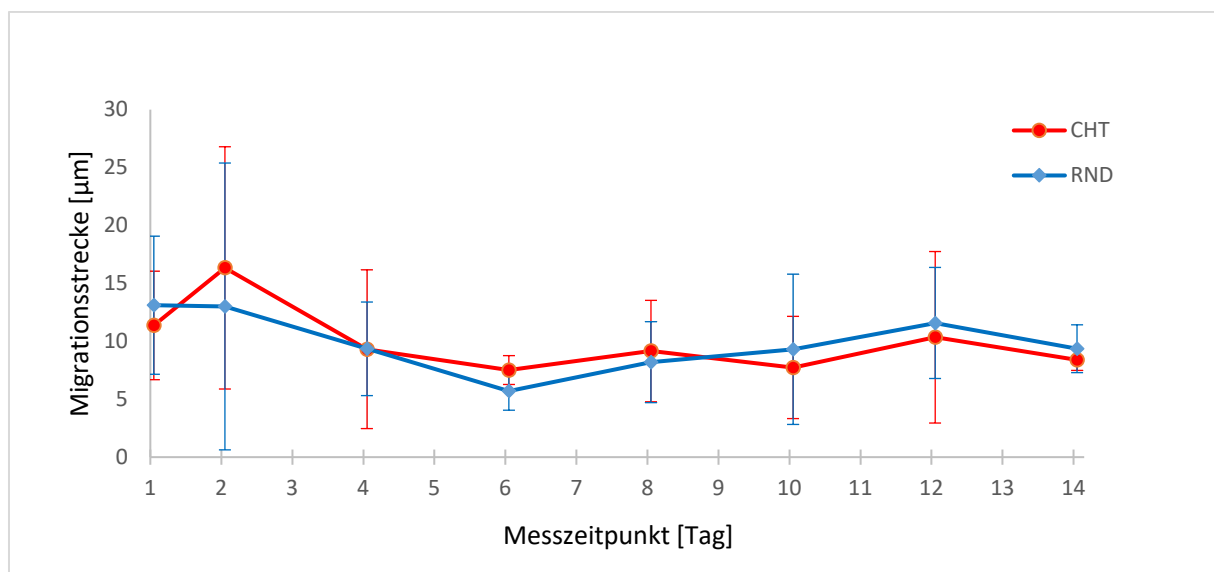


Abbildung 10: Mittelwerte des DC50 der Polytraumapatienten

Distribution Charakteristik 50 (DC50), Chemotaxis Messung (CHT) mit Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) und Randomisierte Messung ohne fMLP (RND), die Whisker stellen die Standardabweichungen des jeweiligen Messzeitpunkt dar.

In der Monotrauma-Gruppe wurde am Tag 0 ein DC50 von  $20,25 \pm 13,07 \mu\text{m}$  in der CHT und  $18,98 \pm 12,96 \mu\text{m}$  in der RND detektiert. Am Tag 1 fiel der DC50 (CHT:  $15,97 \pm 9,31 \mu\text{m}$ , RND:  $10,90 \pm 4,75 \mu\text{m}$ ), stieg am Tag 2 (CHT:  $16,75 \pm 13,54 \mu\text{m}$ , RND:  $13,84 \pm 12,98 \mu\text{m}$ ) und hat sein Minimum am Tag 4 mit  $12,57 \pm 6,80 \mu\text{m}$  in der CHT und  $8,69 \pm 2,57 \mu\text{m}$  in der RND erreicht. An allen postoperativen Messzeitpunkten hat sich ein erkennbarer Unterschied zwischen CHT und RND gezeigt. Der größte Unterschied ist am Tag 2 mit  $p = 0,069$  im Wilcoxon-Test nicht signifikant.

Der Unterschied zwischen Tag 0 und Tag 1 ist in der CHT (Wilcoxon-Test  $p = 0,310$ ) nicht signifikant, aber signifikant in der RND (Wilcoxon-Test  $p = 0,043$ ).

Im Vergleich zwischen Tag 0 der Monotrauma- und Tag 1 der Polytrauma-Gruppe stellt sich weder in der CHT (Mann-Whitney-Test  $p = 0,127$ ) noch RND (Mann-Whitney-Test  $p = 0,622$ ) ein signifikanter Unterschied dar.

Im Vergleich zwischen Tag 0 Monotrauma und allen Messungen der Polytrauma-Gruppe war ein signifikanter Unterschied zwischen den CHT (Mann-Whitney-Test  $p = 0,003$ ) und RND (Mann-Whitney-Test  $p = 0,02$ ) festzustellen.

## 3.2 Laborparameter

### 3.2.1 Leukozyten- und PMN-Anzahl

Die Leukozyten- und PMN-Anzahl zeigte bei den polytraumatisierten Patienten einen ähnlichen Verlauf. Am Tag des Traumas wurden  $7,43 \pm 3,64 \times 10^3/\mu\text{l}$  Leukozyten und  $4,72 \pm 2,37 \times 10^3/\mu\text{l}$  PMN detektiert. Am Tag 2 blieb das Messergebnis bei beiden Werten nahezu konstant (Leukozyten:  $7,67 \pm 4,38 \times 10^3/\mu\text{l}$ , PMN:  $4,93 \pm 2,71 \times 10^3/\mu\text{l}$ ). Am Tag 4 fielen beide Werte, wobei die Gesamtzahl der Leukozyten mit  $5,50 \pm 3,56 \times 10^3/\mu\text{l}$  etwas stärker fiel als die PMN-Anzahl, die durchschnittlich bei  $3,52 \pm 2,21 \times 10^3/\mu\text{l}$  lag. Im Verlauf stiegen die Leukozyten- und PMN-Werte wieder wie in Abbildung 11 dargestellt. Das Maximum lag sowohl für die Leukozyten- ( $12,61 \pm 7,45 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) als auch für die PMN-Anzahl ( $7,74 \pm 4,38 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) am Tag 10.

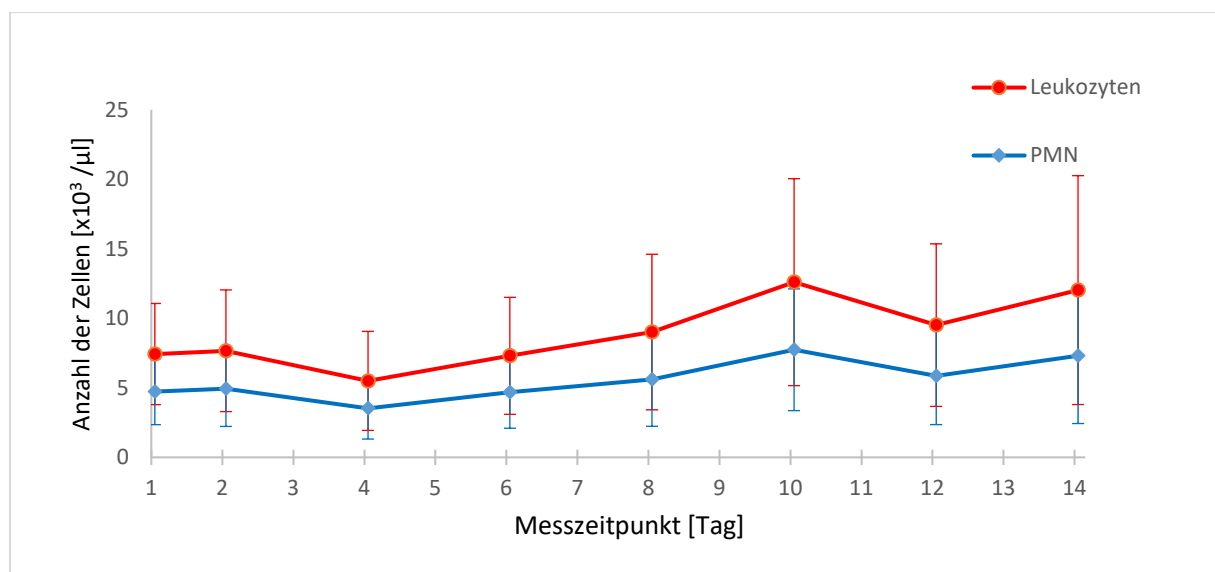


Abbildung 11: Mittelwerte der Leukozyten- und neutrophilen Granulozyten- (PMN) Anzahl der Polytraumapatienten

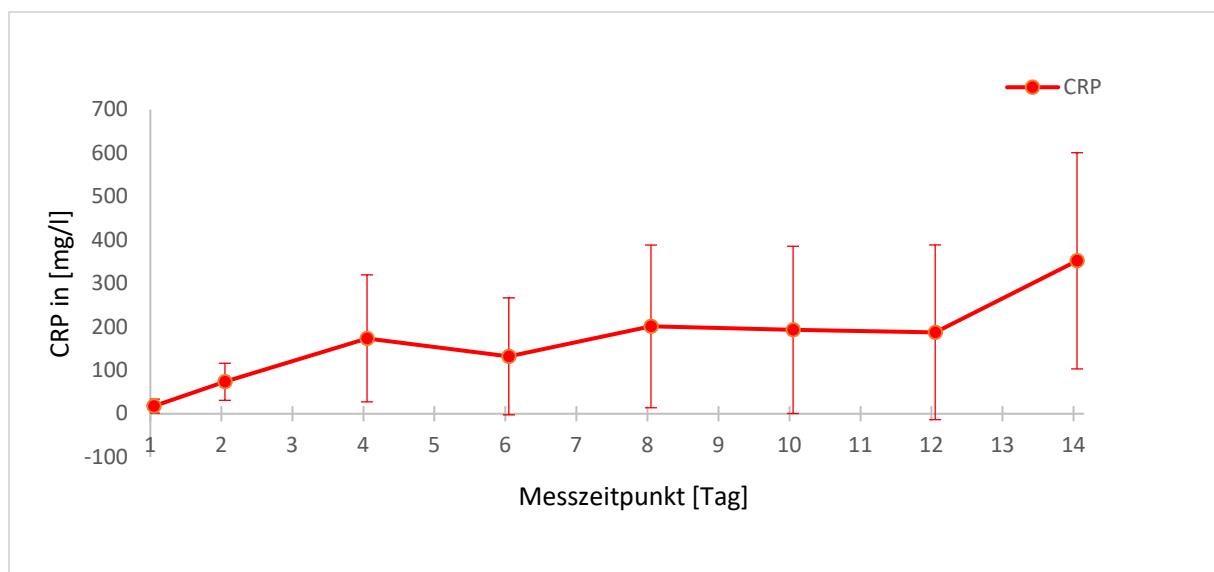
Die Whisker stellen die Standardabweichungen des jeweiligen Messzeitpunkt dar.

