

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinikum Innenstadt
Direktor: Professor Dr. med. W. Mutschler**

**ANALYSE DER TRANSKRIPTIONALEN AKTIVITÄT
VON NF- κ B IN IMMUNKOMPETENTEN ZELLEN
POLYTRAUMATISierter PATIENTEN
IN DER FRÜHEN POSTTRAUMATISCHEN PHASE**

**Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorgelegt von Julia C. G. Stegmaier aus München, 2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. E. Mutschler

Mitberichterstatter: PD Dr. C. U. Schulz

Prof. Dr. J. Briegel

Promovierter Betreuer: PD Dr. med. P. Biberthaler

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2007

In Dankbarkeit meinen geliebten Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	4
1. EINLEITUNG UND HINTERGRUND	7
1.1 Posttraumatische Induktion inflammatorische Mediatoren	10
1.2 Pathophysiologie des posttraumatischen Schocks.....	10
1.3 Immunsystem.....	11
1.3.1 Unspezifisches Immunsystem.....	11
1.3.2 Spezifisches Immunsystem	13
1.4 Pathophysiologie des posttraumatischen SIRS.....	13
1.5 Entzündungsmediatoren.....	14
1.6 Transkriptionsfaktoren	14
1.6.1 NF- κ B	15
1.6.2 Rel-Familie.....	16
1.6.3 Inflammatorische Wirkung von NF- κ B	17
2. FRAGESTELLUNG	19
3. PATIENTEN UND METHODEN	21
3.1 Studiendesign.....	21
3.2 Patienten.....	21
3.3 Schweregradeinteilung der Mehrfachverletzungen	22
3.4 Dokumentation und epidemiologische Daten	22
3.5 MOF-Score.....	23
3.6 Protokoll.....	23
3.7 Zellseparation	26

3.8	Kontrollen	26
3.9	Nukleäre Extraktion	27
3.10	Protein-Quantifizierung.....	28
3.11	EMSA	28
3.11.1	Etablierungsversuche.....	28
3.11.2	EMSA-Protokoll.....	30
3.11.4	EMSA-Kontrollen	30
3.11.5	Elektrophoretische Auftrennung	31
3.11.6	Quantitative Analyse.....	32
3.12.1	Enzym-linked-immuno-sorbent-assay	32
3.12.2	Sandwich-ELISA.....	32
3.12.3	ELISA-Kontrollen.....	33
3.12.4	Statistische Auswertung.....	34
4.	ERGEBNISSE	35
4.1	Epidemiologische Daten.....	35
4.2	Schweregrad der Verletzungen.....	35
4.3	SIRS	37
4.4	MOF.....	37
4.5	Kontrollen	40
4.6	Protein-Quantifizierung.....	40
4.7	EMSA	40
4.7.1	Monozytäre NF- κ B-Translokation mittels EMSA	41
4.7.2	NF- κ B-Aktivität mittels ELISA	47
4.8.1	Granulozytäre NF- κ B-Aktivität mittels ELISA	49
4.8.2	NF- κ B-Aktivität mittels ELISA	55
5.	DISKUSSION	57
5.1	Methodische Aspekte	57
5.1.1	Studiendesign.....	57
5.1.2	Patientenkollektiv.....	58

5.1.3	Zellisolation.....	58
5.1.5	ELISA.....	59
5.2	Posttraumatische Immunreaktion	60
5.2.1	SIRS.....	61
5.2.2	Angeborene Immunität.....	61
5.3	NF-κB-Translokation.....	62
5.4	Monozyten.....	63
5.5	Monozytäre NF-κB-Aktivität	64
5.6	Granulozyten	65
5.7	Granulozytäre NF-κB-Translokation.....	65
5.8	Klinisches Outcome.....	66
5.8.1	Anatomische Verletzungsschwere.....	66
5.8.2	MOF	67
5.8.3	Überleben.....	68
5.9	Geschlechtsspezifische Analyse	69
5.10	NF-κB unter potentiell therapeutischem Aspekt.....	69
6.	ZUSAMMENFASSUNG	71
7.	LITERATURVERZEICHNIS	76
10.	DANKSAGUNG	103

1. EINLEITUNG UND HINTERGRUND

Die Versorgung schwer verletzter Patienten stellt nicht nur eine medizinische, sondern in zunehmendem Maße eine sozio-ökonomische Herausforderung dar. Auf Grund optimierten sowohl präklinischen als auch chirurgischen und intensivmedizinischen Therapieregimes konnte insbesondere die Frühletalität nach schwerem Trauma in den vergangenen Dekaden kontinuierlich reduziert werden. Dabei ist in Deutschland beispielsweise die Anzahl der im Straßenverkehr verstorbenen Patienten im Jahr 2006 auf das Rekord-Tief von 5020 gesunken, wobei die Anzahl der überlebenden Schwerstverletzten kontinuierlich steigt (1).

Das Polytrauma ist definiert als Mehrfachverletzung mehrerer Organe oder Körperregionen, wovon mindestens eine oder die Summe der Verletzungen lebensbedrohlich ist (2;3). Innerhalb der ersten 60 Minuten versterben etwa 30% der schwer verletzten Patienten auf Grund nicht mit dem Leben vereinbarer schwerster Verletzungen (4).

Innerhalb der ersten 24 Stunden versterben etwa weitere 30% der schwer verletzten Patienten. Diese frühe Letalität nach Polytrauma innerhalb der ersten 24 Stunden wird vor allem durch das schwere Schädel-Hirn-Trauma, Amputationsverletzungen mit lebensbedrohlichen Blutungen, sowie ausgedehnte Massenblutungen rupturierter großer Gefäße oder Defekte gut durchbluteter parenchymatöser Organe determiniert (5;6).

Dagegen versterben etwa 40% der schwer Verletzten im Laufe von Tagen bis mehreren Monaten auf Grund eines posttraumatischen Multiorganversagens. Dieser Spätletalität nach Trauma liegen Inflammations- oder Ischämie-bedingte schwerwiegende Funktionsausfälle lebenswichtiger Organe zu Grunde (7). Umfangreiche Untersuchungen der vergangenen Jahre haben klar herausgestellt, dass eine Entzündungsreaktion dabei die gemeinsame Endstrecke eines pathophysiologischen Phänomens darstellt, welches als Auslöser unterschiedliche Ursachen haben kann wie etwa Verkehrsunfälle, Schussverletzungen oder Verbrennungen (8-12).

In initial verletzten Organen werden inflammatorische Kaskaden in Gang gesetzt, die vornehmlich der Reparatur der verletzten Gewebe dienen. In der frühen posttraumatischen Phase sind dies insbesondere proinflammatorische Mediatoren wie IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF α und toxische Sauerstoffmetabolite (13-16), die entscheidende Voraussetzungen mittels Vasodilatation, Angiogenese und Makrophagenimmigration liefern, um das geschädigte Gewebe wieder in Stand zu setzen. Die Freisetzung dieser Entzündungsmediatoren kann jedoch zu einer generalisierten, systemischen Entzündungsreaktion führen, die auch Organe und Gewebe in Mitleidenschaft ziehen kann, die von der initialen Verletzung nicht betroffen waren. Diese überschießende Entzündungsreaktion in der frühen posttraumatischen Phase wurde als *Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS, beschrieben (17-19).

Klinisch ist das SIRS definiert als das zeitgleiche Auftreten von mindestens 2 der folgenden Symptome bei fehlendem Nachweis eines infektiösen Fokus: Atemfrequenz $> 20/\text{min}$ oder $\text{paCO}_2 < 4,3\text{kPa}$, Herzfrequenz $> 90/\text{min}$, Hyperthermie ($> 38^\circ\text{C}$) oder Hypothermie ($< 36^\circ\text{C}$), sowie vorhandene Leukozytose oder Leukopenie (20).

Das posttraumatische SIRS kann zu initial noch reversiblen funktionellen Organausfällen führen (21-23). Ist der Organismus jedoch nicht in der Lage, diese Inflammation zu modulieren, entsteht ein fließender Übergang zur Entwicklung eines frühen *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*, MODS, dessen Irreparabilität in ein strukturelles *Multiple Organ Failure*, MOF, münden kann und das noch immer mit einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate einhergeht (24;25). Auf Grund insbesondere kontinuierlich optimierter intensivmedizinischer Therapieregime konnte die Häufigkeit schwerer Organfunktionsstörungen kontinuierlich reduziert werden.

Trotzdem bleibt die Manifestation eines MOF nach schwerem Trauma der determinierende Faktor für die Spät-Letalität (26). Andererseits wurde unlängst eine auf das frühe hyperinflammatorische SIRS induzierte Kompensationsphase des Organismus beschrieben, das *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome*, CARS, das insbesondere durch vermehrte Freisetzung anti-inflammatorischer Mediatoren, wie IL-1RA und IL-10 charakterisiert ist (27). Im Rahmen der Ausbildung eines CARS ist der humane Organismus durch eine verringerte Immunabwehr gekennzeichnet, mit konsekutiv erhöhtem Risiko, bakteriellen oder viralen, sowie körpereigenen Pathogenen anheim zu fallen und seinerseits durch die Immundefizienz einem späten MODS Vorschub zu leisten (28).

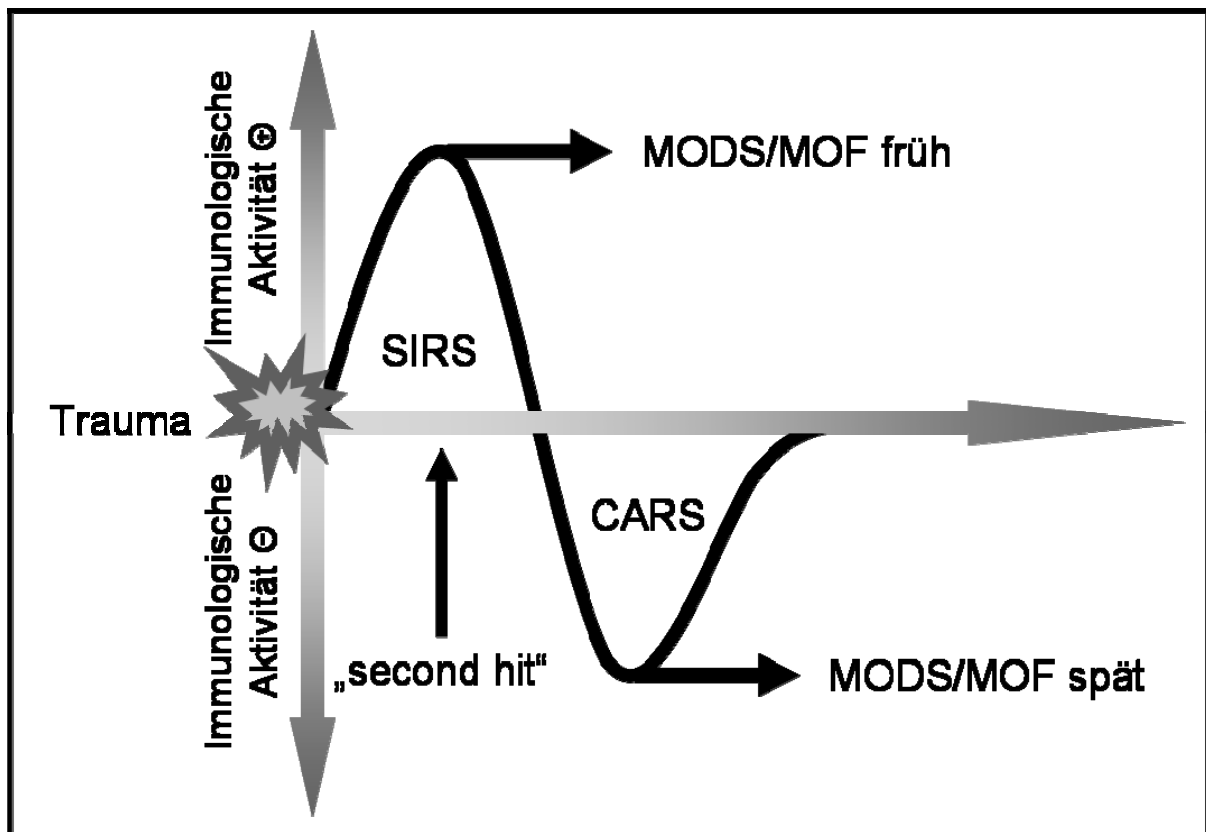


Abb. 1: Schematische Darstellung des posttraumatischen Organversagens. Dynamik des initialen *Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS, das ebenso wie das mit einiger zeitlicher Latenz entstehende *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome*, CARS, in ein *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*, MODS, bzw. strukturelles *Multiple Organ Failure* münden kann. Modifiziert nach E.E. Moore et al. (29)

Eine entscheidende Rolle für das frühe immunmodulatorische Geschehen nach Trauma wird in diesem Zusammenhang den Effektorzellen der frühen unspezifischen Immunantwort, wie dem Monozyten-Makrophagen-System und den polymorphkernigen (PMN-) Granulozyten zugeschrieben (11;30-32) durch die Fähigkeit, proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF α und toxische Sauerstoffmetabolite zu synthetisieren und freizusetzen (33-36). Somit induzieren diese Effektorzellen des frühen, angeborenen Immunsystems entscheidende Voraussetzungen für die Reparatur der verletzten Gewebe mittels Vasodilatation, Angiogenese und Makrophagenimmigration.

Größere traumatische Defekte gut durchbluteter Gewebe sind mit der Ausbildung von Hämatomen verbunden, etwa bei Frakturen oder Weichteilschäden. Derartige Hämatome bewirken vornehmlich die Immigration immunologisch aktiver Zellen (37;38), wie PMN-Granulozyten und Monozyten/Makrophagen aus dem Blut. Neben der in Gang gesetzten Gerinnungskaskade sind es vor allem diese Zellen der unspezifischen Immunabwehr, die die initiale Freisetzung von toxischen Sauerstoffradikalen, Wachstumsfaktoren, Proteasen und Zytokinen bewirken (39-41).

1.1 Posttraumatische Induktion inflammatorische Mediatoren

Diese Induktion dient in erster Linie der Abwehr eingedrungener Pathogene, der Phagozytose geschädigter Gewebe, sowie der Vasodilatation zur Revaskularisierung ischämischer Areale. Es sind jedoch auch insbesondere diese frühen Mediatoren, die eine systemische Entzündungsreaktion mit den verbundenen schwerwiegenden Folgen induzieren. In Endothelzellen verletzter Gewebe konnten gesteigerte *tissue factor*-, TF-, Konzentrationen nachgewiesen werden in Zusammenhang mit gesteigerter Induktion der pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP1 (42). In zahlreichen Studien wurde versucht, die auslösenden Mechanismen für die Generalisierung der ursprünglich regionalen Entzündungsreaktion zu identifizieren (11;43-48), was bislang nur unzureichend gelang. Als gesichert gilt, dass es sich um kaskadenartige Aktivierungsmechanismen handelt. Der rein mechanische Zellschaden induziert die Immigration von Monozyten und Makrophagen aus dem Blut, zur Beseitigung zu Grunde gegangener Zellverbände und Gewebetrümmer (49;50).

Diese Mediatoren spielen zum einen eine bedeutende Rolle bei der Heilung des verletzten Gewebes, zum anderen bilden sie aber auch die Grundlage der Pathogenese von Kreislaufversagen und Zellläsionen, infolge derer u.a. die Granulozytenadhäsion am Endothel, das *capillary leakage syndrome*, und die Verbrauchskoagulopathie auftreten (51;52).

1.2 Pathophysiologie des posttraumatischen Schocks

Die passagere Ischämie mit anschließender Reperfusion führt zur Freisetzung toxischer Sauerstoffmetabolite (53) der betroffenen Regionen mit konsekutiver Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen (54-61). Im Rahmen der sympathoadrenerg bedingten Kreislaufzentralisation, wie im traumatischen hämorrhagischen Schock, resultieren Minderperfusion und somit Ischämie der dezentralen Organe, sowie der Extremitäten (62).

In diesem Zusammenhang wurden insbesondere die Lunge (63-65), sowie die Niere (66;67) als besonders vulnerabel gegenüber traumatischer passagerer Ischämie identifiziert. Auf Grund dieser ausgeprägten Anfälligkeit des respiratorischen und glomerulären Endothels wurden diese Organbereiche als primäre Schockorgane identifiziert. In Folge einer traumatischen Minderperfusion sind insbesondere die Entstehung eines akuten Nierenversagens, ANV (68-71), bzw. eines *Adult Respiratory Distress Syndrome*, ARDS (63;72-75), die ebenfalls eine Generalisierung initial lokaler inflammatorischer Geschehen bewirken oder verstärken können. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Gastrointestinaltrakt sensibel auf ischämische Zustände reagiert (76;77). Dadurch können durch Minderperfusion bedingte Mucosenschäden des Darmes zu vermehrter Translokation bakterieller Endotoxine aus der ge-

schädigten Mucosa in die systemische Zirkulation (78;79), sowie über den Pfortaderkreislauf zur Aktivierung von Lebermakrophagen, den Kupfferschen Sternzellen mit konsekutiver Aktivierung des Immunsystems führen (80;81). Eine direkte Minderperfusion der Leber ist neben der verzögert symptomatischen, verminderten Metabolisierung insbesondere für die Freisetzung immunmodulatorischer Mediatoren wie Akut-Phase- und Anti-Akut-Phase-Proteinen verantwortlich, die das entzündliche Geschehen nach Trauma mitgestalten (82;83). Aus jedem Mono-Organversagen kann durch überschießende Aktivierung inflammatorischer Mediatoren ein MODS, bzw. MOF resultieren.

1.3 Immunsystem

Das humane Immunsystem wird in einen spezifischen und unspezifischen Anteil unterteilt. Während an der Ausbildung eines SIRS primär die Zellen des unspezifischen Immunsystems beteiligt zu sein scheinen, wird die Ausbildung eines CARS eher als Effekt der spezifischen Immunzellen anzusehen ist (37). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass beide Systeme im Rahmen der posttraumatischen Entzündungsreaktionen eng miteinander interagieren (84). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des unspezifischen Immunsystems mit einiger Latenz zur Induktion des spezifischen Systems führt (85;86).

1.3.1 Unspezifisches Immunsystem

Das unspezifische Immunsystem umfasst sowohl humorale Faktoren wie Lysozym, Komplementfaktoren, sekretorische Immunglobuline der Schleimhäute als primäre Abwehrbarriere, als auch zur Phagozytose befähigte Zellen, wie das Monozyten-Makrophagen-System und PMN-Granulozyten. Diese sind in der Lage, eine schnelle, daher weniger spezifische Immunantwort auf eingedrungene Erreger zu gewährleisten, sowie zu Grunde gegangene Zellen, Detritus aufzunehmen und abzubauen.

Insbesondere neutrophile Granulozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Beseitigung körperfremder Pathogene, wie auch zu Grunde gegangener körpereigener Bestandteile (87). Dies ist in erster Linie auf ihre Fähigkeit zurückzuführen, reaktive Sauerstoffmetabolite, (ROI), zu bilden. Des Weiteren konnten NO (Stickstoffmonoxid), sowie Eikosanoide im Rahmen dieser frühen unspezifischen Aktivierungsphase nachgewiesen werden (88-90). Die daran anbindenden neutrophilen Granulozyten setzen ihrerseits ebenfalls aktivierende Zytokine, wie Sauerstoffradikale frei. Anhand von Messungen der posttraumatischen *Respiratory Burst*-Aktivität konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung der neutrophiler Granulozyten-Funktion mit einem vermindertem Risiko für die Entstehung eines posttraumatischen Multiorganversagens

einhergeht (91). Dennoch stellt die granulozytäre Funktion einen essentiellen Mechanismus der ersten inflammatorischen Abwehrreaktion des Organismus in Folge eines Traumas dar. Im Rahmen einer Gewebhypoxie und -ischämie, wie sie nach Trauma auftreten (92), kommt es initial durch die Expression von hypoxiesensitiven Transkriptionsfaktoren, wie des nukleären Faktors, NF- κ B mit konsekutiver Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren und Adhäsionsmolekülen (93). Phagozytierende Zellen der Monozyten/Makrophagenreihe, welche sich zu 95% ortsständig im retikuloendothelialen System, RES, insbesondere in Leber und Milz befinden, tragen wichtige Funktionen zur Befreiung des Blutes von pathogenen Bestandteilen. Darüber hinaus wird die Aktivierung des Komplementsystems auf dem klassischen oder alternativen Weg dem unspezifischen Immunsystem zugeordnet (94-96). Die somit freigesetzten Komplementfaktoren verstärken ihrerseits die inflammatorische Reaktion, indem sie die Opsonierung und Phagozytose apoptotischer oder nekrotischer Zellen unterstützen.

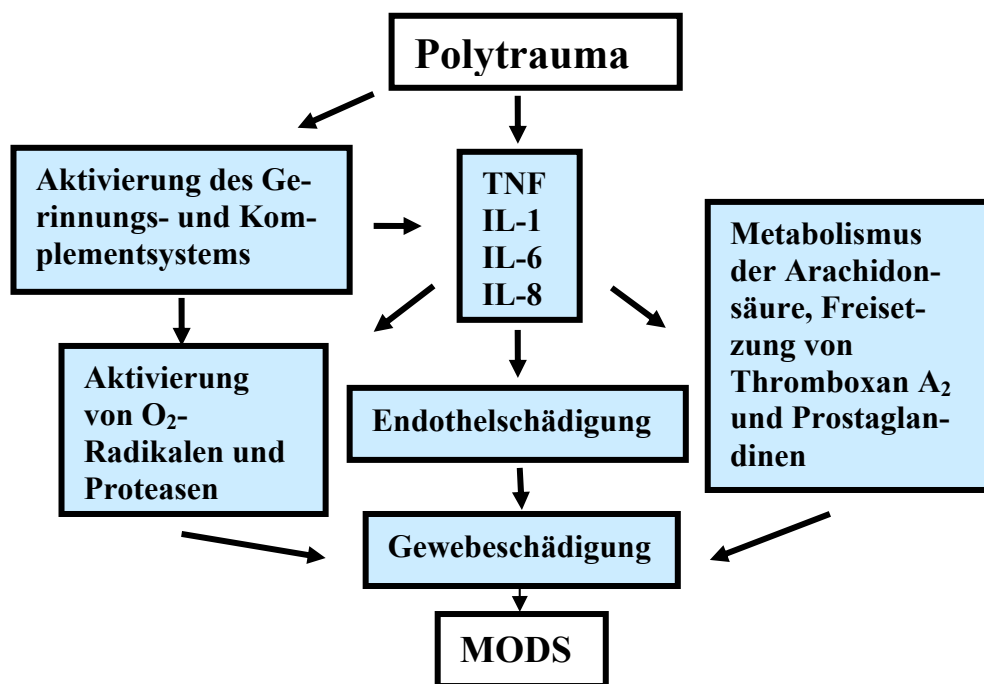


Abb. 2: F. Hildebrand et al Unfallchirurg 2005 10.1007 Diese Darstellung aus Hildebrand et al (97) zeigt schematisch die Inflammationskaskade nach Polytrauma unter Aktivierung der unspezifischen humoralen Faktoren bis zur Ausbildung eines MODS.

1.3.2 Spezifisches Immunsystem

Das spezifische Immunsystem beinhaltet weiter differenzierte Zellen, wie die im Thymus geprägten T-Lymphozyten, sowie die sog. B-Lymphozyten, die erstmals bei Vögeln entdeckt und dort in der *Bursa Fabricii* geprägt werden, deren Prägung im humanen Organismus im Knochenmark stattfindet. B-Lymphozyten sind zur Synthese und Sekretion spezifischer Antikörper befähigt, werden jedoch auf Grund der Latenz von Stunden bis Tagen, erst als zweite, spezifische Barriere wirksam im Sinne einer adaptierten Immunabwehr (98). Monozyten/Makrophagen stellen somit eine wichtige Schnittstelle zwischen dem unspezifischen Immunsystem zur Aktivierung des spezifischen Systems dar. Neben der Beseitigung von Mikroorganismen und zu Grunde gegangener Gewebe sind Makrophagen in der Lage, die Aktivierung von Lymphozyten als Effektoren des spezifischen Immunsystems über die Antigen-Präsentation zu modulieren. Diese spezifische Adaptation geschieht mittels des MHC (*major histocompatibility complex*), welcher die Immunzellen zu spezifischer Merkmalsdetektion befähigt. Das Monozyten-Makrophagen-System ist in der Lage, das spezifische Immunsystem unter Zuhilfenahme von T-Helferzellen zu aktivieren und stellt somit eine wichtige Schnittstelle der primären zur adaptierten Immunantwort dar (99).

1.4 Pathophysiologie des posttraumatischen SIRS

Das posttraumatische Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS ist insbesondere durch erhöhte Konzentrationen pro-inflammatorischer Mediatoren gekennzeichnet (100). In den vergangenen Dekaden wurden zahlreiche Studien zur Detektion, sowie Quantifizierung der freigesetzten Chemo- und Zytokine durchgeführt (101). Insbesondere $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6 und IL-8 zählen zu den nach schwerem Trauma in der systemischen Zirkulation signifikant erhöhten pro-inflammatorischen Mediatoren. Als Quelle gelten Endothelzellen verletzter Gewebe, ebenso wie aktivierte Monozyten und Makrophagen, Granulozyten, sowie T- und B-Lymphozyten (102;103). In Abhängigkeit von der Verletzungsschwere werden sie nach Trauma ins Blut sezerniert mit individuellen Maximalwerten in der frühen posttraumatischen Phase, um dann mit einiger Latenz im Sinne eines sich entwickelnden CARS von anti-inflammatorischen Mediatoren abgelöst zu werden. Insbesondere IL-1RA, TGF- β und IL-10 zählen zu den anti-inflammatorisch wirksamen Mediatoren (104), die in deutlich erhöhter Konzentration in der systemischen Zirkulation schwer verletzter Patienten nachweisbar sind. Während des posttraumatischen CARS ist das Individuum zusätzlich durch eine deutlich erhöhte Infektanfälligkeit gefährdet, wodurch sowohl ein fließender Übergang zu einem späten

MODS bzw. MOF entstehen kann als auch die Voraussetzung für septische Komplikationen erhöht ist.

1.5 Entzündungsmediatoren

In den vergangenen Dekaden wurden zahlreiche Studien durchgeführt, mit der Zielsetzung, die posttraumatische Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren zu identifizieren und zu quantifizieren (11;105-110). Dabei ist die Wirkungsweise der beteiligten Transmitter und inflammatorischen Mediatoren äußerst komplex. Viele Studien der vergangenen Jahrzehnte hatten zur Zielsetzung, die initialen Mechanismen, die für die Generalisation der ursprünglich lokal begrenzten inflammatorischen Reaktion zu identifizieren, was bisher nur unzureichend gelang. Unklar ist bisher, welche transkriptionale Signaltransduktion der Freisetzung dieser Mediatoren vorausgeht. Insbesondere der Transkriptionsfaktor NF- κ B konnte als essentieller Induktor einer Vielzahl pro-inflammatorischer Zielgene identifiziert werden (111-114).

Im Rahmen vielzähliger Studien wurde die Expression der bislang bekannten Mediatoren in Abhängigkeit vom auslösenden Trauma analysiert. Über bislang noch unzureichend charakterisierte transmembranäre Rezeptoren induziert schweres Trauma die Aktivierung latent vorhandener zytoplasmatischer Mediatoren, die nach der Aktivierung befähigt sind, in den Zellkern zu translozieren. Nach Bindung an die DNA-Promotorregion angesteuerter Zielgene wird die Transkription der betreffenden inflammatorischen Gene ausgelöst mit konsekutiver Freisetzung der angesprochenen inflammatorischen Mediatoren nach posttranslationaler Modifikation (115).

1.6 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind induzierbare, in inaktiver Form im Zytoplasma maskierte DNA-Bindungsproteine die über mehrere Domänen verfügen: Eine Domäne fungiert als sog. Erkennungsbereich, die der Bindung des aktiven Liganden dient, eine Domäne zur Bindung an die zu transkribierende Promotor-Region der DNA, die sog. *cis*-Region, sowie mindestens eine Domäne, die der Stabilisierung dient. Nach Aktivierung translozieren sie in den Zellkern, um dort an die zugehörige Promoterregion der DNA zu binden und die Transkription spezifischer Zielgene zu induzieren (116).

1.6.1 NF- κ B

Erstmalig wurde NF- κ B 1986 von R. Sen und D. Baltimore beschrieben. Dabei konnte NF- κ B-Induktion mittels posttranslationaler Aktivierung durch Phorbolester oder bakteriellem Lipopolysaccharid, LPS in transkribierenden Zellen der Immunglobulin-Leichtkette K, sowie in Prä-B- und T-Zellen nachgewiesen werden (117). Initial gelang es nicht, NF- κ B in anderen Zellarten nachzuweisen. Daraus resultierte die Erkenntnis, dass NF- κ B im Zytoplasma von I- κ B maskiert wird und nur intranukleär in der aktiven Form nachweisbar ist. Mittlerweile ist bekannt, dass NF- κ B ein ubiquitär vorkommender, induzierbarer Transkriptionsfaktor ist, der essentiell an der Regulation einer Reihe von Zytokinen, Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen beteiligt ist (118;119). NF- κ B ist ein zentraler inflammatorischer Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Vielzahl von Genen reguliert, insbesondere pro-inflammatorische Zielgene, wie beispielsweise IL-1, IL-8, TNF- α , GM-CSF, in deren Enhancer- bzw. Promotorregion die NF- κ B-Sequenz enthalten ist (120-123). Somit kommt diesem nukleären Faktor substantielle regulatorische Bedeutung im Rahmen der posttraumatischen inflammatorischen Reaktion zu.

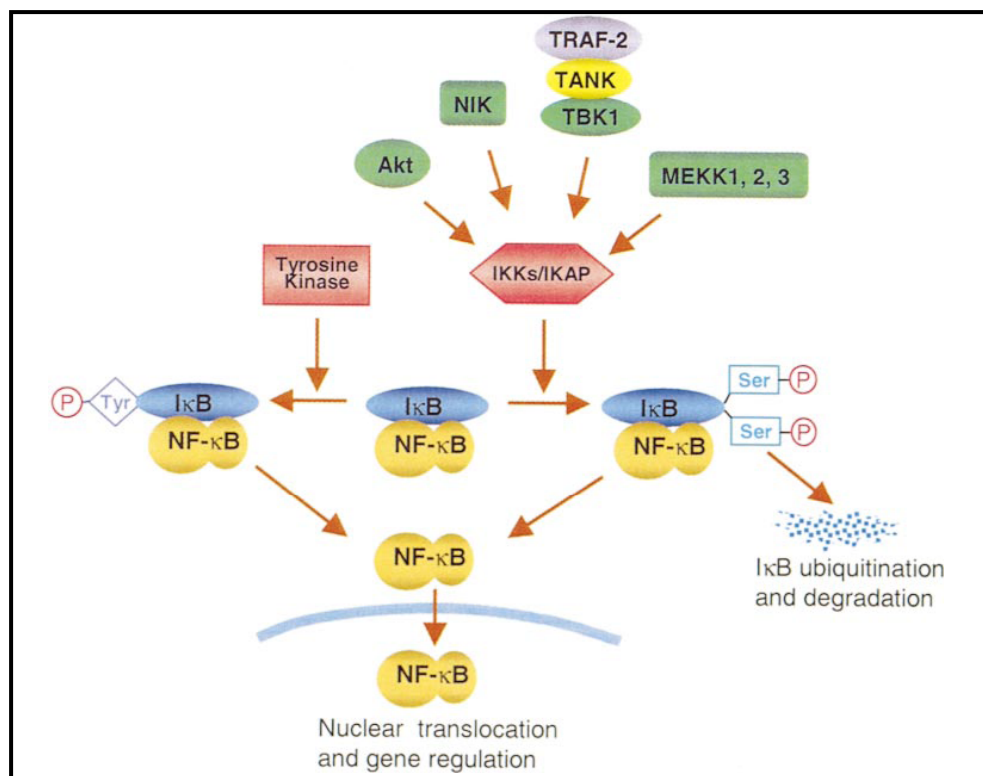


Abb. 3 illustriert schematisch die up-stream transzelluläre Aktivation von NF- κ B durch I- κ B-Phosphorylierung und konsekutiver nukleärer Translokation J. Fan et al. (124).

1.6.2 Rel-Familie

Bislang wurden fünf Mitglieder der NF- κ B/Rel-Familie identifiziert und sequenziert: p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (RelA), c-Rel und RelB (125). Die Rel/ NF- κ B-Familie ist somit auf transkriptionaler Ebene in immunologische Prozesse wie Akut-Phase-Reaktionen involviert (11;126). Rel-Proteine bestehen aus Sequenzen von etwa 300 Aminosäuren, besitzen die Fähigkeit an DNA zu binden und können auf Grund struktureller und funktioneller Eigenschaften in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe beinhaltet p65 (RelA), und RelB, welche mindestens eine transkriptions-aktivierende Domäne besitzen. Die zweite Gruppe stellen die Präkursoren p105 und p100 dar, welche durch proteolytische Prozessierung zu den aktiven Untereinheiten p50 und p52 werden. Untereinheiten beider Gruppen können Homo- oder Hetero-Dimere formieren. Die häufigste Form repräsentiert das Heterodimer p50/p65. In ruhenden Zellen wird NF- κ B im Zytoplasma durch Assoziation mit inhibitorischen Proteinen, I- κ B gehalten. Diese inhibitorischen Proteine beinhalten verschiedene Isoformen I- κ B α , I- κ B β und I- κ B ϵ , wovon I- κ B α bislang am besten untersucht ist (11;127). Bei Stimulation, beispielsweise durch TNF α wird I- κ B α an zwei N-terminalen spezifischen Serinresten, Seryl32 und 36, durch einen großen zytoplasmatischen I- κ B α -Kinase-Komplex phosphoryliert, welcher aus zwei katalytischen Einheiten IKK α und IKK β , sowie der regulatorischen Untereinheit NEMO/IKK γ besteht (128;129). I- κ B α wird nach Polyubiquitinierung durch die E3-SCF β ^{TrCP} am 26S-Proteasom degradiert. Mit der Degradation von I- κ B α kann das aktive NF- κ B-Dimer in den Zellkern translozieren. Unter der Vielzahl transkribierter Gene befindet sich ebenfalls der Inhibitor I- κ B α . Neu synthetisiertes I- κ B α gelangt in den Zellkern, um NF- κ B von der DNA zu lösen und in das Zytoplasma zurückzutransportieren (11;130;131). Nach Aktivierung und Translokation in den Zellkern wird die regulierte Transkription pro- oder antiapoptotischer Zielgene ausgelöst in Abhängigkeit vom Signaltypus und der spezifischen Zellart (132).