In der Gruppe der Monotraumapatienten wurden am Tag 0  $6,30 \pm 1,74 \times 10^3/\mu\text{l}$  Leukozyten und  $3,80 \pm 1,25 \times 10^3/\mu\text{l}$  PMN detektiert. Am Tag 1 stiegen die Leukozyten auf  $10,59 \pm 3,48 \times 10^3/\mu\text{l}$  signifikant an (Wilcoxon-Test  $p = 0,07$ ). Auch die PMN stiegen mit  $8,85 \pm 3,43 \times 10^3/\mu\text{l}$  signifikant (Wilcoxon-Test  $p = 0,005$ ). Im Verlauf normalisierte sich die Leukozyten- (Tag 2:  $7,73 \pm 1,44 \times 10^3/\mu\text{l}$ , Tag 4:  $7,02 \pm 1,52$

$\times 10^3/\mu\text{l}$ ) und auch die PMN-Anzahl (Tag 2:  $5,74 \pm 1,28 \times 10^3/\mu\text{l}$ , Tag 4:  $5,09 \pm 1,35 \times 10^3/\mu\text{l}$ ).

### 3.2.2 C-reaktives Protein

In der Polytrauma-Gruppe konnte man in der CRP-Messung erkennen, dass der posttraumatische Anstieg langsam über Tage erfolgte. Am Tag des Traumas ist das Minimum mit  $17,50 \pm 16,07 \text{ mg/l}$  gemessen worden. Im Verlauf stieg das CRP zunächst bis Tag 4 auf  $173,50 \pm 146,21 \text{ mg/l}$  an. Am Tag 6 fielen die Werte auf  $132,00 \pm 134,64 \text{ mg/l}$ . Wie in Abbildung 12 darstellt, waren die Werte an den Tagen 8, 10 und 12 nahezu konstant (Tag 8:  $201,00 \pm 187,29 \text{ mg/l}$ , Tag 10:  $193,00 \pm 192,52 \text{ mg/l}$ , Tag 12:  $187,50 \pm 201,12 \text{ mg/l}$ ). Am Tag 12 wurde mit  $352,00 \pm 248,90$  das Maximum detektiert.



**Abbildung 12: Mittelwerte der C-reaktiven Protein (CRP) Messung der Polytraumapatienten**

Die Whisker stellen die Standardabweichungen des jeweiligen Messzeitpunkts dar.

Die Ergebnisse der CRP-Messung bei den Monotraumapatienten zeigten, wie in der Polytrauma-Gruppe, einen Anstieg bis zum Tag 4. Am Tag 0 und Tag 1 waren die Werte mit  $6,33 \pm 6,22 \text{ mg/l}$  und  $6,14 \pm 3,76 \text{ mg/l}$  nahezu gleich. Am Tag 2 stieg das

CRP auf  $53,22 \pm 29,38$  mg/l. Der höchste Wert wurde am Tag 4 mit  $122,80 \pm 61,81$  mg/l detektiert.

Im Vergleich der Messungen bei der Monotrauma-Gruppe von Tag 0 zum Tag 2 (Wilcoxon-Test  $p = 0,012$ ) und von Tag 0 zum Tag 4 (Wilcoxon-Test  $p = 0,008$ ) zeigten sich signifikante Unterschiede.

### 3.2.3 Procalcitonin

Die PCT-Messergebnisse zeigten ein entgegengesetztes Bild zu den CRP-Ergebnissen in der Polytrauma-Gruppe. Das Maximum stellte Tag 1 mit durchschnittlich  $4,13 \pm 6,07$  ng/ml dar. Die Werte fielen im Verlauf ab, am Tag 2 waren es  $1,00 \pm 0,71$  ng/ml, am Tag 4  $1,91 \pm 2,60$  ng/ml. Ab Tag 6 näherten sich die Messwerte der 0,5 ng/ml Grenze, siehe Abbildung 13.

In der Monotrauma-Gruppe lagen die Ergebnisse von PCT im Mittel unter der Nachweisgrenze von 0,1ng/ml, weshalb keine Standardabweichung errechnet wurde.

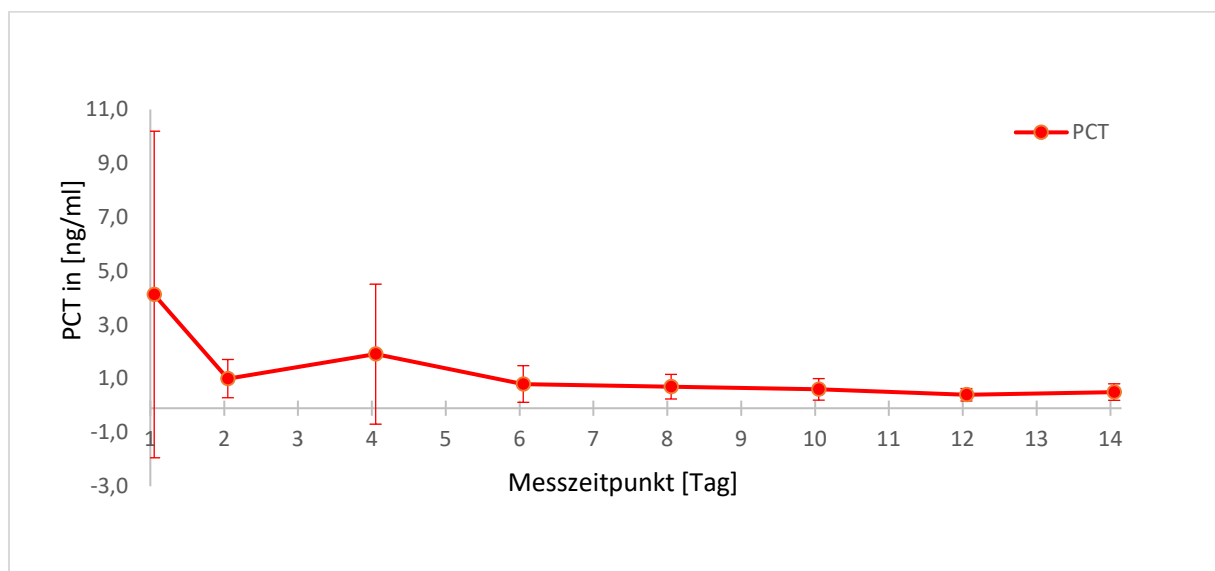
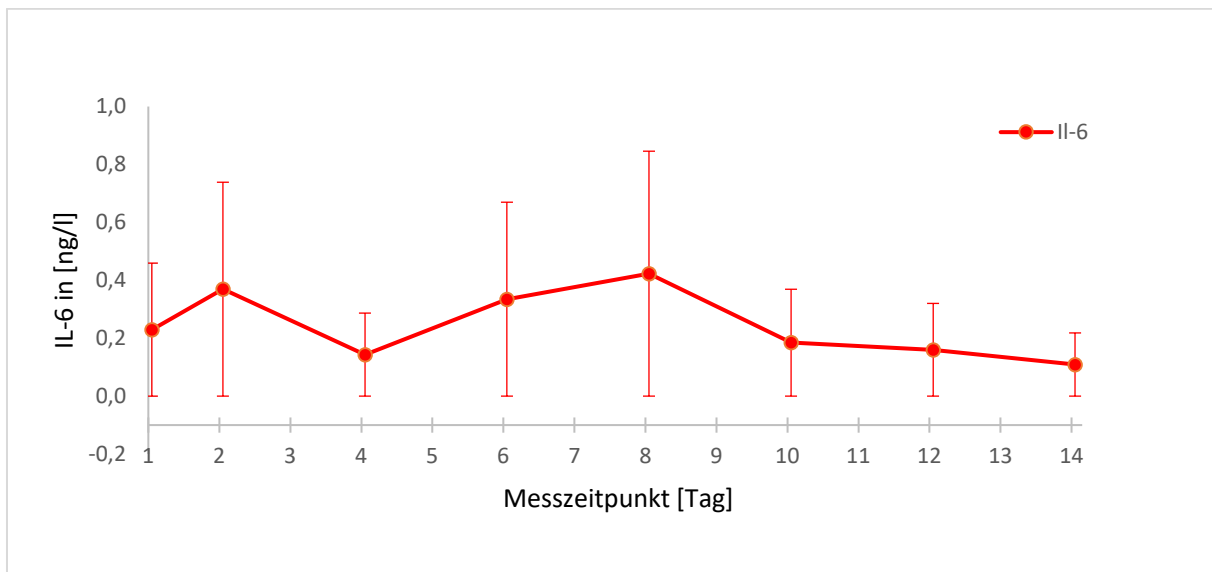


Abbildung 13: Mittelwerte der Procalcitonin (PCT) Bestimmung der Polytraumapatienten

Die Whisker stellen die Standardabweichungen des jeweiligen Messzeitpunkts dar.