Die NF- κ B-Aktivität wird klassischerweise durch induzierbare Phosphorylierung und Degradation der Inhibitorproteine I- κ B kontrolliert. Andererseits wird die Aktivation auch terminiert durch die Bindung von p100 und p105, die nicht nur an NF- κ B binden, sondern auch die Präkursoren von p50 und p52 repräsentieren (11).

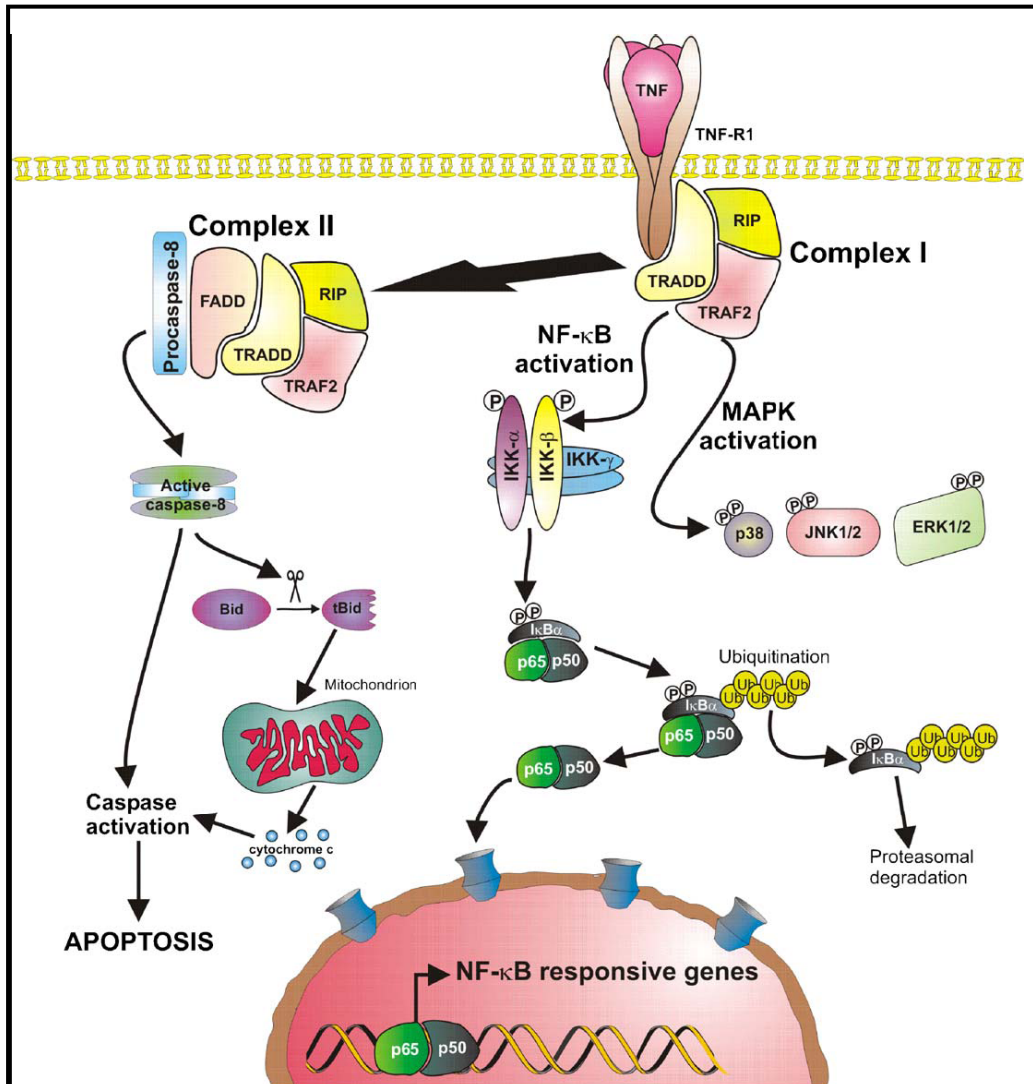


Abb. 4: Schematische Darstellung der DNA-Bindung von NF- κ B mit Darstellung der cytoplasmatischen Prozessierung und konsekutiven transnukleären Aktivierung aus A. *Wullaert et al.* (133).

1.6.3 Inflammatorische Wirkung von NF- κ B

Nicht nur in akut veränderten Geweben (134), sondern auch in malignen und chronisch entzündlichen Geweben (135;136), wie etwa im Rahmen eines M. Crohn oder der Sarkoidose, jedoch auch im Rahmen degenerativer Erkrankungen konnte dieses System der pro-inflammatorischen Aktivierung und selbst-induzierten Deaktivierung von NF- κ B als dekompenziert nachgewiesen werden (137-139). Eine Vielzahl insbesondere pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine wie IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, der IL-2-Rezeptor, die p40-Untereinheit von IL-12, IFN- γ , sowie Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 unterliegen der transkriptionalen Regulation durch NF- κ B (11;140). An den Zytokinrezeptor CD14 gebundenes bakterielles Lipopolysaccharid, induziert vornehmlich über die *Toll-Like*-Rezeptoren, TLR2 und 4 NF- κ B-Translokation (141). Im Tiermodell konnte zeitabhängig signifikant gesteigerte neu-

ronale NF- κ B-Translokation nach Schädel-Hirn-Trauma nachgewiesen werden (142-146). In traumatisch geschädigten Axonen, die sekundär atrophierten, fand sich die Aktivität bis zu einem Jahr erhöht. Nach experimentellem Thoraxtrauma, ebenso wie im Verbrennungsmodell (147;148) konnte prolongierte NF- κ B-Aktivität nachgewiesen werden. Somit konnte in der vergangenen Zeit anhand verschiedener Modelle gezeigt werden, dass sowohl Inflammation nach Trauma als auch Infektion zu NF- κ B-Aktivierung führen. Die NF- κ B-Translokation und Aktivität in immunkompetenten Zellen des humanen Organismus nach Trauma konnte bis dato nicht bzw. nur unzureichend nachgewiesen werden (149).

2. Fragestellung

In den vergangenen Jahrzehnten konnte insbesondere durch verkürzte Rettungszeiten, optimierte Primärversorgung und Stabilisierung (150), standardisiertes Schockraum-Management (151), sowie kontinuierlich verbesserter bildgebender Verfahren und anschließender intensivmedizinischer Versorgung eine signifikante Reduktion der frühen Mortalitätsrate polytraumatisierter Patienten erreicht werden (152). Somit versterben immer weniger Patienten an den unmittelbaren Traumafolgen. Durch die Reduktion der Frühmortalität, stellt das posttraumatische Multiorganversagen, MOV, beim polytraumatisierten Patienten weithin die schwerwiegendste Komplikation dar, an der etwa ein Drittel der polytraumatisierten Patienten verstirbt.

Zahlreiche Studien der vergangenen Dekaden befassten sich mit der Analyse der posttraumatischen Zytokinfreisetzung (153-157).

Bislang ist es jedoch nicht gelungen, die Mediatoren oder Mechanismen zu identifizieren, die zur Generalisation und somit Dekompensation der initial begrenzten inflammatorischen Reaktion führen. NF- κ B scheint als essentieller Transkriptionsfaktor einer Vielzahl proinflammatorischer Gene wesentlich an der Induktion der frühen inflammatorischen Immunantwort nach Trauma involviert zu sein (11;158;159). Anhand von tierexperimentellen Untersuchungen konnte die Induktion von NF- κ B im hämorrhagischen Schockmodell nachgewiesen werden. Anhand von Zellkultur-Untersuchungen konnte eine schnelle Induktion von NF- κ B durch proinflammatorische Substanzen wie TNF α gezeigt werden. Untersuchungen an humanen Monozyten zeigten *in vitro* signifikant gesteigerte NF- κ B-Aktivierung nach LPS-Stimulation (160-162).

Im Gegensatz dazu zeigte eine monozytäre Analyse anhand von schwer verletzten Patienten bereits am ersten posttraumatischen Tag deutlich reduzierte NF- κ B-Aktivität (163). Insbesondere die granulozytäre NF- κ B-Aktivierung nach Trauma ist bis dato unzureichend charakterisiert. Hingegen ist bekannt, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROI) aus neutrophilen Granulozyten NF- κ B induzieren können mit konsekutiver posttranslatinaler Expression proinflammatorischer Mediatoren (11;164-166).

Daher war es Ziel dieser Studie, die nukleäre Translokation von NF- κ B in CD-14-positiven Monozyten und CD15-positiven PMN-Granulozyten polytraumatisierter Patienten in der unmittelbar posttraumatischen Phase, d. h. unmittelbar bei Aufnahme im Schockraum innerhalb von 90 Minuten nach Trauma, sowie standardisiert zum Traumazeitpunkt nach 6h, 12h, 24h, 48h und 72h zu analysieren.

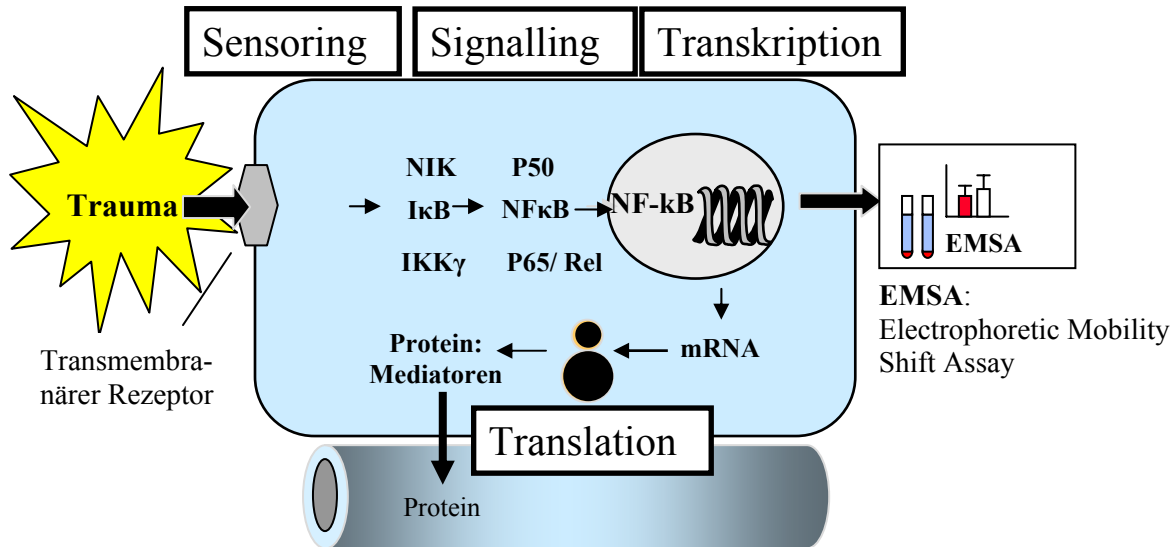


Abb 5: Schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges der traumatischen immunologischen Aktivierung von NF- κ B. Dabei führt das Agens Trauma zur Aktivierung und Freisetzung von Mediatoren, welche zur transmembranären Aktivierung führen. Somit kommt es zur Signaltransduktion von extra- nach intrazellulär. Nach Aktivierung, ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B befähigt, in den Zellkern zu translozieren und dort an die Promotorregion der DNA zu binden. Konsekutiv werden pro-inflammatorische Zielgene transkribiert, post-translational modifiziert und die pro-inflammatorischen Mediatoren in die systemische Zirkulation sezerniert.

Um diese Ziele zu klären, wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Teilziele erarbeitet:

- i) Lässt sich in humanen Immunzellen der angeborenen Immunabwehr (Monozyten, PMN-Granulozyten) gesunder Probanden unter Nativbedingungen nukleäre Translokation von NF- κ B mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA detektieren bzw. ist durch artifizielle Stimulation mittels bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS aus *E. coli*) NF- κ B-Translokation induzierbar in gesunden Probanden?
- ii) Gibt es Veränderungen der transkriptionalen NF- κ B-Aktivität in den spezifischen Zellreihen der primären, unspezifischen Immunabwehr in der posttraumatischen Phase bis 72 Stunden nach Trauma?
- iii) Gibt es gemeinsame klinische Kriterien, die einer Änderung der nukleären Translokation von NF- κ B in humanen Monozyten und Granulozyten entsprechen?

3. Patienten und Methoden

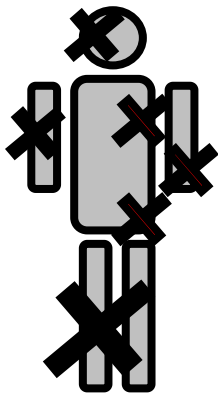
3.1 Studiendesign

Nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission (AZ: 012/00) wurde diese prospektive Studie von 01/2001 bis 06/2004 an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Diese Studie wurde durch die örtliche Stiftung Förderung der Forschung und Lehre (FOEFOLE 117) der Ludwig-Maximilians-Universität München unterstützt, sowie das Forschungsprojekt SFB 469 der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

3.2 Patienten

In unsere prospektiven Studie wurden polytraumatisierte Patienten im Alter von 18 bis 75 Jahren mit einem *New Injury severity Score* (NISS) von mindestens 16 Punkten eingeschlossen, die innerhalb von 90 Minuten nach Trauma den Schockraum unseres universitären Trauma Level I Centers erreichten. Eine schriftliche Einverständniserklärung entsprechend den Richtlinien der Ethikkommission lag von allen Patienten nach Wiedererlangung des Bewusstseins, oder falls nicht möglich, von gesetzlichen Vertretern oder nahen Verwandten vor. Ausgeschlossen wurden Patienten mit isoliertem Schädel-Hirn-Trauma, chronischen, malignen Erkrankungen, immunsuppressiver Therapie, sowie Patienten, die innerhalb der ersten 48 Stunden nach Trauma verstarben. Nach initialer Stabilisierung, Diagnostik und ggf. Primärversorgung gemäß den Polytrauma-Leitlinien der *Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie* (167) im Schockraum wurden die Patienten zur Weiterbehandlung auf die chirurgische Intensivstation aufgenommen.

3.3 Schweregradeinteilung der Mehrfachverletzungen



$$\text{Injury Severity Score, ISS} = a [\text{AIS}]^2 + b [\text{AIS}]^2 + c [\text{AIS}]^2$$

Die Schweregradeinteilung erfolgte gemäß dem *Injury Severity Score* (ISS) nach *Greenspan* (168): Zur Klassifikation der Traumaschwere wird hierbei der Körper in sechs Regionen eingeteilt (Oberfläche, Kopf und Gesicht, Hals, Thorax, Abdomen und Becken, Wirbelsäule und Extremitäten), die jeweils in ihrem Verletzungsschweregrad auf einer Skala zwischen 1 (unwesentliche Verletzungen) und 5 (maximal kritische Verletzung mit unsicherer Überlebenschance) bewertet werden.

Der ISS wird definiert als die Summe der Quadrate des Punktescores der drei schwersten Verletzungen. Es stellt eine etablierte und seit vielen Jahren anerkannte Möglichkeit zur Klassifikation der Traumaschwere dar und erlaubt eine Aussage über voraussichtliche Morbidität und Mortalität (169). Die Dokumentation erfolgte anhand des NISS in der Modifikation nach *Ossler* (170).

Während der konventionelle ISS die strikte Untertrennung nach Körperregionen vorsah und somit nur jeweils eine Verletzung derselben Region berücksichtigt werden konnte, repräsentiert der NISS die anatomische Verletzungsschwere exakter bei Erfassung der drei schwersten Verletzungen unabhängig von der Region.

3.4 Dokumentation und epidemiologische Daten

In diesem Zusammenhang erfolgten die Erfassung der Vitalparameter, (Temperatur, Herzfrequenz, systolischer, diastolischer und arterieller Mitteldruck), sowie der serologischen, und hämatologischen Parameter (Gerinnungs-, Infektparameter, Blutbild, organspezifische Verlaufparameter), darüber hinaus der Beatmungsparameter (Atemfrequenz, Beatmungsmodi, Druckunterstützung bzw. positiver endexpiratorischer Druck, PEEP, pH-Wert und Basenüberschuss an Hand von Blutgasanalysen), sowie des therapeutischen Regimes täglich fortlaufend über den gesamten Studienzeitraum gemäß den Vorgaben des *Trauma-Registers der Arbeitsgemeinschaft Polytrauma der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie* (167).

3.5 MOF-Score

Um das posttraumatische Organversagen quantitativ erfassen zu können, wurden zu jedem Blutabnahmezeitpunkt zusätzlich die Parameter zur Berechnung des MOF-Scores nach *Goris* in der Modifikation nach *Lefering* dokumentiert (171). Die Mortalität der Patienten wurde über einen Zeitraum von 80 Tagen nach Trauma dokumentiert.

Im Rahmen des MOF-Scores werden die vitalen Funktionen der Organe Lunge, Herz/Kreislauf, Leber, Niere und Blut mit einem Einzelpunktwert von 0 bis 2 Punkten versehen. 0 Punkte werden für uneingeschränkte Funktion bzw. minimale Organdysfunktionen vergeben.

Ein Punkt wird jeweils für maschinelle Beatmung bis zu einem positiven end-expiratorischen Druck, PEEP < 10mmHg und inspiratorischen Sauerstoffpartialdruck, $FiO_2 < 0.4$, bei bestehendem systolischen RR > 100mmHg mit Hilfe geringer Dosen vasoaktiver Substanzen, sowie bei Serumkreatininwerten > 2mg/dl; SGOT > 25U/l, Bilirubin > 2mg/dl; bestehender Leukozytose > 30.000/ μ l, Thrombozyten < 50.000/ μ l.

Das Maximum von 2 Punkten wird vergeben, wenn hochgradige Organdysfunktionen bestehen, wie maschinelle Beatmung mit einem PEEP > 10mmHg und $FiO_2 > 0,4$; RR < 100mmHg und/oder notwendigen hohen Dosen vasoaktiver Substanzen, Hämofiltration oder Hämodialyse; SGOT > 50U/l, Bilirubin > 6mg/dl; Leukozytose > 60.000/ μ l oder Leukopenie < 2.500/ μ l. Der MOF-Score wurde zu jedem Abnahmezeitpunkt neu berechnet, nach Ablauf der 72-stündigen Detektion einmal täglich.

Als unabhängige klinische Parameter für die Entwicklung eines MOF wurden in verschiedenen Studien die initiale Transfusionsrate, sowie der initiale Basen-Überschuss und die Laktatkonzentration identifiziert (172-176). Daher wurden der initiale Basen-Überschuss, die Transfusionsrate, sowie die Laktatkonzentrationen in der frühen posttraumatischen Phase, d.h. initial im Schockraum, sowie nach 12 und 24 Stunden dokumentiert.

3.6 Protokoll

Diese Grafik zeigt schematisch das Zeitfenster der experimentellen Blutentnahmen mit konsekutiver Zellisolation und im Weiteren aufgeführten Materialgewinnung. Schwer verletzte Patienten mit einem *New Injury Severity Score*, NISS (177;178) von mindestens 16 Punkten wurden eingeschlossen. Gemäß unten dargestelltem Protokoll wurden jeweils initial bei Aufnahme [A] im Schockraum der Klinik innerhalb von 90 Minuten nach Trauma, sowie standardisiert 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma 30ml Blut (EDTA-Blut, Citrat-Blut, Serum) entnommen.

Diese Grafik zeigt schematisch die konsekutiven Zeitpunkte der Probengewinnung; dabei bezeichnet [A] die initiale Blutentnahme zum Zeitpunkt der Aufnahme in unsere Klinik, welche innerhalb von 90 Minuten nach Trauma erfolgen muss. Die folgenden Blutentnahmen erfolgten standardisiert zum Traumazeitpunkt nach 6h, 12h, 24h, 48h und 72h auf der chirurgischen Intensivstation.

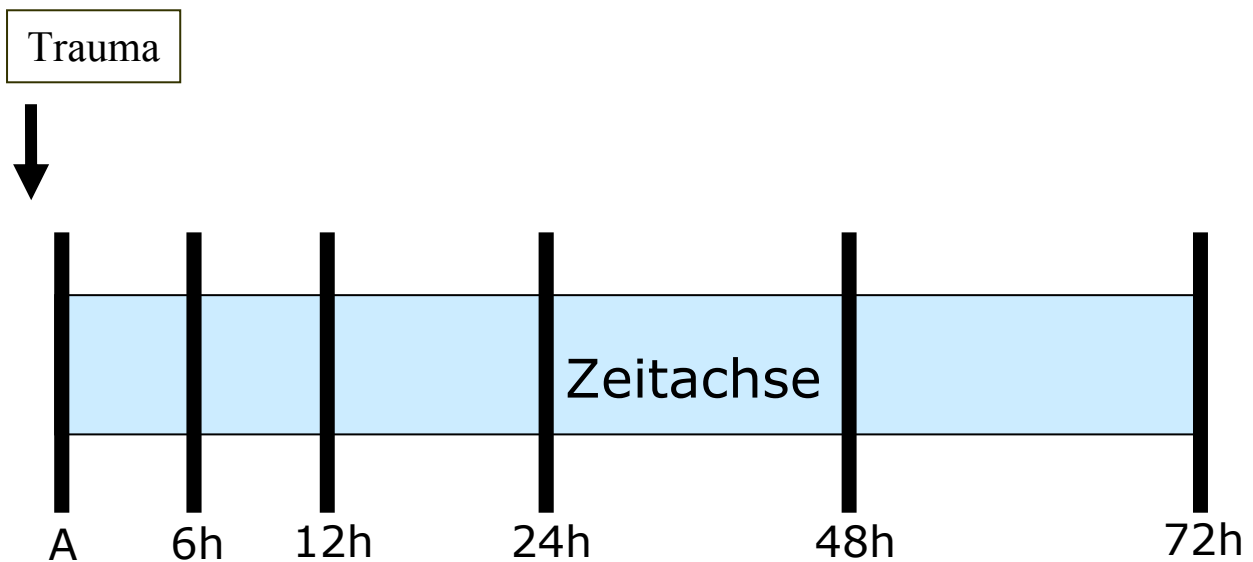


Abb. 6: Schematische Darstellung der Zeitachse der Probengewinnung. Die initiale Blutentnahme erfolgte im Schockraum innerhalb von 90 Minuten nach Trauma, sowie die weiteren Abnahmen standardisiert zum Unfallzeitpunkt nach 6h, 12h, 24h, 48h und 72h.

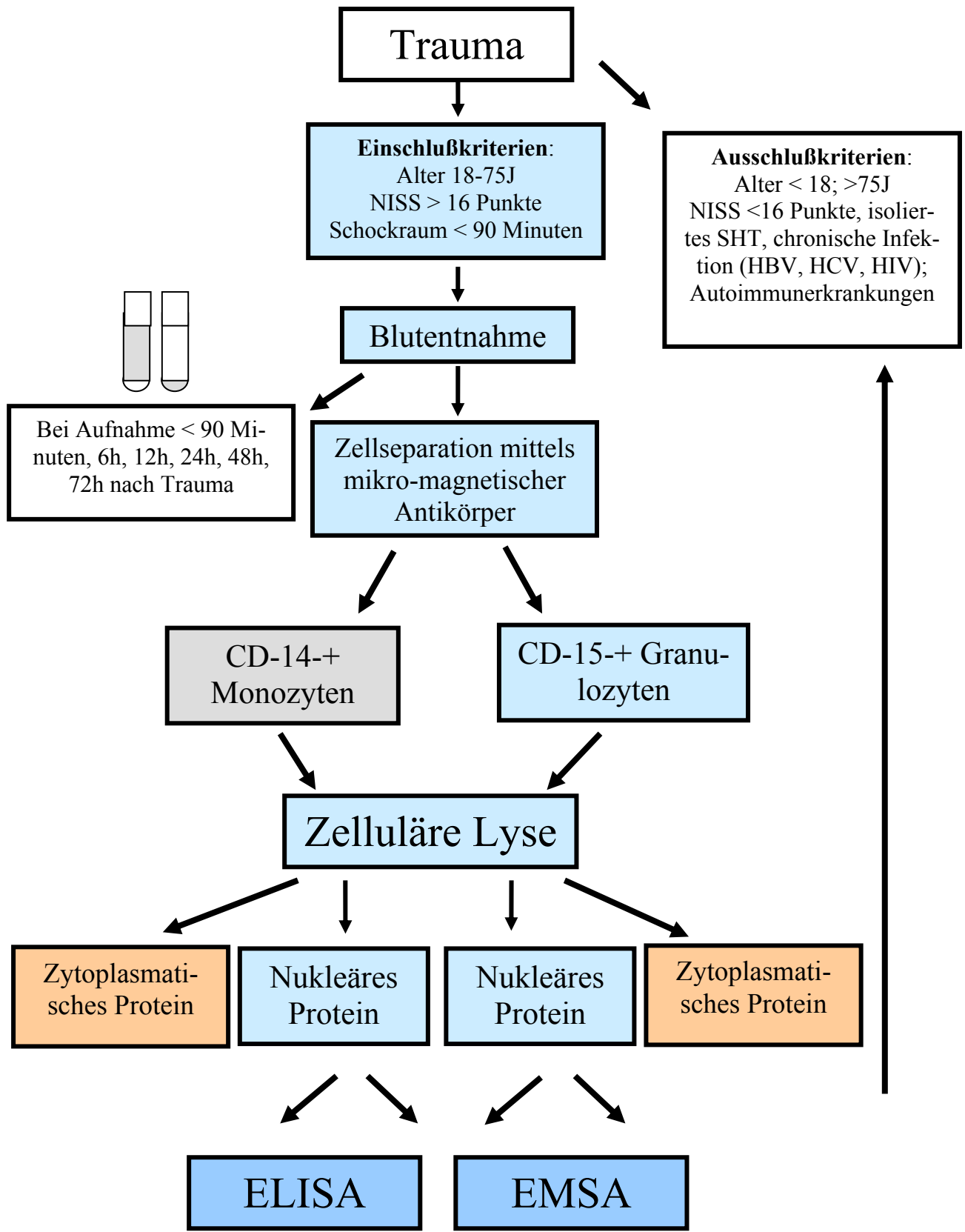


Abb.7 : Schematische Darstellung des experimentellen Studienprotokolls bestehend aus zeitlich eng gestaffelten Blutentnahmen, sowie Isolierung des nukleären und zytoplasmatischen Proteins, Analyse mittels EMSA- und ELISA-Experimenten, sowie Ein- und Ausschlusskriterien

3.7 Zellseparation

Zunächst wurden die Erythrozyten von je 7,5ml entnommenen EDTA-Vollblutes einer chemischen Lyse mittels jeweils 42,5ml Lysepuffers [155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃ und 0,1M EDTA-Puffer, pH 7,2] durch 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unterzogen. Dieser Vorgang wurde zweifach wiederholt, um eine komplette Lyse der Erythrozyten zu gewährleisten. Das Zell-Pellet wurde in 500µl PBS/EDTA-Puffer (2mM EDTA-haltiger *phosphate buffered saline*) resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Zellsuspension bei 250g für 10 Minuten. Hierauf wurde das Volumen mittels PBS/EDTA-Puffer auf 15ml justiert und die Zellen erneut zentrifugiert (450g, 10 Minuten, 20°C). Anhand einer Verdünnungsreihe wurde mikroskopisch die Gesamtzellzahl der verbleibenden Leukozyten unter Berücksichtigung des Gesamtvolumens der Zellsuspension bestimmt (Neugebauer-Zählkammer, Vergrößerung 10x10). Mittels magnetischer Zellisolierung durch CD14-/CD15-Antikörper-beschichtete micro-magnetic-beads (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA) wurden nach 15-minütiger Inkubation bei 4°C mit Hilfe des magnetischen Separationssystems MiniMACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA) CD14-positive Monozyten, sowie CD15-positive Granulozyten aus der Zellsuspension isoliert. Für 1x10⁶ Monozyten wurde laut Empfehlung des Herstellers ein Volumen von 20µl, bzw. 0,5x10⁸ Granulozyten ein Volumen von 200µl der micro-magnetic beads eingesetzt. Das Zell-Pellet wurde in 500µl PBS/EDTA-Puffer resuspendiert und auf einer Hochgradienten-Magnet-Zellseparationssäule aufgetragen (Miltenyi Biotech). Die Säule wurde dreimal mittels PBS/EDTA-Puffer gespült und dann aus dem Magnetfeld entfernt. Die Zelleluatation erfolgte mittels 1ml PBS/EDTA-Puffer. Die Reinheit der isolierten Proben wurde anhand von Blutproben dreier gesunder Probanden mittels Durchflusszytometrie, FACS, (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) kontrolliert. Zu jedem Abnahmezeitpunkt wurden standardisiert Blutaussstriche, sowie Differentialblutanalysen der polytraumatisierten Patienten im Labor der klinischen Chemie unserer Klinik angefertigt.

3.8 Kontrollen

Acht gesunde, junge Probanden, im Alter zwischen 23 und 37 Jahren denen in analoger Weise Blut entnommen wurde, dienten als Kontrollen. Aus der Hälfte des entnommenen EDTA-Vollblutes wurden auf beschriebene Weise nativ mittels magnetischer Zellseparation Monozyten und Granulozyten isoliert, sowie Zytoplasma und nukleäres Protein gewonnen. Die andere Hälfte fungierte als Positivkontrolle, indem das entnommene Blut mit 1%-igem Lipopolysaccharid, LPS aus E.coli 026:B6, Lipopolysaccharid 10µl (LPS, 100 ng/ml: aus Escherichia coli, Serotyp 055:B5, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) für 2,5h inkubiert wurde

(179). Die zu stimulierenden Zellen wurden bei 37°C auf einem Zellschüttler in ständiger Bewegung gehalten, um Zelladhäsion an den Gefäßwänden der Reagenzröhrchen zu vermeiden. Nach Inkubation wurden die Erythrozyten lysiert, CD14-positive Monozyten und CD15-positive PMN-Granulozyten isoliert, sowie nukleäres Protein extrahiert.

3.9 Nukleäre Extraktion

1×10^6 Monozyten bzw. $0,5 \times 10^8$ Granulozyten der Patienten- und Probandenproben wurden in eiskaltem Lysepuffer B [(10mM HEPES, pH 7,9, 10mM KCl, 0,1mM EDTA, 1mM Dithiothreitol, DTT, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF, 1% Proteaseinhibitor-Komplex der pro ml enthaltenen Komponenten: 5mg Antipain, 12,5mg Aprotinin, 12,5mg Leupeptin, 8mg Pepstatin, 10mg Bestatin, 4mg Phosphoamidon, 5mg Trypsininhibitor, 0,4% NP40)] suspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert, wodurch eine Lyse der Zellmembranen herbeigeführt wurde. Die Suspension wurde anschließend 10 Minuten bei 2000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand der Suspension entspricht der freigesetzten zytosolischen Fraktion der lysierten Zellen, der anschließend in sterilen *Eppendorf*-Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C eingefroren wurde. Dieser Vorgang wurde bedarfsweise wiederholt, um eine höhere Ausbeute zu erhalten, bzw. um die Reinheit der Isolierung zu verbessern. Die Pellets wurden wiederum mit eiskaltem Lysepuffer C [(20 mM HEPES, pH 7,9, 0,4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM Dithiothreitol, DTT, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF, 1% Proteaseinhibitor-Komplex (pro ml: 5mg Antipain, 12,5mg Aprotinin, 12,5mg Leupeptin, 8mg Pepstatin, 10mg Bestatin, 4mg Phosphoamidon, 5mg Trypsininhibitor, 0,4% NP40)] resuspendiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 15 Minuten kräftig geschüttelt. Dadurch erfolgte sowohl eine chemische, als auch mechanische Lyse der Kernmembranen zur Freisetzung von nukleärem Protein. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (450g, 10 Minuten, 4°C). Das nukleäre Protein der beiden Zellreihen wurde ebenfalls in sterile *Eppendorf*-Gefäße überführt und bei -80°C aufbewahrt. Die Effizienz der nukleären Lyse erfolgte mikroskopisch an Hand von Ausstrichpräparaten. Waren mikroskopisch noch intakte Zellkerne nachweisbar, wurden die nukleären Lyse-Vorgänge mittels chemischer und mechanischer Lyse bei 4°C wiederholt und erneut mikroskopisch kontrolliert.

3.10 Protein-Quantifizierung

Die quantitative Gesamt-Proteinbestimmung in den nukleären, sowie den zytosolischen Extrakten erfolgte mittels *Bradford*-Protein-Assays photometrisch laut den Maßgaben des Herstellers bei 260nm.

3.11 EMSA

Die EMSA-Methodik wurde durch diese Arbeit im Labor für Experimentelle Chirurgische Forschung der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der LMU Campus Innenstadt etabliert.

3.11.1 Etablierungsversuche

Zunächst erfolgten Versuchsreihen mittels Proben freiwilliger Probanden zur Protokoll-Etablierung. Dafür wurde nukleäres Protein (0,5 – 8µg) der Probanden in aufsteigender Reihenfolge des EMSA-Verfahrens gel-elektrophoretisch aufgetrennt. Die Kontrollreihen wurden in verschiedenen Konzentrationen der zugehörigen Substanzen, bei verschiedener Temperatur, sowie zu verschiedenen Inkubationszeiten getestet. Anhand von Probandenproben wurde das Verfahren etabliert, wobei sich ein Optimum bei 2µg nukleären Proteins nachweisen ließ. Auf der Grundlage dieser Versuchsreihen erfolgte im Anschluss die Analyse der Polytraumaprobe nach standardisiertem Protokoll. Die Etablierungsreihe ist im Folgenden grafisch dargestellt.