### 3.2.4 Interleukin-6

Die IL-6 Messergebnisse zeigten eine deutliche Erhöhung bereits am Tag des Traumas mit  $259,20 \pm 229,68$  ng/l. Am Tag 2 stieg IL-6 auf  $503,50 \pm 369,30$  ng/l, sank am Tag 4 auf  $138,95 \pm 143,35$  ng/l und stieg an den Tagen 6 und 8 auf  $314,07 \pm 334,80$  ng/l und  $325,63 \pm 422,88$  ng/l an. Im Verlauf sanken die IL-6-Messwerte bis zum Tag 14 auf  $179,00 \pm 109,11$  ng/l, wie in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14: Mittelwerte der Interleukin-6 (IL-6) Bestimmung der Polytraumapatienten**

Die Whisker stellen die Standardabweichungen des jeweiligen Messzeitpunkt dar.

In der Monotrauma-Gruppe lag das Minimum der IL-6 Ergebnisse am Tag 0 mit  $4,79 \pm 4,59$  ng/l. Im Verlauf stiegen die Werte auf  $44,77 \pm 27,07$  ng/l am Tag 1 und weiter auf ein Maximum von  $107,98 \pm 43,64$  ng/l am Tag 2. Am Tag 4 fiel der IL-6-Wert auf  $50,37 \pm 43,78$  ng/l.

### 3.2.5 Interleukin-10

Die in der Polytrauma-Gruppe gemessenen IL-10-Werte hatten ihr Maximum am Tag 1 mit  $53,98 \pm 48,98$  pg/ml und fielen auf  $18,20 \pm 12,87$  ng/l am Tag 2. Bis Tag 6 ( $19,75 \pm 13,15$  ng/l) war IL-10 nahezu konstant. Wie in Abbildung 15 dargestellt, waren von Tag 8 bis Tag 12 erneut höhere Werte zu verzeichnen (Tag 8:  $27,80 \pm 19,66$  ng/l, Tag 10:  $28,40 \pm 20,08$  ng/l, Tag 12:  $28,60 \pm 20,22$  ng/l). Das Minimum wurde am Tag 14 mit  $17,00 \pm 12,02$  ng/l gemessen.

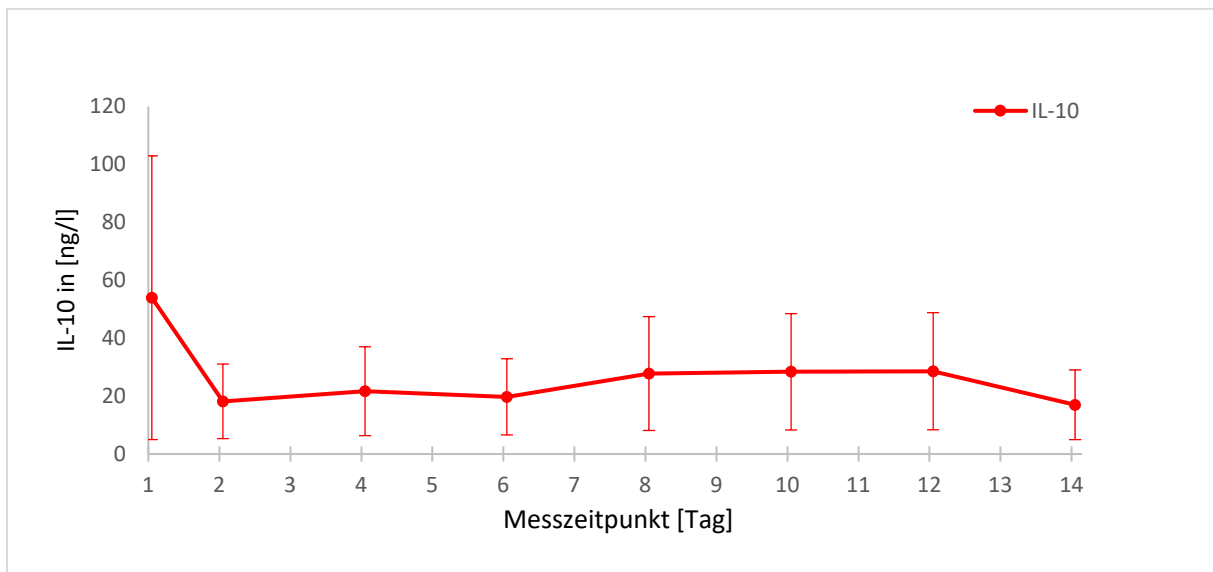


Abbildung 15: Mittelwerte der Interleukin-10 (IL-10) Bestimmung der Polytraumapatienten

Die Whisker stellen die Standardabweichungen des jeweiligen Messzeitpunkts dar.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss von fMLP auf die PMN-Migration

Als Chemoattraktant für PMN ist fMLP ausführlich erprobt und häufig verwendet worden. Zum Beispiel untersuchten Hofer et al. (1996) Monotraumapatienten. Bei allen Patienten wurde die Migration sowohl mit als auch ohne fMLP gemessen. Es konnte keine Steigerung des Adhäsionsindex oder des TMI beobachtet werden. Der DC50 wurde durch fMLP jedoch signifikant gesteigert.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Polytraumapatienten konnte kein Unterschied zwischen CHT- und RND-Messung festgestellt werden. Weder der AI, TMI, TMIalt oder DC50 ließen einen Einfluss von fMLP erkennen. Ähnliches war für die Gruppe der Monotraumapatienten feststellbar. AI, TMI und TMIalt zeigten keinen Unterschied. In der DC50-Messung ist ein deutlicher, aber nicht signifikanter Unterschied mit und ohne fMLP messbar. Eine statistische Signifikanz könnte bei einer größeren Stichprobengröße festzustellen sein.

Eine mögliche Ursache für die fehlende Wirkung von fMLP auf die Adhäsion könnten die FPR auf der PMN Oberfläche sein. Diese führen bei Stimulation zur gesteigerten Migration, aber nicht zu einer Steigerung des Entlangrollens und der Adhäsion (Dahlgren et al., 2016).

Eine weitere Erklärung wäre in der Löslichkeit von fMLP zu suchen, welches in fester Form eingebracht wurde. Damit fMLP Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit der PMN nehmen kann, muss eine relevante Konzentration an der Oberfläche der Migrationsmembran vorliegen. Ob das kurze Vorbenetzen der Wells mit HBSS ausreicht, um genug fMLP zu lösen, bleibt offen. Umgekehrt könnten zu hohe Konzentrationen von Chemoattraktanten auch zu einer Desensibilisierung der PMN durch geringeres Expressieren der Rezeptoren führen (Liu et al., 2012).

Bignold (1988) beschreibt, dass bei Membranfiltermethoden durch eine ungleichmäßige Mischung der Flüssigkeiten von beiden Kammern oder durch nicht gleichmäßiges Lösen von fMLP, es zu initial ungleichmäßigen Konzentrationen in der Membran kommt. Dies kann Einfluss auf die gemessenen Migrationsparameter



nehmen. Außerdem muss die Sedimentationsrate der Zellen beachtet werden, die auch Einfluss auf die Migrationsparameter nimmt (Bignold, 1988). So könnten unterschiedlich hohe Hämatokritwerte die Migrationsmessung durch eine unterschiedliche Viskosität und Sedimentationsrate beeinflussen.

Ein Hinweis, warum der Einfluss von fMLP in der Polytrauma-Gruppe generell geringer sein könnte, liefert die Arbeit von Herrmann et al. (2007) in welcher eine Inaktivierung der fMLP affineren FPR1, zu Gunsten einer Aktivierung der weniger affineren FPR2 bei Sepsispatienten beschrieben wird. Eine mögliche Inaktivierung durch das schwere Trauma könnte einen ähnlichen Effekt hervorrufen.

Alle oben beschriebenen Erklärungsversuche können jedoch nicht den äußerst geringen Unterschied im DC50 zwischen RND- und CHT-Messung am Tag 0, im Vergleich zum Tag 1, 2, und 4, der Monotraumapatienten erklären.

## 4.2 Einfluss von Trauma auf die PMN-Migration

Die neutrophilen Granulozyten befinden sich unter physiologischen Umständen, bei Fehlen von Infektion, Trauma, starker körperlicher Belastung oder Vorliegen von immunologischen Krankheiten, in einem Normalzustand.