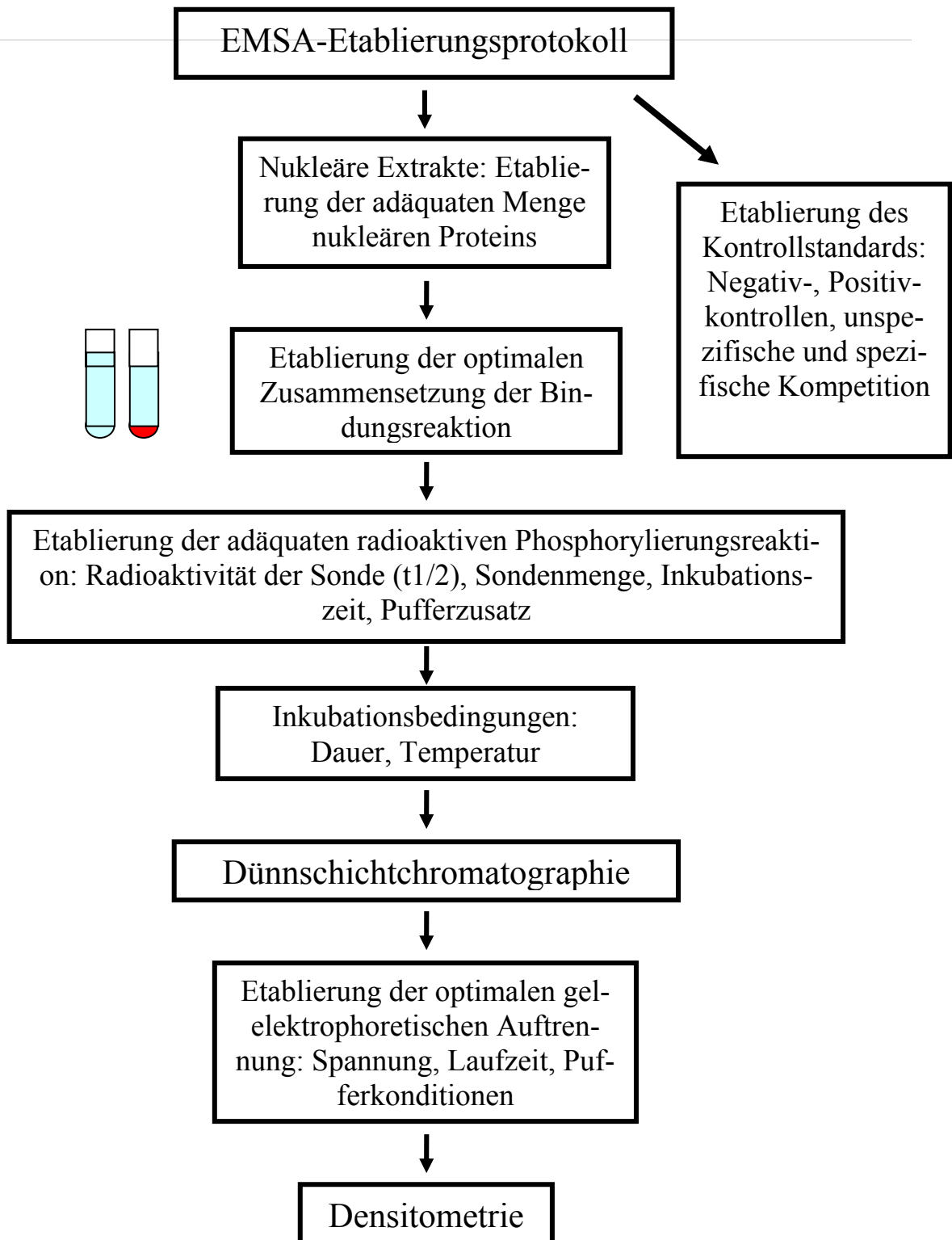


Abb.8 : Diese Grafik gibt schematisch das Protokoll der EMSA-Etablierungsversuchsreihe wieder. Zunächst erfolgte die Optimierung der quantitativen Menge nukleären Proteins anhand von Probandenproben. Anhand von Versuchsreihen wurden die optimalen Pufferzusammensetzungen etabliert. Das Optimum der Phosphorylierungsreaktion inklusive Milieuoptimierung (pH-Wert, Temperatur, Bindungszeiten) mittels radioaktiv markierter Sonde erfolgte anhand von Probandenmaterial mit anschließender densitometrischer Analyse.

3.11.2 EMSA-Protokoll

Pro Versuchsansatz wurden 1 μ l T₄-Polynukleotidkinase (5-10u/ μ l), 1 μ l T₄-Polynukleotidkinasepuffer, 1 μ l der nachzuweisenden konsensuellen Oligonukleotide mit 1 μ l γ -³²P-ATP (10.000 MBq) bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 1 μ l 0,5M EDTA-Lösung, um die Phosphorylierungsreaktion zu stoppen wurde das Gesamtvolumen durch Zugabe von 89 μ l Tris-EDTA-Puffers erhöht. Die radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonde wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Sephadex, G50 *Quick spin columns for radiolabeled oligonucleotides*, Roche, Mannheim, Germany) aufgereinigt. Die Radioaktivität der Säuleneleuate wurde mittels β -Counters gemessen. Pro Zellart und Abnahmezeitpunkt wurden 2 μ g des extrahierten nukleären Proteins eingesetzt und 15 Minuten mit 5 μ l Lysepuffer C [(20 mM HEPES, pH 7,9, 0,4M NaCl, 1 mM EDTA, 1mM Dithiothreitol, DTT, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF, 1% Proteaseinhibitor-Komplex (s.o.))] und 2 μ l *Binding Buffer* [(40% Glycerin, 10 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 500 mM NaCl, 100mM TrisHCl, pH 7,5, vorher auf 45°C erwärmten poly(dI-dC) (Roche, Mannheim, Deutschland)] inkubiert. Anschließend wurde der nukleäre Extrakt mit den nachzuweisenden, radioaktiv markierten Oligonukleotiden 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

3.11.3 EMSA

Die transkriptionale Aktivität von NF- κ B in Monozyten und Granulozyten der polytraumatisierten Patienten wurde mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA analysiert. Dabei wurden doppelsträngige Oligonukleotide der konsensuellen Oligonukleotidsequenz von NF- κ B (sense: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG, antisense: 3' -TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5', Promega, Madison, WI, USA) wurden mit Hilfe von Polynukleotid-T₄-Kinase, in T₄-Polynukleotidkinase-10xPuffer (Promega, Madison, WI, USA) am 5'-Ende einer radioaktiven Phosphorylierungsreaktion mit [γ -³²P-ATP], [HWZ 14,3d (Hartmann Analytik, Braunschweig, Deutschland)] unterzogen.

3.11.4 EMSA-Kontrollen

In jedem Testansatz wurden standardisiert Positiv-, Negativkontrollen, sowie Kompetitionen mittels spezifischer und unspezifischer Oligonukleotide mit Hilfe kommerzieller, synthetischer Komponenten durchgeführt.

Als Negativkontrolle wurden pro Ansatz 7 μ l nukleasefreies H₂O, 1 μ l Gel Shift 5xBinding Buffer (Promega, Madison, WI, USA), als Positivkontrolle 5 μ l nukleasefreies H₂O, 2 μ l Gel

Shift 5xBinding Buffer, 2µl HeLa Nuclear Extract (Promega, Madison, WI, USA) mit 1µl Sonde (sense: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG, antisense: 3' -TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5', Promega, Madison, WI, USA) versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die spezifische Kompetition wurden 4µl nukleasefreies H₂O, 2µl Gel Shift 5xBinding Buffer, 2µl HeLa *Nuclear Extract*, sowie 1µl der ungelabelten, nachzuweisenden konsensuellen NF-κB-Oligonukleotide 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1µl der radioaktiven Sonde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die unspezifische Kompetition erfolgte durch Zugabe von 2µl Gel Shift 5xBinding Buffer, 2µl HeLa Nuclear Extract und 1µl unspezifischer Oligonukleotide, z.B. SP1, (sense: 5'-ATT CGA TGC GGG CGG GGC GAG C-3', antisense: 3' -TAA GCT AGC CCC GCC CCG CTC G-5', Promega, Madison, WI, USA), oder AP2, (sense: 5'-GAT CGA ACT GAC CGC CCG CGG CCC GT-3', antisense: 3'-CTA GCT TGA CTG GCC GGC GCC GGG CA-5', Promega, Madison, WI, USA) in 4µl nukleasefreies H₂O, die für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubierten. Anschließend wurde 1µl der radioaktiv markierten DNA-Sonde zugegeben und einer erneuten 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur unterzogen. Die spezifische Kompetition erfolgte mittels 1µl NF-κB (sense: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG, antisense: 3' -TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5', Promega, Madison, WI, USA) ohne anschließende Sondenzugabe. Jeder Probe wurden 1-2µl Bromphenolblau-Glyzerin-1xTBE-Lösung zugegeben.

3.11.5 Elektrophoretische Auftrennung

Mittels *Electrophoretic mobility shift assays*, EMSA erfolgte die Auftrennung der radioaktiv markierten, nukleären Proben. Dazu wurden 5%-igen Acrylamidgele [(AabAa 40%, Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 1xTris-Borat-EDTA, 10%APS, Ammoniumpersulfat (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), TEMED, N,N,N,N'-Tetraethylendiamin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)] hergestellt. Polymerisation erfolgte innerhalb einer Stunde. Währenddessen erfolgte ein Vorlauf der nativen Gele bei 20V für eine Stunde. Die Gelelektrophorese (Penguin Doppelsystem P9DS, Peqlab, Erlangen, Deutschland) wurde bei 80V für 2,5h in 50mM Tris, 45mM Borsäure, 0,5M EDTA bei pH 8,4 und 4°C durchgeführt. Nach erfolgter Auftrennung, die mittels der nach distal gewanderten Bromphenolblau-Bande kontrolliert wurde, wurden die Acrylamidgele auf Filterpapier (Whatman, Maidstone, UK) aufgebracht und für 30-60 Minuten vakuum-getrocknet. Unter Verwendung von Verstärkerfolien (Amersham pharmacia biotech, Buckinghamshire, UK) wurden die Gele in Röntgenkassetten auf Röntgenfilme (Biomax MS1, 18x24 Kodak, Rochester, NY, USA) aufgelegt. Durch

die Kernzerfälle des inkorporierten ^{32}P Phosphor wurden die Röntgenfilme an den relevanten Stellen transkriptionaler Aktivität belichtet. Die Exposition erfolgte für ein bis sieben Tage bei -70°C , um Artefakte zu vermeiden, sodann nach Abschluss der Validierungsversuche standardisiert für 48h bei -70°C .

3.11.6 Quantitative Analyse

Die Filme wurden mittels eines kommerziellen Scanners (Epson GT-10000, SEIKO EPSON Corp., Düsseldorf, Germany) unter der Auflösung von 200 *dots per inch* (d.p.i.) digitalisiert und als TIF-files gespeichert. Die Quantifizierung der geschwärzten Areale auf den Röntgenfilmen erfolgte Computer-gestützt mittels eines densitometrischen Verfahrens und die Ergebnisse wurden als Quotient der jeweiligen Probe im Verhältnis zur Baseline der unstimulierten Negativkontrollen in [arbitrary units] angegeben.

3.12.1 Enzym-linked-immuno-sorbent-assay

Parallel zu den gelelektrophoretischen Analysen der transkriptionalen Aktivität von NF- κ B wurden kommerziell erhältliche *enzym-linked immuno sorbant assays*, ELISA (BD Mercury TransFactor Kit, BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA) zum Nachweis der relevanten p50-Untereinheit von NF- κ B in nukleären Proben nach Maßgaben des Herstellers durchgeführt.

3.12.2 Sandwich-ELISA

Dabei wurden die einzelnen Vertiefungen (*wells*) einer Mikrotiterplatte mit einem spezifischen gegen das Antigen gerichteten, monoklonalen Antikörper beschichtet. Die Antigen enthaltenden Proben (nukleäres Protein), verschiedene Verdünnungen des bekannten Standards wurden in die einzelnen Vertiefungen pipettiert. Während der Inkubationszeit wurden die vorhandenen Proteinmoleküle an den immobilisierten Antikörper gebunden. Nach einem Waschvorgang, in dem alle ungebundenen Proteine entfernt wurden, folgte die Zugabe eines zweiten, enzymkonjugierten, polyklonalen Antikörpers, der gegen ein anderes Epitop auf der Moleküloberfläche gerichtet war („Sandwich“). Nach einem erneuten Waschvorgang erfolgte die Zugabe einer chromogengebundenen Substratlösung. Die daraufhin auftretende Farbentwicklung wurde sodann gestoppt und die optische Dichte aller Proben in einem Spektrophotometer (ELISA Reader) definierter Wellenlänge (260nm) gemessen.

Dazu wurden 5µg des isolierten nukleären Proteins mit *1xTransFactor/ Blocking Buffer* in einem Gesamtvolumen von 50µl auf 96-well Mikrotiterplatten (BD Biosciences Clontech) aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur auf der Schüttler-Plattform inkubiert. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend dreimal mit jeweils 150µl *1xTransFactor/ Blocking Buffer* gewaschen. Hierauf erfolgte ein Absättigungsschritt mittels in Waschpuffer verdünnter 5%-iger boviner Serumalbumin-Lösung, (BSA, Sigma Aldrich, München, Deutschland) für eine Stunde auf dem Zellschüttler, um Artefakte zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Inkubation von 100µl/well des Erstantikörpers (BD Biosciences Clontech) in einer Endkonzentration von 1:5.000 für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Zellschüttler. Die Platten wurden dreimal gewaschen und daraufhin mit jeweils 100µl/well des Zweitantikörpers (*goat-against-rabbit-IgG-HRP*, BD Biosciences Clontech) in einer Konzentration von 1:1.000 unter den beschriebenen Konditionen für eine Stunde inkubiert.

Die Platten wurden viermaliger Waschschrte unterzogen mit reinem *1xTransFactorBuffer* ohne *Blocking reagent*, um den Hintergrund zur Detektion der photometrischen Signale möglichst gering zu halten. Anschließend wurden pro well 100µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, TMB (BD Biosciences Clontech) als Substrat zur photometrischen Detektion zugegeben und 10 Minuten unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Die eintretende Blaufärbung durch enzymatische Reaktion wurde kontrolliert, gegebenenfalls, bei schwacher Reaktion, wurde die Inkubationszeit bis zu maximal 30 Minuten verlängert.

Die Werte wurden anschließend mit Hilfe des integrierten Computerprogramms analysiert, indem zunächst aus den Antigenkonzentrationen der Standardlösungen eine Standardkurve erzeugt wurde und anschließend die unbekannt Konzentrationen der Proben durch Interpolation bestimmt wurden. Die Absorptionmessung des umgesetzten Substrates erfolgte bei 655nm im *ELISA-Reader*.

3.12.3 ELISA-Kontrollen

Bei jeder Messung wurden standardisiert Negativkontrollen, in Form von äquivalenten Volumina *1xTransFactor/Blocking Buffer* mitgeführt. Als Positivkontrollen fungierten LPS-stimulierte Probanden-Proben (s.o.). Standardisiert erfolgte in jedem ELISA die Messung einer Kontrollreihe, indem konsekutiv jeweils ein Inkubationsschritt des ELISA-Protokolls ausgelassen wurde, um unspezifische Bindungen oder falsch-positive Detektion auszuschließen. Die erste Kontrolle dieser Reihe, die kein nukleäres Protein enthielt, diente der Hintergrundmessung, verursacht durch die Pufferzugabe. Anhand der zweiten Kontrolle wurde die Detektion des eingesetzten bovinen Serumalbumins kontrolliert. Aus diesem Grund entfiel bei

dieser der Absättigungsschritt mit 5-%BSA. Die dritte Kontrolle erfolgte ohne Zugabe des Erstantikörpers, um unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers an die ELISA-Platte auszuschließen. Bei der vierten Standardkontrolle wurde kein Zweit-Antikörper zugegeben, um unspezifische Bindungen des verwendeten Erstantikörpers mit TMB erfassen zu können. Um die Qualität der enzymatischen Umsetzungsreaktion zu validieren, wurde bei der fünften Kontrolle die Zugabe des TMB-Substrates unterlassen.

3.12.4 Statistische Auswertung

Die EMSA-Ergebnisse der intranukleären DNA-Proteinbildungskapazität von NF- κ B, sowie der nukleären NF- κ B-Proteinkonzentrationen der durchgeführten ELISAs sind jeweils als Mittelwerte \pm SEM in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Trauma angegeben. Zur Detektion statistisch signifikanter Unterschiede der NF- κ B-Bindung, bzw. -Expression mit der Traumaschwere, repräsentiert durch den initialen ISS, dem pathophysiologischen Status der eingeschlossenen Patienten, repräsentiert durch den MOF-Score, zu vergleichen, wurde zusätzlich der Pearson's Korrelationskoeffizient berechnet. Die Werte wurden mittels ANOVA *on ranks* gegenüber den Kontrollgruppen, sowie dem initialen Wert bei Aufnahme in die Klinik verglichen und mittels Student-Newman-Keuls (SNK), innerhalb der Gruppe entlang der Zeitachse analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen wurde mittels unabhängigem t-Test, ANOVA *on ranks* und Kruskal-Wallis-Test überprüft. Klinische Daten bezüglich der Traumaschwere, repräsentiert durch den initialen NISS, sowie des pathophysiologischen Status der eingeschlossenen Patienten, repräsentiert durch den MOF-Score, Anzahl transfundierter Erythrozytenkonzentrate oder Fresh Frozen Plasma-Einheiten, wie auch die ergebnisse der EMSAs und ELISAs sind als MW \pm SEM angegeben. Als post-hoc Verfahren kam jeweils Dunn's Methode zur Anwendung bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Für alle statistischen Berechnungen wurde Sigma Stat[®] 3.0 Software package (SPSS[®] Inc., Chicago, USA) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Epidemiologische Daten

In unsere prospektive Studie wurden 15 polytraumatisierte Patienten eingeschlossen. Das mittlere Alter der Patienten betrug 48 ± 12 Jahre [MW \pm SEM], 11 der eingeschlossenen Patienten waren männlich, 4 weiblich. 11 Patienten überlebten ihre Verletzungen, vier Patienten verstarben im posttraumatischen Verlauf auf Grund eines Multiorganversagens im Zeitraum von 22 - 80 Tagen, im Mittel nach $26,3 \pm 11,2$ d.

4.2 Schweregrad der Verletzungen

Der NISS der eingeschlossenen Patienten betrug 24 bis 57 Punkte, der Mittelwert 34 ± 8 Punkte. Das Verletzungsmuster, sowie der NISS-Score der einzelnen Patienten sind in **Tabelle 1** wiedergegeben (s.u.).

Tabelle 1: Epidemiologische Daten bezüglich Alter, Geschlecht, NISS-Score, Transfusionsrate und klinischem outcome

	Alter	Geschlecht	Verletzungsmuster	NISS	EK	FFP	Klinisches outcome (90d)
I	18	M	SHT°III, Lungenkontusionen bds., Herzkontusion, Rippenserienfraktur, HWK-Frakturen, Leberruptur°II	57	17	19	Neurologisches Defizit
II	38	M	SHT°III, Lungenkontusion, subtotal Amputation der unteren Extremität	29	25	22	†
III	59	M	Rippenserienfraktur, Hämato-pneumothorax, Lungenkontusion, Zwerchfellruptur, Herzkontusion, Milzruptur, A. mesenterica Ruptur, Frakturen der Scapula, Ulna, Tibia, des Femurs und Becken	50	50	55	†
IV	33	M	Lungenkontusion, Herzkontusion Rippenserienfraktur links, LWK-III Fraktur, Nierenkontusion, Milzhämatom	34	16	38	Restitutio ad integrum
V	74	W	SHT°III, Frakturen des Humerus, Becken und Sacrum	43	26	22	†
VI	44	W	SHT°III, Spinalkanalblutung, Rip-penserienfraktur, Hämato-pneumotho-rax, Lungenkontusion, subkapsuläres Milzhämatom °I	36	5	5	Restitutio ad inte-grum
VII	33	M	SHT°I, Lungenkontusion, multiple Frakturen der unteren Extremität	16	11	32	Restitutio ad inte-grum
VIII	45	M	SHT°II, SDH, Rippenserienfraktur, Scapulafraktur, Lungenkontusion, °II offene Frakturen der unteren Extre-mität	29	4	5	Restitutio ad inte-grum
IX	34	M	Thoraxtrauma, Herzkontusion, stumpfes Bauchtrauma, Leberruptur, Nierenkontusion rechts, HWK-Fraktur, untere Extremitätenfrakturen	34	34	49	Restitutio ad inte-grum
X	57	W	SHT°I, Lungenkontusion, BWK-Frakturen, Beckenfraktur, multiple Frakturen der unteren Extremität	27	4	6	Motorisches und sensibles Defizit der unteren Extremität
XI	78	M	SHT°III, SDH, Frakturen der Tibia, Fibula und des Becken	38	4	0	Neurologisches Defizit nach SHT
XII	75	M	SHT°II, Schädellazeration, Lungen-kontusion, Rippenserienfraktur rechts, Hämato-pneumothorax, C-Fraktur des Becken	24	6	2	Restitutio ad integrum
XIII	33	W	SHT°III, SAB, Lungenkontusion, Rippenserienfraktur, Scapulafraktur, °II-ig offene OSG-Fraktur	29	12	10	Neurologisches Defizit nach SHT
XIV	74	M	SHT°I, °III offene Humerusfraktur, schweres Beckentrauma mit retrope-ritonealem Hämatom	25	18	12	†
XV	29	M	SHT°II, Le Fort II/III N. opticus Laceration, Lungenkontusion, Häma-topneumothorax, Rippenserienfrak-tur, schweres Beckentrauma, OSG-Fraktur, Sacrum-, Metacarpusfraktur	41	19	12	Restitutio ad integrum

4.3 SIRS

Alle eingeschlossenen Patienten zeigten die Symptome eines posttraumatischen SIRS. Die Herzfrequenz bei Aufnahme betrug 98 ± 28 /min, der mittlere arterielle Druck, MAP, 74 ± 21 . 10 Patienten (77%) benötigten Katecholamine bei posttraumatischer Kreislaufinsuffizienz. Die Atemfrequenz bei Aufnahme betrug 28 ± 10 /min, alle waren initial über mindestens 48h maschinell beatmet. Neun Patienten wurden initial massentransfundiert mit durchschnittlich $15,3 \pm 5,1$ Erythrozytenkonzentraten (etwa 300ml) und $14,2 \pm 4,7$ Frischplasmapräparaten, FFP, (ca. 250ml) innerhalb der ersten 12h bei initialem Hämoglobingehalt des Blutes von $10,2 \pm 2,9$ mg/dl. Der Transfusionsbedarf innerhalb der ersten 72h nach Trauma betrug 19 ± 5 Erythrozyten-Konzentraten, EK, $19,8 \pm 5,5$ *Fresh Frozen Plasma*, FFP, $1,6 \pm 0,4$ Thrombozyten-Konzentraten, TK. Der Einzelscore des NISS, sowie der Transfusionsbedarf an Erythrozyten-Konzentraten, FFP und Thrombozyten-Konzentraten, TK, der einzelnen Patienten innerhalb der ersten 72h nach Trauma, sowie das klinische Outcome der Patienten sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

Die Temperatur bei Aufnahme betrug $35,5 \pm 1,3^\circ\text{C}$. 6 Stunden nach Trauma war die durchschnittliche Leukozytenzahl $12.700 \pm 3.700/\mu\text{l}$. Fünf Patienten entwickelten eine posttraumatische Leukopenie ($1.200 \pm 340/\mu\text{l}$), vier eine Leukozytose ($18.300 \pm 5.283/\mu\text{l}$). Der Basenüberschuss (*base excess*, BE) bei Aufnahme betrug $-4,4 \pm 1,3$ mmol/l (s. **Tabelle 2**).

4.4 MOF

Der MOF-Score bei Aufnahme betrug $3,6 \pm 0,8$, nach 6 Stunden $4 \pm 1,1$, nach 12 Stunden $3,8 \pm 0,3$, nach 24 Stunden $3,5 \pm 1$, nach 48 Stunden $3,7 \pm 1$ und nach 72 Stunden $3,4 \pm 0,7$ Punkte. Elf Patienten entwickelten ein MODS, vier der polytraumatisierten Patienten verstarben auf Grund eines posttraumatischen pulmonalen, renalen, hepatischen und/oder kardialen Multiorganversagens nach $26,3 \pm 11,2$ Tagen.

Als Parameter für die Entstehung eines posttraumatischen MOF wurden die Laktatkonzentrationen bei Aufnahme, sowie nach 12 und 24h analysiert. Bereits bei Aufnahme ($4,6 \pm 0,8$ vs. $3,2 \pm 1,3$ mmol/l), sowie nach 6h ($4,8 \pm 0,9$ vs. $2,4 \pm 0,5$ mmol/l) und 12h ($4,8 \pm 1,5$ vs. $2,0 \pm 0,3$ mmol/l) zeigten im posttraumatischen Verlauf Verstorbene signifikant erhöhte Laktatkonzentrationen gegenüber überlebenden Patienten.

Hinsichtlich des klinischen Outcomes der Polytrauma-Patienten zeigte das Laktat als unabhängiger Parameter für die Entwicklung eines MOF hochsignifikante Unterschiede zwischen Überlebenden und Verstorbenen in der posttraumatischen Phase. Die Laktatkonzentrationen betragen bei Aufnahme $3,8 \pm 1,1$ mmol/l, nach 12 Stunden $7,3 \pm 2,1$ mmol/l, sowie nach 24 Stun-

den $2,7 \pm 0,7$ mmol/l. Die MOF-Kriterien hinsichtlich der Laktat-Konzentrationen zum Zeitpunkt der Aufnahme, nach 12h und 24h sind in **Tabelle 2** zusammengefasst, sowie in u.a. **Abb. 9** dargestellt. Dabei zeigten sich zu allen untersuchten Zeitpunkten hochsignifikante Unterschiede ($p=0,002$) zwischen den Laktat-Konzentrationen in überlebenden Patienten im Vergleich zu Patienten, die in der posttraumatischen Phase auf Grund eines MOF verstorben waren.

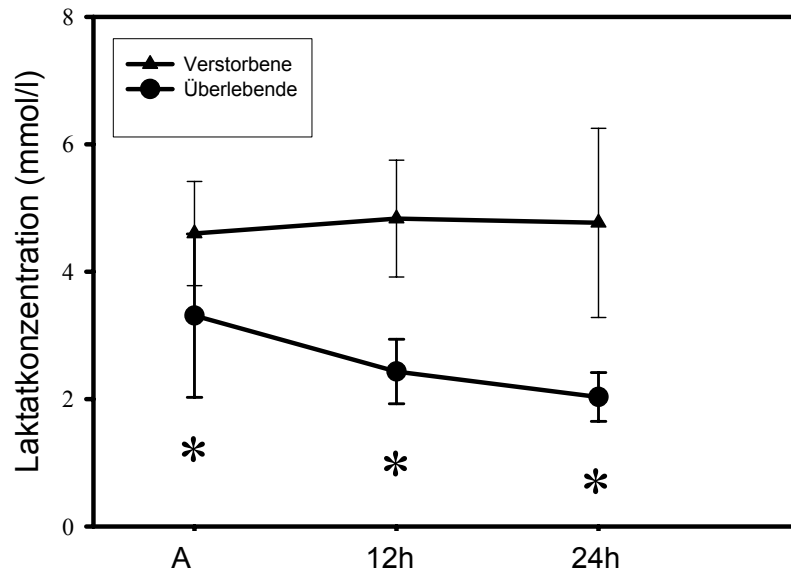


Abb. 9 : Die abgebildeten Laktatkonzentration zum Zeitpunkt der Aufnahme, sowie 12h und 24h nach Trauma zeigen signifikante Unterschiede zwischen Patienten, die ihre Verletzungen überlebten und Patienten, die in der posttraumatischen Phase auf Grund eines MOF verstarben;* $p=0,002$.

Tabelle 2: MOF-Kriterien

	Alter	Geschlecht	NISS	MOF	Initialer Hb [mg/dl]	Leuko- zyten bei Aufnahme [10 ³ /μl]	Laktat Initial [mmol/l]	Laktat nach 12h [mmol/l]	Laktat nach 24h [mmol/l]	Initialer BE [mmol/l]
I	18	M	57	4	9.9	1.2	13.2	3	1.8	-7.2
II	38	M	33	4	4.4	13.4	3.5	5.8	6.3	-7.6
III	59	M	57	5	8.7	5.3	6.2	5.7	6.2	-3.4
IV	33	M	34	4	10.4	3.8	3.2	4.4	2.6	-3
V	74	F	38	5	8.6	3.6	4.1	3.1	2.7	-10.8
VI	44	F	48	5	11.6	21.4	1.7	3.5	2.6	-6.6
VII	33	M	24	2	11.4	10.3	1.9	0.9	0.7	-2
VIII	45	M	29	4	12.4	11.1	1.3	0.9	0.8	-2.9
IX	34	M	34	3	8.6	3.9	4.2	3.7	3.5	-8.3
X	57	F	27	5	7.3	14.5	3.7	3,7	3.4	-7.6
XI	78	F	38	3	9.0	6.0	1.1	0.9	1.1	-6.4
XII	75	M	24	2	11.9	8.2	1.8	0.8	0.9	-1.3
XIII	33	M	29	4	11.1	8.6	0.8	0.7	0.5	-0.8
XIV	74	M	27	3	6.5	11.0	3.1	3.4	3.7	-2.3
XV	29	M	41	4	10.4	8.5	0.8	0.9	0.4	1.2

In **Tabelle 2** sind die sog. MOF-Kriterien zusammengefasst nach Alter, Geschlecht, NISS und MOF-Score der eingeschlossenen Patienten, der initiale Hämoglobingehalt des Blutes bei Aufnahme, die initiale Leukozytenkonzentration, der Basenüberschuss (*base excess*, BE), sowie die Laktatkonzentration bei Aufnahme, nach 12h und 24h zusammengefasst.

4.5 Kontrollen

Die Reinheit der mittels magnetischer Zellseparation durch CD14-/ CD15-Antikörperbeschichtete micro-magnetic-beads isolierten Zellreihen wurde mittels Durchflußzytometrie anhand von Blutproben dreier gesunder Probanden kontrolliert. In der Analyse zeigte sich eine Reinheit der isolierten CD14-positiven Monozyten von $92\pm 4\%$, der CD-15-positiven Granulozyten von $94\pm 3\%$.

4.6 Protein-Quantifizierung

Die nukleäre Extraktion erbrachte 2-8 μ g nukleären Proteins pro Abnahmezeitpunkt und Zellart. Pro Versuchsansatz wurden standardisiert 2 μ g nukleären Proteins eingesetzt.

4.7 EMSA

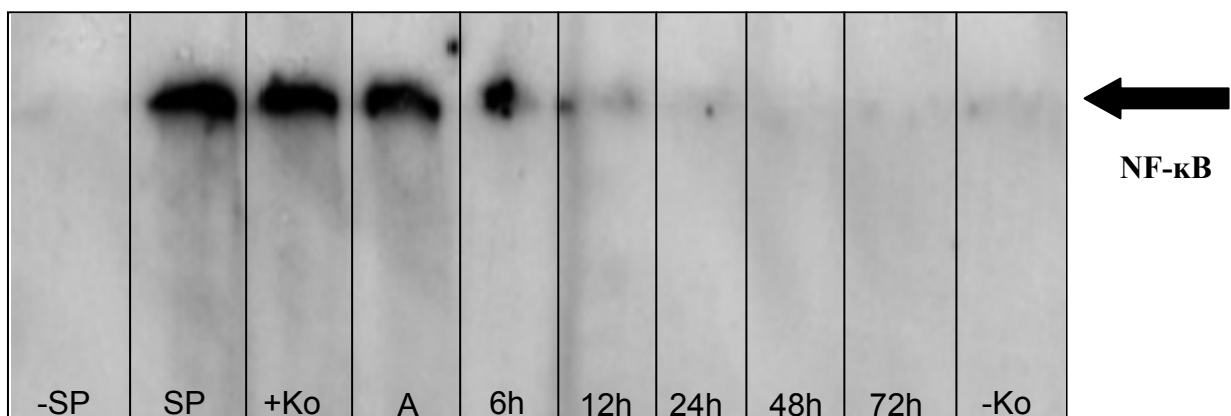


Abb. 10: Diese repräsentative Abbildung eines EMSA-Filmes zeigt keine Signalgebung der nukleären NF- κ B-Translokation der aufgetragenen unspezifischen Kontrolle (SP1), hingegen deutliche Signalgebung der spezifischen (SP) und Positivkontrolle (+Ko), sowie zum Aufnahmezeitpunkt. Nach 6h zeigt sich bereits deutlich reduziertes Signal, um nach 12h fast nicht mehr vorhanden zu sein.

Diese o.a. Abbildung repräsentiert exemplarisch einen repräsentativen EMSA-Film mit deutlicher Translokationsbande der mittels Pfeil markierten p50-Untereinheit von NF- κ B in Monozyten eines polytraumatisierten Patienten. Er zeigt deutliche Signale der Positivkontrolle und der spezifischen Kontrolle. Hingegen keine Signalgebung ist in Bande 1 zu verzeichnen, die die mittels SP1 durchgeführte unspezifische Kontrolle repräsentiert. In der mit ‚A‘ markierten Bande ist eine deutliche Signalgebung bei Aufnahme zu verzeichnen, welche die initiale NF- κ B-Translokation des betreffenden Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme widerspiegelt. Ein deutliches Signal der transkriptionalen NF- κ B-Aktivität weist auch die mit 6h be-

zeichnete Bande auf. Die 12h-Bande weist nur noch geringe Aktivität auf, um nach 24h, 48h und 72h radioaktive Markierung mehr hervorzurufen.

4.7.1 Monozytäre NF- κ B-Translokation mittels EMSA

Die basale NF- κ B-Translokation in nativ isolierten Monozyten gesunder Probanden (n=8), welche als Negativkontrollen fungierten, betrug $7,1 \pm 1,6$ [AU]. In LPS-stimulierten Proben (Positivkontrolle) dieser gesunden Probanden stieg die Translokation signifikant ($p=0,001$) auf $485,8 \pm 20,3$ [AU]; (**Abb. 11**).