Beim Trauma kommt es definitionsgemäß zu einer Gewebeerstörung mit Zelluntergang. Durch die Zellschädigung werden sogenannte Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs), auch als Alarmine bezeichnet, wie z. B. HMGB-1, heat-shock proteins oder  $\alpha$ -Defensine, freigesetzt (Manson, Thiernemann, & Brohi, 2012). In der Folge werden verschiedenste Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 und Leukotrien B4 ausgeschüttet (Summers et al., 2010; van Griensven, 2014). Die Zytokine bewirken eine allgemeine kurzfristige Steigerung der Aktivität des Immunsystems und können zu einer Überreaktion in Form eines SIRS oder einer gegensteuernden übertriebenen Suppression, einem CARS, führen. Allgemein wird in diesem Zusammenhang aktuell auch von einer posttraumatischen Immunsuppression (PTI) gesprochen (Islam, Bradley, & Ceredig, 2016).

In dieser immunologischen Ausnahmesituation ist die Funktion der PMN entscheidend. Diese werden akut aus dem Knochenmark, Lunge und Milz mobilisiert (Terashima et al., 1998). Die an der Gefäßwand marginalisierten PMN gelangen in die Mitte des Blutstroms, die L-Selektin Expression sinkt und die durchschnittliche Überlebensdauer der PMN scheint deutlich zu steigen. (Seekamp et al., 2001; Tak, Tesselaar, Pillay, Borghans, & Koenderman, 2013)

Mit dem Tag 0 der Monotrauma-Gruppe wurde eine nicht verletzte Vergleichsgruppe in dieser Arbeit erstellt. Der AI war vor dem Trauma höher und fiel durch das Trauma ab. In der Polytrauma Gruppe war der Abfall signifikant. Ähnlich sind die Ergebnisse der AI- und TMI-Messung, wobei in der Polytrauma-Gruppe eine klare Erholungstendenz erkennbar war. Eine Erklärung für dieses Verhalten bietet auch hier eine genauere Betrachtung der Oberflächenrezeptoren der PMN. Heit et al. (2008) beobachteten, dass nach Trauma die L-Selektine, CXCR1, CXCR2 und C5a-R auf den PMN signifikant weniger exprimiert werden und innerhalb von 24h eine Teilerholung festzustellen ist (Visser, Hietbrink, Groeneveld, Koenderman, & Leenen, 2011). Dabei fällt die Erholungstendenz der CXC- deutlicher aus als die der C5a-Rezeptoren. Auch wenn FPR1 und FPR2 nicht mit untersucht wurden, ist C5a, wie

fMLP, ein End-Target und somit für die Migration und nicht, wie die CXC-Liganden, für die Adhäsion verantwortlich. Dies kann ein Hinweis auf eine ähnliche Erholung der FPR sein (Heit et al., 2008). Die Erholungstendenz des AI und TMI innerhalb von 14 Tagen wäre durch die schnellere Erholung der für die Adhäsion nötigen Oberflächenmoleküle somit logisch zu erklären.

In dieser Arbeit konnte keine Erholungstendenz des DC50 bei Monotrauma- und Polytraumapatienten festgestellt werden. Der DC50 soll nach Egger den Zustand des Langzeitpriming der PMN abbilden (Gerd Egger, 2005). Dieser Zustand ändert sich wahrscheinlich sehr langsam, das bedeutet in einem Zeitrahmen von Tagen oder Wochen (Gerd Egger, 2005). Wie lange ein Trauma auf die Chemotaxis Einfluss nimmt, ist noch nicht ausreichend geklärt. In der Studie von Baehl et al. (2015) wurde die PMN Funktion von der Hüft-Fraktur mit einer Kontrollgruppe verglichen. Die Chemotaxis-Messung erfolgte mit einer modifizierten Boyden Kammer. Erst nach 6 Monaten wurde eine Kompensation auf das Niveau der Vergleichsgruppe in der PMN Migration detektiert. Dies legt nahe, dass im untersuchten Zeitraum von 14 Tagen durchaus noch keine Erholungstendenz zu verzeichnen ist, was die gemessenen Werte plausibel erscheinen lässt.

Zusammenfassend können mit dem teilautomatisierten Messsystem signifikante Unterschiede im AI und DC50 zwischen nicht verletzten und verletzten Patienten detektiert werden. Unterschiede nach Schweregrad der Verletzungen sind messbar, aber in dieser Arbeit nicht signifikant.

### **4.3 Vergleich von Labor- und Migrationsparametern**

In der Monotrauma-Gruppe erfolgte durch das Trauma ein deutlicher Anstieg der Leukozyten- sowie PMN-Anzahl. Damit war die Leukozytenzahl der konventionelle Laborparameter, welcher am schnellsten auf das Trauma reagierte. Eine erhöhte Leukozytenzahl kann einen Hinweis auf eine kritische Immunsituation wie z. B. eine Sepsis geben, auch wenn sie nicht Sepsis definierend ist (Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie, 2016; Singer et al., 2016). Im Verlauf normalisierte sich die Leukozyten- und PMN-Anzahl bei den Monotraumapatienten wieder. Die Migrationsparameter AI, TMI und DC50 zeigten auch einen Einfluss bereits am Tag 1, alle Parameter waren geringer ausgeprägt als am Tag 0. Die Erholungstendenz der Leukozyten und der PMN-Anzahl konnte jedoch in keinem der Migrationsparameter abgebildet werden.

Bei den Polytraumapatienten zeigten sich die Leukozyten- und die Granulozyten-Anzahl initial normwertig. Sie stiegen jedoch im Verlauf auf erhöhte Werte an, so dass kein Einfluss durch das Trauma erkennbar war. Der AI und TMI zeigten in der Polytrauma-Gruppe eine Erholungstendenz, einzig der DC50 stagnierte, auf einem im Vergleich zum Tag 0 der Monotrauma-Gruppe reduziertem Niveau.

Insgesamt kann man feststellen, dass die Migrationsparameter im zeitlichen Verlauf einen Einfluss durch das Trauma ähnlich zügig wie die Leukozyten- / PMN-Anzahl aufzeigen und doch kein identisches Verhalten haben.

Der Anstieg des CRP erfolgte in beiden Gruppen langsam und dauerte bis zum vierten Tag. Bei den Polytraumapatienten stieg der CRP Wert anschließend noch leicht weiter. Insgesamt ist CRP ein langsamer Parameter und weist auch in anderen Publikationen sein Maximum am zweiten oder dritten posttraumatischen Tag auf (J. White, Kelly, & Dunsmuir, 1998). Ein weiterer Anstieg nach dem dritten posttraumatischen Tag oder aber die quantitative Höhe des CRP-Spiegels, könnten ein Hinweis auf eine Gelenkinfektion sein. Generell ist dies aber nur wenig spezifisch und sensitiv und bei den erhobenen Patienten nicht aufgetreten (Windisch, Brodt, Roehner, & Matziolis, 2017). Im Vergleich zu den Migrationsparametern reagierte der CRP-Wert zeitlich verzögert. IL-6 induziert die CRP Ausschüttung was den zeitlichen Versatz erklärt (Keel & Trentz, 2005).

Die Reaktion von IL-6 war generell schneller mit einem Anstieg bereits am Tag 1. Das Maximum war am Tag 2 in beiden Gruppen zu verzeichnen. IL-6 fiel in der Monotrauma-Gruppe schneller wieder ab. Diese Erholungstendenz grenzt IL-6 in dieser Arbeit zu den Migrationsparametern ab. Das zusätzlich nur in der Polytrauma-Gruppe bestimmte IL-10 zeigte einen deutlichen Ausschlag am Tag 1 und blieb mit Werten von  $> 5\text{pg/ml}$  erhöht. Ein Zusammenhang zu AI, TMI oder DC50 war nicht feststellbar.

Auf Grund von fehlenden, schwerwiegenden Infektionen und Sepsis waren die PCT-Werte in der Monotrauma-Gruppe meist unter der Nachweisgrenze. In der Polytrauma-Gruppe wurde der einzig dokumentierte deutliche Ausschlag durch einen Patienten verursacht, welcher im Verlauf keine Sepsis entwickelte. Dies ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass erhöhte PCT-Werte auch bei größeren Weichteilschäden auftreten können (Hoshino et al., 2017). Eine Verbindung zwischen PCT und AI, TMI oder DC50 war nicht erkennbar.

Aufgrund der geringen Stichprobengröße mit großen Standardabweichungen war eine statistische Testung auf Korrelation und Regression nicht zielführend. In der folgenden größeren Prototypenstudie wird dies beachtet werden.

## 4.4 Kritik am Versuchsaufbau und Studiendesign

### Probanden

Im Jahresbericht des Trauma Registers 2016 ist das erhobene Patientenkollektiv zu 69% männlich, im Mittel 51,2 Jahre alt und mit einem mittleren ISS von 18,4 verletzt (Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie, 2016). Die hier erhobenen Polytraumapatienten waren alle männlich, mit einem mittlerem Alter von 35 Jahren, jünger und mit einem ISS von 38,5 schwerer verletzt als der Durchschnitt der Polytraumapatienten in Deutschland. Durch die Schwere der Traumata ergab sich eine klare Abgrenzung zur Verletzungsschwere der Monotrauma-Patienten.

Insgesamt konnten nur sechs Patienten in die Polytrauma-Gruppe der Studie eingeschlossen werden. Die Ursache für den geringen Einschluss lag retrospektiv betrachtet am Ausschlusskriterium AIS Kopf  $\geq 3$ . Viele schwer verletzte Patienten erfüllen das Ausschlusskriterium, da bei hohen ISS-Werten häufig Kopfverletzungen vorliegen.

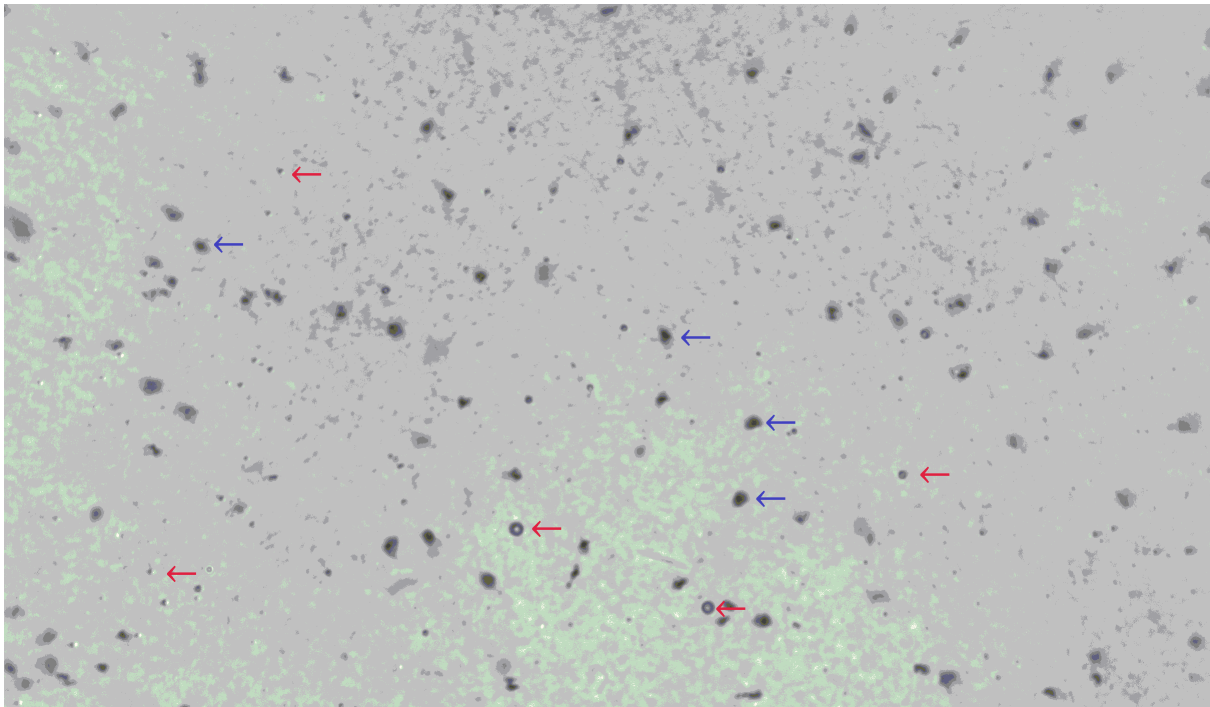
In die Vergleichsgruppe der Monotraumapatienten konnten, wie geplant, 10 Patienten eingeschlossen werden.

### Materialien

Während der Studie kristallisierte sich ein Hauptproblem mit den Inkubatoren heraus. Sie standen länger still. Daher kam es, trotz standardmäßiger Durchführung der Spülvorgänge, gehäuft zu Verstopfungen im Verteiler und Schlauchbereich der Reagenzien. Am stärksten betroffen war die Fixierlösung. Sie neigte dazu, feste Präzipitate zu bilden, welche das Schlauchlumen gänzlich oder zum Teil okkludierten. Im Bereich des Verteilers verstärkte die Vermischung mit den anderen Reagenzien diese Fällungsreaktion vermutlich zusätzlich. Abhängig vom Ort der Verstopfung musste der gesamte Messzeitpunkt oder nur das gemessene Well verworfen werden. Rahmenwerte zur Beurteilung waren TMIalt, wenn dieser deutlich kleiner als 80% war, sowie nicht plausible AI-Messwerte. Wenn diese Rahmenwerte auffällig waren, mussten Bildstapel optisch nachkontrolliert werden. Ursache für die beschriebene Problematik war die Konstruktion der Reagenzienzuführung und die zu klein dimensionierten Durchmesser der Schlauchlumen. Im Verlauf der Studie wurde die Fixierung deshalb manuell vorgenommen.

Die optische Nachkontrolle war bei Unregelmäßigkeiten einzelner FOVs unabdingbar. Im Falle ungewöhnlich hoher Zellzahlen in einzelnen FOVs lag nahe, dass es sich um Artefakte handelte. Die häufigsten Artefakte waren, wie in Abbildung 16 zu sehen, Lufteinschlüsse im Immersionsöl. Durch Einhaltung einer 10-minütigen Ruhephase nach Benetzen des Devices mit Immersionsöl, konnten Luftblasen vermieden werden und die Auswertung mit dem Reader problemfrei erfolgen.

Die X GMBH hat angekündigt, die aufgetretenen Probleme in den nachfolgenden Studien durch bautechnische Änderungen zu lösen.



**Abbildung 16: Artefakte in Form von Lufteinschlüssen im Immersionsöl**

**Die Lufteinschlüsse sind mit roten Pfeilen und die neutrophile Granulozyten mit blauen Pfeilen markiert.**

## **4.5 Schlussfolgerungen**

In der Biomarker-Entwicklung zur besseren Beschreibung des Immunsystems bei kritisch kranken Patienten sind viele Wege in den letzten Jahren beschritten worden. Es gab interessante und vielversprechende Ansätze in der Entwicklung von Biomarkern, zum Beispiel die quantitative Bestimmung von durch PMN ausgeworfenen NETs, Oberflächenmarker wie CD64, ROS-Produktion, Proteasen Aktivität, die Phagozytose Aktivität von PMN, freie DNA und einige mehr. Einen wegweisenden Erfolg gab es jedoch bisher noch nicht. Fernziel bei der Entwicklung von Biomarkern sollte immer eine bessere Einschätzung des Immunstatus und somit eine verbesserte Therapiesteuerung, welche die Morbidität und Mortalität senkt, sein. Hierzu bedarf es neben der Etablierung von Biomarkern effektive Therapiemethoden. In der Literatur wurden unter anderem Steroide, Immuntherapie mittels G-CSF, Anti-Adhäsionstherapie und Anti-Effektor Therapien beschrieben (McDonald, 2017).

Ein häufiges Problem bei den publizierten Artikeln in der Oberflächenmarker-Entwicklung ist, dass die Messverfahren in der Regel sehr zeit- und kostenintensiv sind und deshalb die Anzahl der eingeschlossenen Patienten üblicherweise gering ausfällt. In dieser Arbeit dauerte ein Messzeitpunkt, inkl. Blutentnahme, Aufklärung und Auswertung der Devices trotz erheblicher Automatisierung, mehrere Stunden. In den geplanten Prototypenstudien soll der Zeitaufwand pro Messzeitpunkt erheblich reduziert werden. Folge ist, dass gleichzeitig mehr Patienten erfasst und somit auch Subgruppen erstellt werden können, was für eine Beurteilung der PMN Migration als Biomarker unerlässlich scheint. Mit den untersuchten Polytraumapatienten in Rahmen der multizentrischen Studie konnte eine erste Bewertung der Teilkomponenten erfolgen. Es wurden durch einen ständigen Austausch mit der X GmbH, Probleme, wie die Präzipitat-Bildung in der Fixierlösung, erkannt, analysiert und behoben. Zusätzlich wurde durch den wissenschaftlichen Austausch mit der X GmbH und den weiteren Studienzentren das interne Wissen in der Arbeitsgruppe auf dem Gebiet der Migrationsmessung erheblich erhöht.

Trotz des Fortschritts bleiben viele Fragen offen. Interessant wäre die Testung des Adhäsionsverhaltens bei Zusatz von einem CXC-Liganden zum fMLP. Möglicherweise wäre hierdurch ein Unterschied im AI zwischen CHT- und RND-Messung zu verzeichnen und damit verbunden eine erhöhte diagnostische Aussagekraft möglich. Dabei müsste dieser Gradient genau entgegengesetzt zum



fMLP-Gradienten verlaufen, wie in Abbildung 1 auf Seite 6 dargestellt. Die Migrationsmembran könnte mit einem solchen Chemoattraktant vorbenetzt und so ein adäquater Gradient hergestellt werden.

Auch die Handhabung des entnommenen Blutes muss noch weiter untersucht werden. In dieser Arbeit wurde sich an den Erfahrungen von Egger orientiert (Gerd Egger et al., 1997). Durch das Verwenden von verdünntem Vollblut und einer kurzen Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Messung (<30 min), wurden die äußeren Einflüsse auf die PMN möglichst geringgehalten. Inwieweit ein Einfluss auf das Priming und die Migrationsparameter stattfindet bleibt unklar. Eine weitere Optimierung muss Ziel zukünftiger Forschung sein.