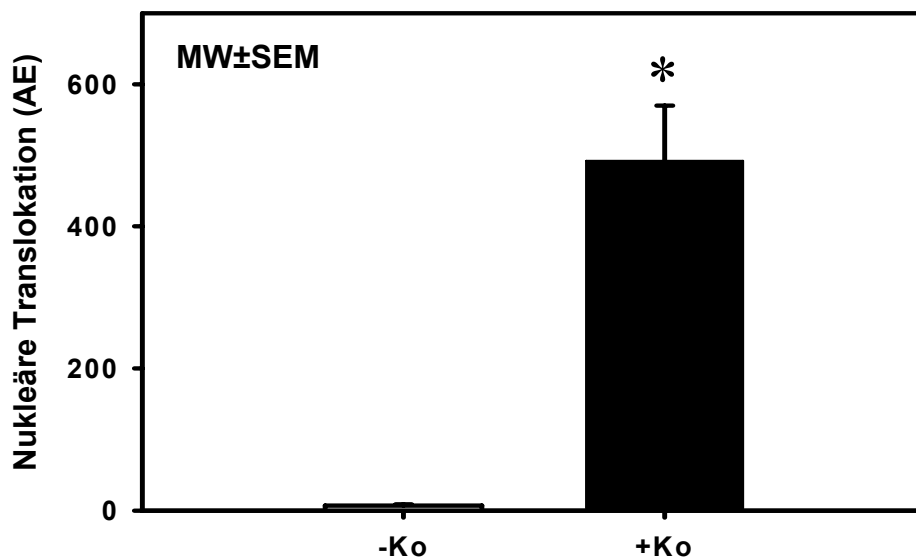


Abb. 11: In dieser Grafik ist monozytäre NF- κ B-Translokation in Negativ- und Positivkontrollen dargestellt. Dabei ist deutlich die Induktion der nukleären NF- κ B-Aktivität nach LPS-Stimulation in Positivkontrollen zu erkennen (SNK; ANOVA *on ranks*; * $p=0,001$).

Die Translokation von NF- κ B zeigte sich initial ($163,0 \pm 16,9$ [AU]), sowie nach 6h ($68,0 \pm 10,8$ [AU]) und 12h ($21,3 \pm 2,9$ [AU]) in Monozyten signifikant erhöht im Vergleich zur Negativkontrolle gesunder Probanden und nahm im Verlauf kontinuierlich ab, um sich nach 24 Stunden ($11,2 \pm 2,1$ [AU]), sowie den späteren Detektionszeitpunkten nicht vom Translokationsniveau nicht-stimulierter Probanden zu unterscheiden (ANOVA on ranks, SNK; $p < 0,05$). In **Abb. 12** ist monozytäre NF- κ B-Translokation im Vergleich zu Negativ- und Positivkontrollen grafisch dargestellt.

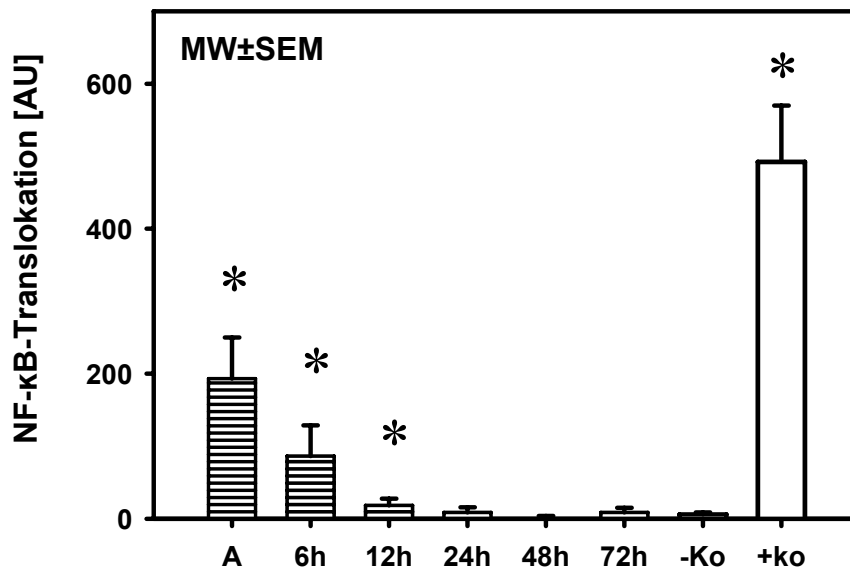


Abb. 12: Die Abbildung zeigt die nukleäre NF- κ B-Translokation in Monozyten polytraumatisierter Patienten. Dabei zeigte die Aktivität im Gesamtkollektiv polytraumatisierter Patienten innerhalb von 90 Minuten nach Trauma, sowie nach 6h und 12h signifikant erhöht gegenüber gesunden Probanden. Ebenso zeigte die LPS-stimulierte Positivkontrolle signifikant erhöhtes Translokationsniveau gegenüber der Negativkontrolle gesunder Probanden (t-Test; ANOVA on ranks, SNK; $*p < 0,05$).

In u.a. **Abb. 13** ist die geschlechtsspezifische NF-κB-Translokation in Monozyten dargestellt. Dabei zeigten weibliche Polytrauma-Patienten unmittelbar nach Trauma ein höheres initiales nukleäres Translokationsniveau ($203,5 \pm 32,8$ [AU]) als männliche ($125,5 \pm 14,5$ [AU]), um nach 6 Stunden signifikant erniedrigt zu sein gegenüber männlichen Patienten ($64,6 \pm 10,9$ vs. $24,2 \pm 6,7$ [AU]). Im weiteren Verlauf blieb die weibliche NF-κB-Aktivität unter der männlichen Polytrauma-Patienten.

Interessanterweise zeigten die männlichen Polytrauma-Patienten in der späteren posttraumatischen Phase ein höheres Aktivationsniveau, welches jedoch 72 Stunden nach Trauma signifikant reduziert war gegenüber weiblichen Patienten ($21,8 \pm 2,9$ vs. $3,5 \pm 0,9$ [AU]) (s. **Abb. 13**).

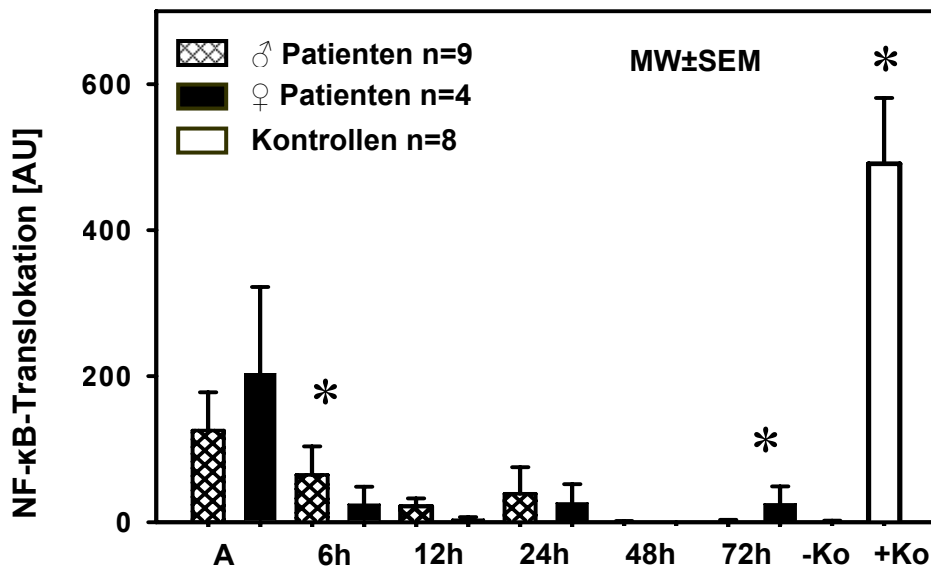


Abb. 13: Die monozytäre NF-κB-Aktivität nach Geschlechtsspezifität zeigt bei Aufnahme niedrigere Translokation in männlichen Patienten, die nach 6h und 24h jedoch gegenüber weiblichen Patienten erhöht ist, um nach 72h signifikant reduziert zu sein (t-Test; SNK; ANOVA on ranks $p < 0,05$).

Die u.a. Grafik (**Abb. 14**) repräsentiert die Unterscheidung der monozytären nukleären NF-κB-Translokation in Abhängigkeit von der Ausprägung eines *Multiple Organ Failure*, gemäß des MOF-Scores der polytraumatisierten Patienten. In Patienten, die bereits initial bei Aufnahme in die Klinik einen MOF-Score von über 4 Punkten aufwiesen (schwarz unterlegt), die also bereits unmittelbar posttraumatisch ein Multiorganversagen, MOF, aufwiesen, zeigten geringere NF-κB-Translokation ($88,4 \pm 13,3$ vs. $282,4 \pm 36,1$ [AU]). Die geringere Translokation war konsekutiv rückläufig, (6h: $41,9 \pm 7,5$ vs. $105 \pm 26,8$ [AU]), um nach 12h jedoch in Patienten, die einen höheren MOF-Score aufwiesen, auf höherem Niveau zu stagnieren ($26,1 \pm 4,6$ vs. $13,6 \pm 2,6$ [AU]) und nach 24h auf das Niveau gesunder Normalprobanden abzusinken

($0,8 \pm 0,2$ vs. $8,4 \pm 0,9$ [AU]). In Patienten, die geringere Organdysfunktionen aufwiesen, fand sich ein zweiter diskreter Anstieg nach 72h ($19,6 \pm 5,4$ vs. $1 \pm 0,2$ [AU]).

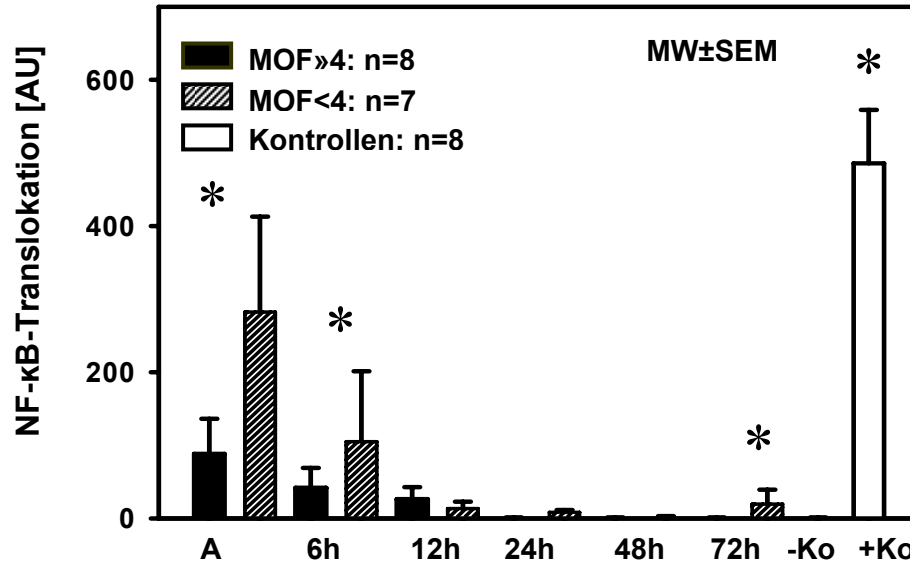


Abb. 14: Die Grafik zeigt die monozytäre NF-κB-Translokation in Abhängigkeit vom MOF-Scores der eingeschlossenen Polytrauma-Patienten. Dabei zeigten Patienten mit einem geringeren MOF-Score (<4 Punkte) zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Klinik, sowie 6h nach Trauma signifikant höhere NF-κB-Translokation, die hingegen nach 72h signifikant gesteigert war gegenüber Patienten mit einem höherem MOF-Score (≥4); (*SNK; ANOVA on ranks; $p < 0,05$).

In **Abb. 15** ist die monozytäre nukleäre NF- κ B-Translokation in Abhängigkeit von der anatomischen Verletzungsschwere gemäß des *New Injury Severity Scores*, NISS dargestellt. Ungeachtet der Region wurden die Summen der Quadrate der drei schwersten Verletzungen zu einem Punktwert zusammengefasst.

Dabei zeigten leicht verletzte Patienten mit einem NISS unter 24 Punkten signifikant verminderte NF- κ B-Translokation ($24,3 \pm 3,4$ vs. $30,8 \pm 1,4$; vs. $44,2 \pm 3,2$ [AU]; $p < 0,001$) gegenüber schwerer Verletzten, während in schwer Verletzten mit einem NISS größer 34 Punkten die Aktivität signifikant erhöht war gegenüber mittelgradig und leicht Verletzten. Ungeachtet der Traumaschwere zeigten alle Gruppen 6 Stunden nach dem Unfall deutlich erhöhte Aktivität, welche sich nicht signifikant unterschied. 12h nach Trauma war die NF- κ B-Aktivität in der Gruppe schwer verletzter Patienten mit einem NISS > 34 signifikant gegenüber den leichter Verletzten erhöht ($p < 0,002$). Interessanterweise zeigten die leicht gradig Verletzten (NISS < 16) nach 72h signifikant höheres Aktivitätsniveau (67 ± 12 vs. 6 ± 2 [AU]; $p = 0,028$) als die schwerer Verletzten (NISS > 24).

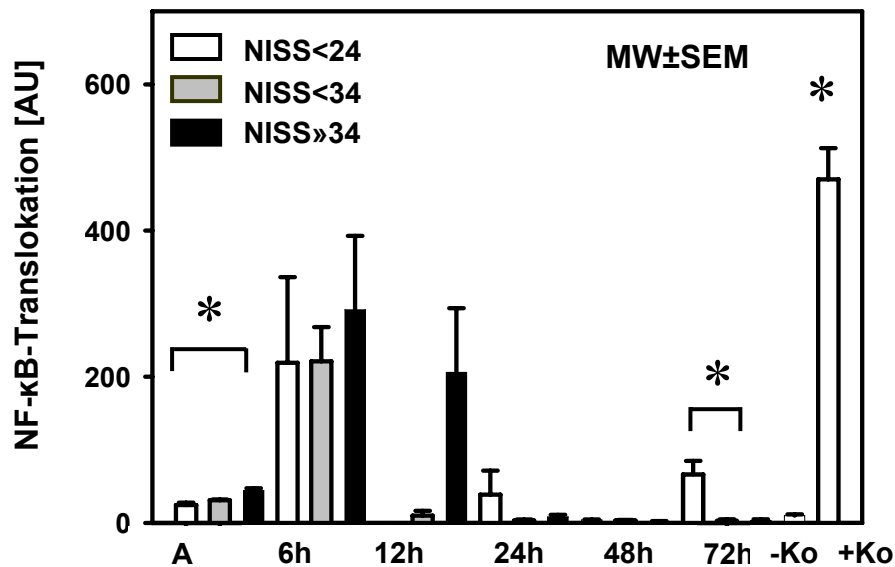


Abb. 15: Diese Grafik repräsentiert die monozytäre NF- κ B-Aktivität in Abhängigkeit von der anatomischen Verletzungsschwere gemäß des NISS. Dabei zeigten sich in allen Patienten nach 6h gesteigerte Aktivität, während nach 12h die hohe NISS-Gruppe erhöhte Aktivität zeigte, zeigten die Patienten mit niedriger Verletzungsschwere (NISS < 24) nach 72h gesteigerte Aktivität; (t-Test; SNK; ANOVA on ranks; $p = 0,028$).s

In Patienten, die ihre Vielfachverletzungen überlebten, war die initiale monozytäre NF-κB-Translokation innerhalb von maximal 90 Minuten nach Trauma gegenüber verstorbenen Patienten erhöht. Überlebende Patienten zeigten 6 Stunden (75,9±11,8 vs. 399,3±86[AU]; p=0,001) und 12 Stunden nach Trauma (13,7±1,8 vs. 114,8±32[AU]; p=0,001) signifikant reduzierte NF-κB-Aktivität gegenüber den verstorbenen Patienten. Interessanterweise nahm die Aktivität in den Verstorbenen kontinuierlich ab, um gegenüber den Überlebenden nach 24 Stunden signifikant reduziert zu sein (2,3±0,4 vs. 12,1±2,3[AU]; p=0,003). Im weiteren posttraumatischen Verlauf fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu nicht-traumatisierten Normalprobanden, (s. **Abb. 16**).

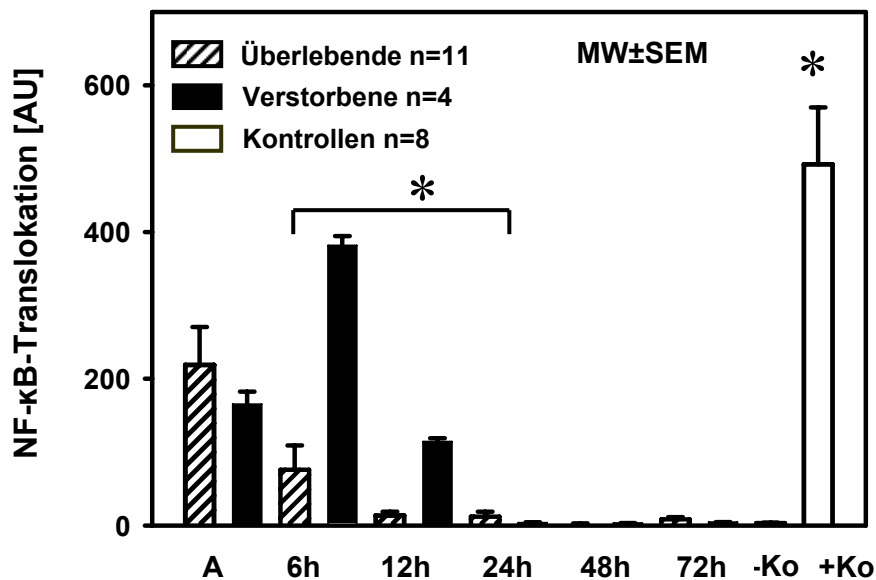


Abb. 16: : Diese Grafik zeigt die monozytäre NF-κB-Aktivität hinsichtlich des klinischen Outcomes der Patienten, welche initial in überlebenden Patienten erhöht war gegenüber den Verstorbenen. Nach 6h und 12h war die NF-κB-Aktivität in Überlebenden signifikant reduziert gegenüber den verstorbenen Patienten. Nach 24h unterschied sich die NF-κB-Aktivität in Verstorbenen nicht mehr wesentlich von der unstimulierten Negativkontrolle und war somit signifikant reduziert gegenüber den überlebenden Patienten; (*t-Test; SNK; p=0,003).