Ein weiterer Punkt ist, ob wirklich die relevantesten PMN durch die Blutentnahme erfasst werden können. Im Blut liegen die PMN in marginalisierter oder zirkulierender Subpopulationen vor. Durch ein Trauma steigt der Anteil der zirkulierenden im Vergleich zu den marginalisierten Zellen (Summers et al., 2010). Ob eine Reduktion des AI, TMI oder DC50 in beiden Populationen gleich ist oder wieviel Prozent der jeweiligen Zellpopulation durch die Blutentnahme erfasst werden, bedarf weiterer Untersuchungen.

## 5 Zusammenfassung

Polytraumapatienten stellen aufgrund der großen Verletzungsschwere und hohen Mortalität ein besonders anspruchsvolles Patientenkollektiv dar. Ursache für die hohe Mortalität sind unter anderem nicht vollständig verstandene immunologische Phänomene, wie das Inflammatory Response Syndrome (SIRS) und das Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome (CARS), welche zu einem Multiorganversagen führen können.

Die Migrationsmessung von neutrophilen Granulozyten (PMN) könnte ein geeigneter diagnostischer Marker in der Behandlung von Traumapatienten sein. Sie könnte eine bessere Einschätzung des Immunstatus von Polytraumapatienten bieten. Im Entwicklungsprozess eines vollautomatisierten Messsystems testet diese Pilotstudie Teilkomponenten in der praktischen Anwendung.

Hierfür wurde die PMN-Migration bei 10 Mono- und 6 Polytraumapatienten an 4 beziehungsweise 8 Messzeitpunkten erhoben. Die Implantation einer Hüftprothese stellte das Monotrauma dar. Jede Messung wurde sowohl mit als auch ohne dem Chemoattraktant Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) durchgeführt. Zum Vergleich wurde CRP, IL-6 und die Leukozyten-Anzahl bestimmt.

Es konnten signifikante Unterschiede in der PMN-Adhäsion und der medianen Migration festgestellt werden. Mit steigendem Schweregrad der Verletzung sank die Adhäsion sowie auch die mediane Migration. Im zeitlichen Verlauf stellte sich bei den Polytraumapatienten eine Erholung der Adhäsionsfähigkeit dar, welche bei der medianen Migration nicht erkennbar war. Ein Einfluss durch fMLP konnte nur in der medianen Migration der Monotrauma-Gruppe festgestellt werden. In der zeitlichen Detektion des Traumas war die PMN-Migration den gemessenen Vergleichsparametern nicht unterlegen.

Im Versuchsaufbau konnten Probleme wie die Präzipitation in der Fixierlösung oder die gestörte digitale Bildauswertung aufgrund von Luftblasen im Immersionsöl erkannt und behoben werden. Diese Erkenntnisse finden als bauliche Änderungen im vollautomatisierten Prototypen für Folgestudien Anwendung.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahmed, A. I., Soliman, R. A., & Samir, S. (2016). Cell Free DNA and Procalcitonin as Early Markers of Complications in ICU Patients with Multiple Trauma and Major Surgery. *Clinical laboratory*, 62(12), 2395-2404. doi:10.7754/Clin.Lab.2016.160615
- Albrich, W. C., & Mueller, B. (2011). Predicting bacteremia by procalcitonin levels in patients evaluated for sepsis in the emergency department. *Expert review of anti-infective therapy*, 9(6), 653-656. doi:10.1586/eri.11.42
- Baehl, S., Garneau, H., Le Page, A., Lorrain, D., Viens, I., Svotelis, A., . . . Fulop, T. (2015). Altered neutrophil functions in elderly patients during a 6-month follow-up period after a hip fracture. *Experimental gerontology*, 65, 58-68. doi:10.1016/j.exger.2015.03.009
- Baker, S. P., O'Neill, B., Haddon, W., Jr., & Long, W. B. (1974). The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *The Journal of trauma*, 14(3), 187-196.
- Bignold, L. P. (1987). A novel polycarbonate (Nuclepore) membrane demonstrates chemotaxis, unaffected by chemokinesis, of polymorphonuclear leukocytes in the Boyden chamber. *Journal of Immunological Methods*, 105(2), 275-280. doi:10.1016/0022-1759(87)90275-4
- Bignold, L. P. (1988). Measurement of chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes in vitro: The problems of the control of gradients of chemotactic factors, of the control of the cells and of the separation of chemotaxis from chemokinesis. *Journal of Immunological Methods*, 108(1), 1-18. doi:10.1016/0022-1759(88)90396-1
- Binkowska, A. M., Michalak, G., & Slotwinski, R. (2015). Current views on the mechanisms of immune responses to trauma and infection. *Central-European journal of immunology*, 40(2), 206-216. doi:10.5114/ceji.2015.52835
- Borregaard, N., & Cowland, J. B. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89(10), 3503-3521.
- Bosch, P., van den Kieboom, J., Plate, J. D. J., Houwert, R. M., Huisman, A., Hietbrink, F., . . . Govaert, G. A. M. (2018). Limited Predictive Value of Serum Inflammatory Markers for Diagnosing Fracture-Related Infections: results of a large retrospective multicenter cohort study. *Journal of bone and joint infection*, 3(3), 130-137. doi:10.7150/jbji.26492
- Boyden, S. (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *The Journal of experimental medicine*, 115(3), 453-466.

- Cuschieri, J., Bulger, E., Schaeffer, V., Sakr, S., Nathens, A. B., Hennessy, L., . . . Inflammation, T. (2010). Early elevation in random plasma IL-6 after severe injury is associated with development of organ failure *Shock*, 34(4), 346-351. doi:10.1097/SHK.0b013e3181d8e687
- Dahlgren, C., Gabl, M., Holdfeldt, A., Winther, M., & Forsman, H. (2016). Basic characteristics of the neutrophil receptors that recognize formylated peptides, a danger-associated molecular pattern generated by bacteria and mitochondria. *Biochemical pharmacology*, 114, 22-39. doi:10.1016/j.bcp.2016.04.014
- Deufel, T., Dörner, R., Haschke-Becher, E., Heppner, H. J., Kiehntopf, M., Klingmüller, D., . . . Sommer, R. (2013). *Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie* (8. Auflage). Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie. (2016). *Traumaregister der DGU 2016*. Retrieved from [http://www.traumanetzwerk-dgu.de/fileadmin/user\\_upload/alle\\_webseiten/docs/2016\\_Jahresbericht\\_TraumaRegister\\_DGU\\_2015.pdf](http://www.traumanetzwerk-dgu.de/fileadmin/user_upload/alle_webseiten/docs/2016_Jahresbericht_TraumaRegister_DGU_2015.pdf) (Letzter Zugriff: 01.01.2019)
- Egger, G. (2005). *Die Akute Entzündung: Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der Unspezifischen Immunität*. Wien: Springer-Verlag.
- Egger, G., Aigner, R., Glasner, A., Hofer, H. P., Mitterhammer, H., & Zelzer, S. (2004). Blood polymorphonuclear leukocyte migration as a predictive marker for infections in severe trauma: comparison with various inflammation parameters. *Intensive Care Medicine*, 30(2), 331-334. doi:10.1007/s00134-003-2111-6
- Egger, G., Kukovetz, E. M., Hayn, M., & Fabjan, J. S. (1997). Changes in the polymorphonuclear leukocyte function of blood samples induced by storage time, temperature and agitation. *Journal of Immunological Methods*, 206(1), 61-71. doi:10.1016/S0022-1759(97)00085-9
- Egger, G., Mitterhammer, H., & Smolle, K. (2004). Blood polymorphonuclear leukocyte migration - a diagnostic tool for monitoring infection risk and course of infections in severe trauma and shock. *Current Trends in Immunology*, 6, 149 - 176.
- El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J. C., Gougerot-Pocidalo, M. A., & Dang, P. M. (2016). Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunological reviews*, 273(1), 180-193. doi:10.1111/imr.12447
- Falk, W., Goodwin, R. H., Jr., & Leonard, E. J. (1980). A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *Journal of immunological methods*, 33(3), 239-247.
- Frohlich, M., Lefering, R., Probst, C., Paffrath, T., Schneider, M. M., Maegele, M., . . . Wafaisade, A. (2014). Epidemiology and risk factors of multiple-organ

- failure after multiple trauma: an analysis of 31,154 patients from the TraumaRegister DGU. *The journal of trauma and acute care surgery*, 76(4), 921-927. doi:10.1097/ta.000000000000199
- Furze, R. C., & Rankin, S. M. (2008). Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*, 125(3), 281-288. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x
- Gennarelli, T. A., & Wodzin, E. (2008). *Abbreviated injury scale 2005 : update 2008*. Barrington: Association for the Advancement of Automotive Medicine.
- Gong, Y., Zhang, Y., Feng, S., Liu, X., Lu, S., & Long, M. (2017). Dynamic contributions of P- and E-selectins to beta2-integrin-induced neutrophil transmigration. *FASEB journal*, 31(1), 212-223. doi:10.1096/fj.201600398RRR
- Guisasola, M. C., Alonso, B., Bravo, B., Vaquero, J., & Chana, F. (2017). An overview of cytokines and heat shock response in polytraumatized patients. *Cell Stress and Chaperones*, 23(4), 483-489. doi:10.1007/s12192-017-0859-9
- Heit, B., Robbins, S. M., Downey, C. M., Guan, Z., Colarusso, P., Miller, B. J., . . . Kubes, P. (2008). PTEN functions to 'prioritize' chemotactic cues and prevent 'distraction' in migrating neutrophils. *Nature immunology*, 9(7), 743-752. doi:10.1038/ni.1623
- Herrmann, J. M., Bernardo, J., Long, H. J., Seetoo, K., McMenamin, M. E., Batista, E. L., . . . Simons, E. R. (2007). Sequential Chemotactic and Phagocytic Activation of Human Polymorphonuclear Neutrophils. *Infection and Immunity*, 75(8), 3989-3998. doi:10.1128/IAI.00388-07
- Hofer, H. P., Egger, G., Kukovetz, E. M., Bratschitsch, G., Steindorfer, P., & Schaur, R. J. (1996). The influence of trauma on changes in neutrophil granulocyte function assessed by an analysis of granulocyte migration. *Langenbecks Archiv fur Chirurgie*, 381(3), 148-154.
- Hoshino, K., Irie, Y., Mizunuma, M., Kawano, K., Kitamura, T., & Ishikura, H. (2017). Incidence of elevated procalcitonin and presepsin levels after severe trauma: a pilot cohort study. *Anaesthesia and intensive care*, 45(5), 600-604. doi:10.1177/0310057X1704500510
- Islam, M. N., Bradley, B. A., & Ceredig, R. (2016). Sterile post-traumatic immunosuppression. *Clinical & translational immunology*, 5(4), 77-88. doi:10.1038/cti.2016.13
- Keel, M., & Trentz, O. (2005). Pathophysiology of polytrauma. *Injury*, 36(6), 691-709. doi:10.1016/j.injury.2004.12.037
- Lacy, P. (2006). Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology : Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 2(3), 98-108. doi:10.1186/1710-1492-2-3-98

- Lam, S. W., Leenen, L. P., van Solinge, W. W., Hietbrink, F., & Huisman, A. (2012). Comparison between the prognostic value of the white blood cell differential count and morphological parameters of neutrophils and lymphocytes in severely injured patients for 7-day in-hospital mortality. *Biomarkers*, 17(7), 642-647. doi:10.3109/1354750X.2012.712161
- Lausevic, Z., Lausevic, M., Trbojevic-Stankovic, J., Krstic, S., & Stojimirovic, B. (2008). Predicting multiple organ failure in patients with severe trauma. *Canadian journal of surgery*, 51(2), 97-102.
- Levine, H., & Rappel, W.-J. (2013). The physics of eukaryotic chemotaxis. *Physics Today*, 66(2), 24-30. doi:10.1063/PT.3.1884
- Lieschke, G. J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., . . . Dunn, A. R. (1994). Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*, 84(6), 1737-1746.
- Liu, X., Ma, B., Malik, A. B., Tang, H., Yang, T., Sun, B., . . . Xu, J. (2012). Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases. *Nature immunology*, 13(5), 457-464. doi:10.1038/ni.2258.
- Lobo, S. M., Lobo, F. R., Bota, D. P., Lopes-Ferreira, F., Soliman, H. M., Melot, C., & Vincent, J. L. (2003). C-reactive protein levels correlate with mortality and organ failure in critically ill patients. *Chest*, 123(6), 2043-2049. doi:10.1378/chest.123.6.2043
- Manson, J., Thiemermann, C., & Brohi, K. (2012). Trauma alarmins as activators of damage-induced inflammation. *The British journal of surgery*, 99(1), 12-20. doi:10.1002/bjs.7717
- Mare, T. A., Treacher, D. F., Shankar-Hari, M., Beale, R., Lewis, S. M., Chambers, D. J., & Brown, K. A. (2015). The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. *Critical care*, 19(1), 1-11. doi:10.1186/s13054-015-0778-z
- McDonald, B. (2017). Neutrophils in critical illness. *Cell and tissue research*, 371(3), 607-615. doi:10.1007/s00441-017-2752-3
- McDonald, B., & Kubes, P. (2011). Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. *Journal of molecular medicine*, 89(11), 1079-1088. doi:10.1007/s00109-011-0784-9
- McIlroy, D. J., Jarnicki, A. G., Au, G. G., Lott, N., Smith, D. W., Hansbro, P. M., & Balogh, Z. J. (2014). Mitochondrial DNA neutrophil extracellular traps are formed after trauma and subsequent surgery. *Journal of critical care*, 29(6), 1133.e1131-1135. doi:10.1016/j.jcrc.2014.07.013
- Miralda, I., Uriarte, S. M., & McLeish, K. R. (2017). Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 1-18. doi:10.3389/fcimb.2017.00217

- Moses, K., & Brandau, S. (2016). Human neutrophils: Their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells. *Seminars in immunology*, 28(2), 187-196. doi:10.1016/j.smim.2016.03.018
- Muller, W. A. (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in immunology*, 24(6), 327-334.
- Muller, W. A. (2016). Transendothelial Migration: Unifying Principles from the Endothelial Perspective. *Immunological reviews*, 273(1), 61-75. doi:10.1111/imr.12443
- Naidu, T. G., & Newbould, F. H. S. (1974). A Simple Method for Quantitation of Chemotaxis of Polymorphonuclear Neutrophils in vitro. *Immunological Communications*, 3(5), 457-468. doi:10.3109/08820137409061125
- Nargis, W., Ibrahim, M., & Ahamed, B. U. (2014). Procalcitonin versus C-reactive protein: Usefulness as biomarker of sepsis in ICU patient. *International journal of critical illness and injury science*, 4(3), 195-199. doi:10.4103/2229-5151.141356
- Qiao, Z., Wang, W., Yin, L., Luo, P., Greven, J., Horst, K., & Hildebrand, F. (2017). Using IL-6 concentrations in the first 24 h following trauma to predict immunological complications and mortality in trauma patients: a meta-analysis. *European journal of trauma and emergency surgery*, 44(5), 679-687. doi:10.1007/s00068-017-0880-9
- Sapan, H. B., Paturusi, I., Islam, A. A., Yusuf, I., Patellongi, I., Massi, M. N., . . . Hatta, M. (2017). Interleukin-6 and interleukin-10 plasma levels and mRNA expression in polytrauma patients. *Chinese journal of traumatology*, 20(6), 318-322. doi:10.1016/j.cjtee.2017.05.003
- Schiffmann, E., Corcoran, B. A., & Wahl, S. M. (1975). N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(3), 1059-1062. doi:10.1073/pnas.72.3.1059
- Seekamp, A., van Griensven, M., Hildebrandt, F., Brauer, N., Jochum, M., & Martin, M. (2001). The effect of trauma on neutrophil L-selectin expression and sL-selectin serum levels. *Shock*, 15(4), 254-260. doi: 10.1097/00024382-200115040-00002
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., . . . Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 801-810. doi:10.1001/jama.2016.0287
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., & Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in immunology*, 31(8), 318-324. doi:10.1016/j.it.2010.05.006

- Tak, T., Tesselaar, K., Pillay, J., Borghans, J. A., & Koenderman, L. (2013). What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *Journal of leukocyte biology*, *94*(4), 595-601. doi:10.1189/jlb.1112571
- Terashima, T., English, D., Hogg, J. C., & van Eeden, S. F. (1998). Release of polymorphonuclear leukocytes from the bone marrow by interleukin-8. *Blood*, *92*(3), 1062-1069.
- Tscherne, H., & Regel, G. (1997). *Tscherne Unfallchirurgie: Trauma-Management* Berlin: Springer.
- van Griensven, M. (2014). Cytokines as biomarkers in polytraumatized patients. *Der Unfallchirurg*, *117*(8), 699-702. doi:10.1007/s00113-013-2543-6
- Visser, T., Hietbrink, F., Groeneveld, K. M., Koenderman, L., & Leenen, L. P. H. (2011). Isolated blunt chest injury leads to transient activation of circulating neutrophils. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, *37*(2), 177-184. doi:10.1007/s00068-010-0041-x
- White, J., Kelly, M., & Dunsmuir, R. (1998). C-reactive protein level after total hip and total knee replacement. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, *80*(5), 909-911.
- White, M. J. V., China, L. E., Pilling, D., & Gomer, R. H. (2018). Protease activated-receptor 2 is necessary for neutrophil chemorepulsion induced by trypsin, tryptase, or dipeptidyl peptidase IV. *Journal of leukocyte biology*, *103*(1), 119-128. doi:10.1002/jlb.3a0717-308r
- Wilkinson, P. C. (1998). Assays of leukocyte locomotion and chemotaxis. *Journal of Immunological Methods*, *216*(1), 139-153. doi:10.1016/S0022-1759(98)00075-1
- Windisch, C., Brodt, S., Roehner, E., & Matziolis, G. (2017). C-reactive protein course during the first 5 days after total knee arthroplasty cannot predict early prosthetic joint infection. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, *137*(8), 1115-1119. doi:10.1007/s00402-017-2709-8



## 7 Anhang

### 7.1 Ergebnisse tabellarisch

#### 7.1.1 Polytrauma

Mittelwerte		Tag 1		Tag 2	
Migrationsparameter	Einheit	CHT ± STD	RND ± STD	CHT ± STD	RND ± STD
TMI	[%]	23,79 ± 14,57	18,13 ± 18,80	10,26 ± 9,75	10,25 ± 10,26
TMIalt	[%]	82,37 ± 3,39	78,33 ± 6,79	79,90 ± 1,73	78,57 ± 3,31
DC50	[µm]	11,37 ± 4,68	13,12 ± 5,96	16,34 ± 10,46	13,01 ± 12,38
AI		0,29 ± 0,18	0,22 ± 0,21	0,13 ± 0,12	0,13 ± 0,13
AI (in %)	[%]	28,88 ± 18,32	21,73 ± 21,33	12,72 ± 12,01	13,05 ± 13,40

**Tabelle 2: Migrationsparameter CHT- und RND-Messung Polytraumapatienten Tag 1 und Tag 2**

Mittelwerte		Tag 4		Tag 6	
Migrationsparameter	Einheit	CHT ± STD	RND ± STD	CHT ± STD	RND ± STD
TMI	[%]	30,09 ± 25,05	28,74 ± 32,72	25,77 ± 22,73	20,93 ± 6,80
TMIalt	[%]	76,76 ± 5,15	78,15 ± 6,34	81,13 ± 2,93	75,66 ± 4,42
DC50	[µm]	9,32 ± 6,85	9,35 ± 4,04	7,52 ± 1,25	5,70 ± 1,65
AI		0,39 ± 0,32	0,36 ± 0,40	0,31 ± 0,28	0,28 ± 0,10
AI (in %)	[%]	38,64 ± 31,96	35,64 ± 39,69	31,41 ± 28,19	28,12 ± 10,34

**Tabelle 3: Migrationsparameter CHT- und RND-Messung Polytraumapatienten Tag 4 und Tag 6**

Mittelwerte		Tag 8		Tag 10	
Migrationsparameter	Einheit	CHT ± STD	RND ± STD	CHT ± STD	RND ± STD
TMI	[%]	46,53 ± 18,05	40,55 ± 18,97	27,90 ± 16,65	33,84 ± 19,38
TMIalt	[%]	81,03 ± 3,71	80,31 ± 4,19	78,02 ± 3,25	78,97 ± 3,71
DC50	[µm]	9,16 ± 4,38	8,20 ± 3,49	7,74 ± 4,41	9,31 ± 6,49
AI		0,56 ± 0,21	0,50 ± 0,22	0,35 ± 0,20	0,42 ± 0,24
AI (in %)	[%]	56,49 ± 21,23	49,58 ± 22,16	34,87 ± 19,51	42,03 ± 23,56

**Tabelle 4: Migrationsparameter CHT- und RND-Messung Polytraumapatienten Tag 8 und Tag 10**

Mittelwerte		Tag 12		Tag 14	
Migrationsparameter	Einheit	CHT ± STD	RND ± STD	CHT ± STD	RND ± STD
TMI	[%]	52,40 ± 24,55	50,07 ± 21,84	33,35 ± 14,98	38,76 ± 20,07
TMIalt	[%]	78,85 ± 4,95	83,09 ± 3,14	81,00 ± 1,22	81,51 ± 2,07
DC50	[µm]	10,35 ± 7,40	11,58 ± 4,79	8,39 ± 0,90	9,36 ± 2,06
AI		0,65 ± 0,32	0,60 ± 0,29	0,41 ± 0,18	0,47 ± 0,24
AI (in %)	[%]	65,22 ± 31,87	60,19 ± 28,63	41,03 ± 18,33	47,17 ± 24,21

**Tabelle 5: Migrationsparameter CHT- und RND-Messung Polytraumapatienten Tag 12 und Tag 14**

Mittelwerte		Tag 1	Tag 2	Tag 4	Tag 6
Laborwert	Einheit	Wert ± STD	Wert ± STD	Wert ± STD	Wert ± STD
Leukozyten	[x10 <sup>3</sup> /µl]	7,43 ± 3,64	7,67 ± 4,38	5,50 ± 3,56	7,30 ± 4,21
PMN	[x10 <sup>3</sup> /µl]	4,72 ± 2,37	4,93 ± 2,71	3,52 ± 2,21	4,68 ± 2,59
CRP	[mg/l]	17,50 ± 16,07	73,50 ± 42,67	173,50 ± 146,21	132,00 ± 134,64
PCT	[ng/ml]	4,13 ± 6,07	1,00 ± 0,71	1,91 ± 2,60	0,80 ± 0,68
IL-6	[ng/l]	259,20 ± 229,68	503,50 ± 369,30	138,95 ± 143,35	314,07 ± 334,80
IL-10	[ng/l]	53,98 ± 48,98	18,20 ± 12,87	21,70 ± 15,34	19,75 ± 13,15

**Tabelle 6: Laborwerte Polytraumapatienten Tag 1 bis Tag 6**

Mittelwerte		Tag 8	Tag 10	Tag 12	Tag 14
Test	Einheit	Wert ± STD	Wert ± STD	Wert ± STD	Wert ± STD
Leukozyten	[x10 <sup>3</sup> /µl]	9,02 ± 5,60	12,61 ± 7,45	9,51 ± 5,85	12,03 ± 8,23
PMN	[x10 <sup>3</sup> /µl]	5,60 ± 3,37	7,74 ± 4,38	5,87 ± 3,51	7,32 ± 4,88
CRP	[mg/l]	201,00 ± 187,29	193,00 ± 192,52	187,50 ± 201,12	352,00 ± 248,90
PCT	[ng/ml]	0,70 ± 0,46	0,60 ± 0,40	0,40 ± 0,23	0,50 ± 0,31
IL-6	[ng/l]	325,63 ± 422,88	216,00 ± 184,52	171,00 ± 160,07	179,00 ± 109,11
IL-10	[pg/ml]	27,80 ± 19,66	28,40 ± 20,08	28,60 ± 20,22	17,00 ± 12,02

**Tabelle 7: Laborwerte Polytraumapatienten Tag 8 bis Tag 14**

## 7.1.2 Monotrauma

Mittelwerte		Tag 0		Tag 1	
Migrationsparameter	Einheit	CHT ± STD	RND ± STD	CHT ± STD	RND ± STD
TMI	[%]	45,22 ± 16,72	43,52 ± 14,20	21,94 ± 19,69	21,24 ± 17,77
TMIalt	[%]	85,08 ± 2,98	84,35 ± 3,60	83,76 ± 4,31	82,57 ± 4,22
DC50	[µm]	20,25 ± 13,07	18,98 ± 12,96	15,97 ± 9,31	10,90 ± 4,75
AI		0,53 ± 0,18	0,51 ± 0,16	0,26 ± 0,23	0,25 ± 0,20
AI (in %)	[%]	52,64 ± 18,41	51,12 ± 16,25	25,70 ± 22,72	24,96 ± 20,14

**Tabelle 8: Migrationsparameter CHT- und RND-Messung Monotraumapatienten Tag 0 und Tag 1**

Mittelwerte		Tag 2		Tag 4	
Migrationsparameter	Einheit	CHT ± STD	RND ± STD	CHT ± STD	RND ± STD
TMI	[%]	35,94 ± 22,68	35,88 ± 17,00	20,29 ± 15,53	20,62 ± 12,33
TMIalt	[%]	83,00 ± 3,86	82,67 ± 3,01	81,08 ± 4,67	81,48 ± 4,08
DC50	[µm]	16,75 ± 13,54	13,84 ± 12,98	12,57 ± 6,80	8,69 ± 2,57
AI		0,42 ± 0,25	0,43 ± 0,19	0,24 ± 0,18	0,25 ± 0,15
AI (in %)	[%]	41,99 ± 25,15	42,54 ± 19,35	24,38 ± 17,90	24,91 ± 14,65

**Tabelle 9: Migrationsparameter CHT- und RND-Messung Monotraumapatienten Tag 2 und Tag 4**

Mittelwerte		Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 4
Laborwert	Einheit	Wert ± STD	Wert ± STD	Wert ± STD	Wert ± STD
Leukozyten	[x10 <sup>3</sup> /µl]	6,30 ± 1,74	10,59 ± 3,48	7,73 ± 1,44	7,02 ± 1,52
PMN	[x10 <sup>3</sup> /µl]	3,80 ± 1,25	8,85 ± 3,43	5,74 ± 1,28	5,09 ± 1,35
CRP	[mg/l]	6,33 ± 6,22	6,14 ± 3,76	53,22 ± 29,38	122,80 ± 61,81
PCT	[ng/ml]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Il-6	[ng/l]	4,79 ± 4,59	44,77 ± 27,07	107,98 ± 43,64	50,37 ± 43,78

**Tabelle 10: Migrationsparameter CHT- und RND-Messung Monotraumapatienten Tag 0 bis Tag 4**

## **Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. van Griensven für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende fachliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Promotion bedanken. Die zahlreichen Ideen, Anregungen und der Diskurs über das Thema, ob in der Zeit im Labor oder bei der Anfertigung der schriftlichen Arbeit, waren überaus hilfreich.

Meinen ausgesprochenen Dank möchte ich an meine direkten Ansprechpartner, sowie das gesamte Team der X GmbH für die Bereitstellung des Versuchsaufbaus, die extrem schnelle Hilfe bei Problemen und den steten fachlichen Austausch richten. Ich bin sehr glücklich, dass ich an diesem spannenden Entwicklungsprozess teilhaben konnte.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem gesamten Laborteam der Experimentellen Unfallchirurgie. Bei jedem Problem hatten Fritz, Marina und alle anderen ein offenes Ohr und waren hilfsbereit. Danke für die Zeit.

Meinen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle meiner Familie aussprechen. Vielen Dank für die stetige unbegrenzte Unterstützung, Motivation und das Interesse an meiner Arbeit.