4.7.2 NF-κB-Aktivität mittels ELISA

Die analog durchgeführten ELISA-Versuche ergaben eine geringe Sensitivität der verwendeten industriell konfektionierten Assays. Dabei zeigte sich die NF-κB-Aktivität in der posttraumatischen Phase relativ konstant und unterschied sich nicht von der durchgeführten Negativkontrolle gesunder Probanden. Lediglich die LPS-stimulierte Kontrolle zeigte sich signifikant gegenüber sowohl der Negativkontrolle, als auch den Patientenproben über 72h erhöht.

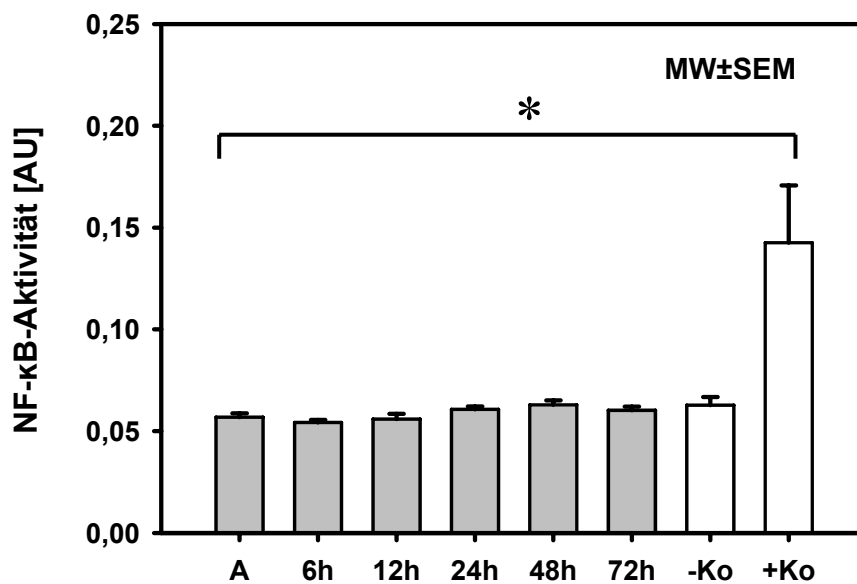


Abb. 17: Diese Grafik zeigt die monozytäre NF-κB-Aktivität mittels ELISA im Gesamtkollektiv der eingeschlossenen Polytrauma-Patienten, welche sich nicht von der Negativkontrolle gesunder Probanden unterschied; (SNK; t-Test; ANOVA *on ranks* * $p=0,02$).

In Zusammenschau mit den durchgeführten EMSA-Analysen wurde auf Grund der geringen Sensitivität im Weiteren auf die Unterscheidung nach den o. a. Kriterien der anatomischen, wie physiologischen Verletzungsschwere, sowie die Geschlechtsdifferenzierung verzichtet. Der Vollständigkeit halber ist ergänzend das klinische Outcome der polytraumatisierten Patienten dargestellt.

In analoger Weise zeigte sich die NF-κB-Aktivität in Abhängigkeit vom klinischen Outcome der polytraumatisierten Patienten (Überleben/Versterben) relativ konstant und unterschied sich nicht von der Negativkontrolle gesunder Probanden. Ausschließlich die durchgeführte LPS-stimulierte Positivkontrolle zeigte sich gegenüber den Patienten, sowie der Negativkontrolle signifikant erhöht (s. **Abb. 17**).

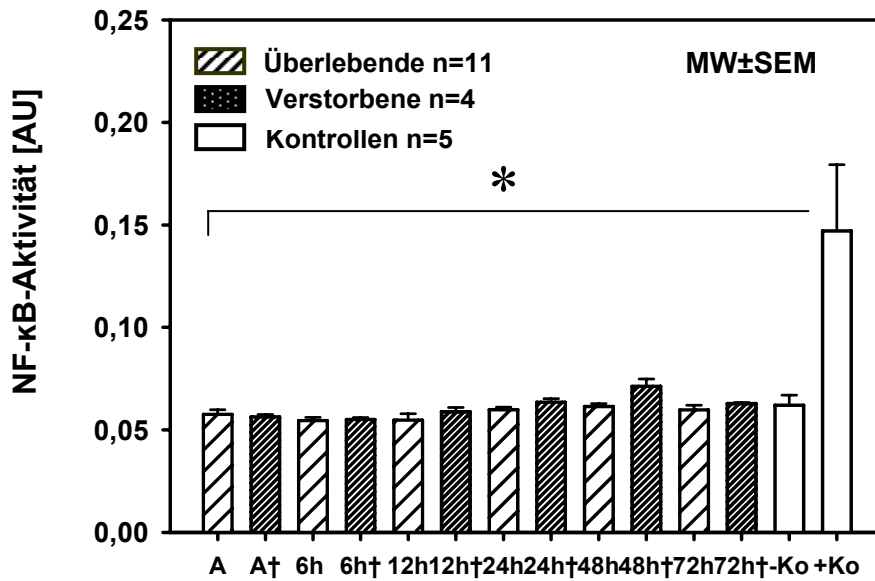


Abb. 17: Diese Grafik repräsentiert die monozytäre NF-κB-Aktivität hinsichtlich des klinischen Outcomes der Patienten mittels photometrischer ELISA-Analyse; (*ANOVA; SNK; $p < 0,05$)

4.8.1 Granulozytäre NF- κ B-Aktivität mittels ELISA

In Granulozyten nicht-traumatisierter Probanden ohne Zeichen einer akuten oder chronischen Infektion wurde lediglich basale NF- κ B-Translokation ($6,3 \pm 0,7$ [AU]) nachgewiesen. Nach LPS-Stimulation war die Translokation signifikant auf $485,8 \pm 20,3$ [AU] erhöht.

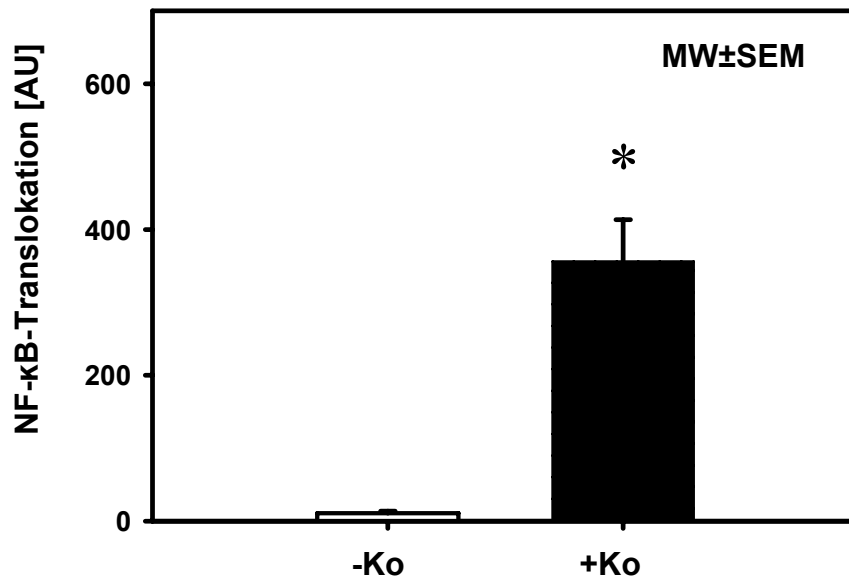


Abb. 18: Diese Abbildung repräsentiert die granulozytäre NF- κ B-Translokation in LPS-stimulierten Positiv- und nativ isolierten Probandenproben, welche als Negativkontrollen fungierten. (ANOVA, SNK; $p=0,001$)

In **Abbildung 19** ist die NF-κB-Translokation in CD-15-positiven Granulozyten polytraumatisierter Patienten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Trauma dargestellt. Dabei war die initiale NF-κB-Aktivität bei Aufnahme ($72,5 \pm 9,6$ [AU]), sowie nach 6 Stunden ($94,5 \pm 14,3$ [AU]) signifikant gegenüber nativen Probandenproben erhöht und zeigte sich 12 Stunden nach Trauma ($4,9 \pm 0,9$ [AU]) vermindert, um 24 Stunden nach Trauma erneut signifikant ($51,0 \pm 10,4$ [AU]) anzusteigen. Nach 48 ($2 \pm 0,2$ [AU]) und 72 Stunden ($3,8 \pm 0,2$ [AU]) waren keine Unterschiede zu gesunden Probanden mehr nachweisbar.

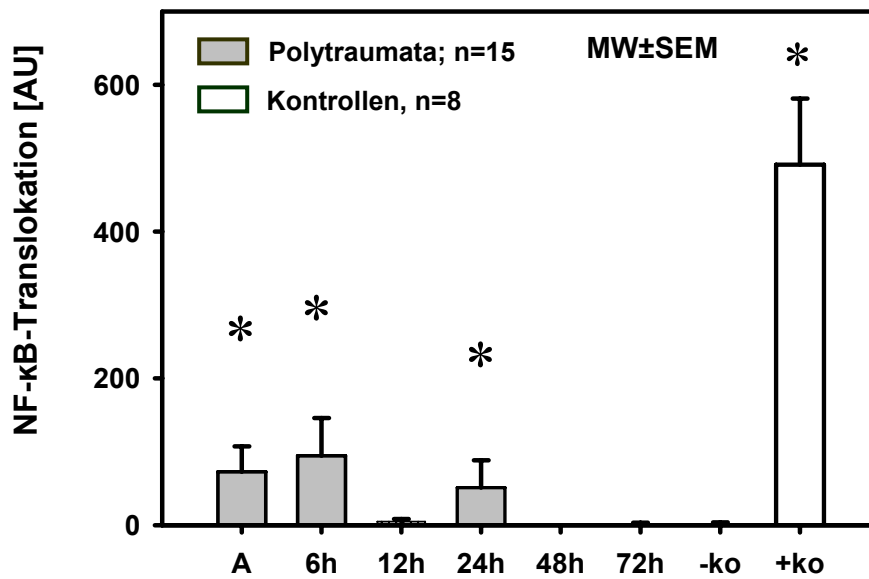


Abb. 19: Diese Grafik repräsentiert die granulozytäre NF-κB-Aktivität in Polytrauma-Patienten, welche initial innerhalb von 90 Minuten nach Trauma, sowie nach 6h signifikant gegenüber gesunden Probanden erhöht ist, um rapide abzunehmen und ein weiteres Mal 24h nach Trauma signifikant erhöht zu sein (ANOVA; SNK; $p=0,03$)

Bei Aufnahme im Schockraum zeigten männliche Polytrauma-Patienten signifikant niedrigere Translokationsniveau als weibliche Patienten ($37,3 \pm 3,6$ vs. $151,8 \pm 4,9$ [AU]), das nach 6h ($99,8 \pm 20,1$ vs. $82,3 \pm 14,8$ [AU]) und 12h ($7,1 \pm 1,4$ vs. $4,3 \pm 0,6$ [AU]) über dem weiblicher Patienten lag. Nach 24h zeigten weibliche Patienten dagegen stärkere Translokation ($119,3 \pm 33,1$ vs. $20,7 \pm 4,6$ [AU]). In analoger Weise zu den untersuchten Monozyten konnte keine Veränderung der granulozytären NF- κ B-Translokation in Zusammenhang mit den primär bzw. sekundär durchgeführten operativen Eingriffen nach Trauma nachgewiesen werden (**Abb. 20**).

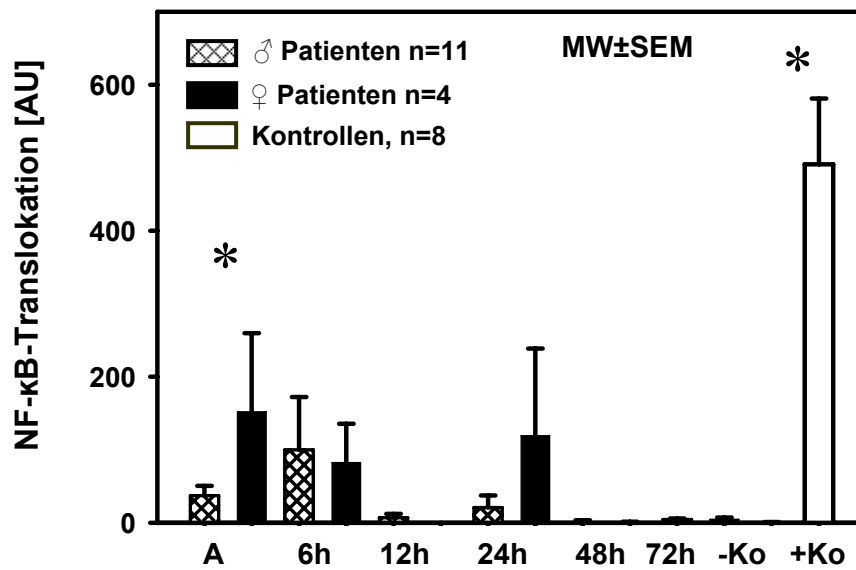


Abb. 20: Diese Abbildung zeigt die geschlechtsspezifische NF- κ B-Translokation in Granulozyten polytraumatisierter Patienten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Trauma, wobei sich lediglich die initiale Translokation signifikant in reduzierten Werten männlicher Patienten unterscheidet; (* $p < 0,05$; t-Test; SNK; ANOVA).

Hinsichtlich des *Multiple Organ Failure* Scores zeigten Patienten, die bereits bei Aufnahme in die Klinik einen MOF-Score von mindestens 4 Punkten aufwiesen (schwarz unterlegt), die also bereits unmittelbar posttraumatisch an erheblichen Organbeeinträchtigungen litten, initial signifikant geringere NF-κB-Translokation ($19,7 \pm 2,4$ vs. $54,5 \pm 7,2$ [AU]) gegenüber Patienten mit geringerer Organdysfunktion. Dagegen war die NF-κB-Translokation 6 Stunden nach Trauma in Patienten mit einem höherem MOF-Score gesteigert ($128,4 \pm 19,9$ vs. $54,5 \pm 7,2$ [AU]). Nach 12h zeigten beide Gruppen reduzierte nukleäre Translokation ($10,7 \pm 2,3$ vs. $3,5 \pm 0,9$ [AU]). Interessanterweise zeigten Patienten mit geringerer Organdysfunktion nach 24 Stunden einen erneuten signifikanten Anstieg im Vergleich zu schwerer beeinträchtigten Patienten ($104,7 \pm 21,8$ vs. $2,1 \pm 0,2$ [AU]), sowie nach 72h ($55,9 \pm 13,9$ vs. $2,4 \pm 0,2$ [AU]).

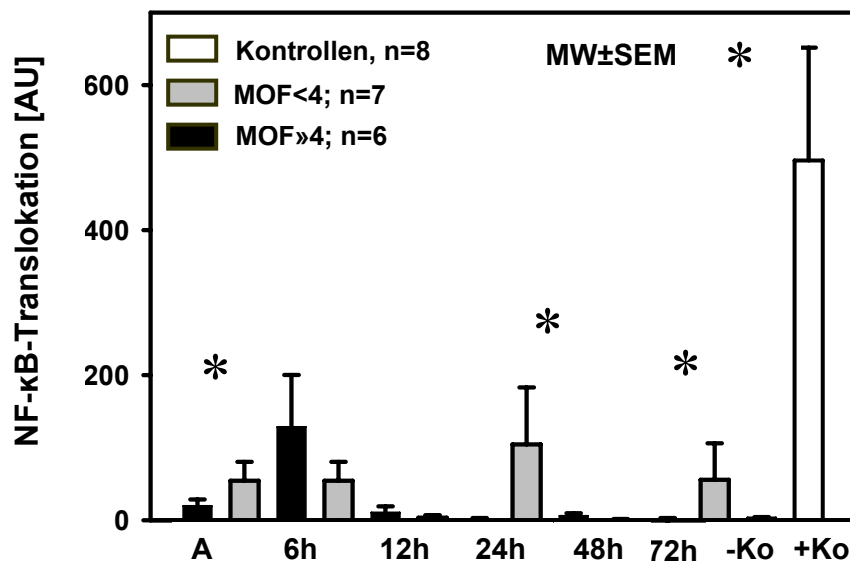


Abb. 21: Diese Grafik zeigt die granulozytäre NF-κB-Aktivität in Abhängigkeit vom MOF-Score der eingeschlossenen Patienten. Dabei war in Patienten, die bereits bei Aufnahme unter schweren Organbeeinträchtigungen litten, die NF-κB-Aktivität vermindert. Nach 6h zeigten diejenigen Patienten gesteigerte NF-κB-Translokation, um im weiteren posttraumatischen Verlauf reduzierte Translokation gegenüber weniger beeinträchtigten Patienten aufzuweisen (SNK, t-Test; ANOVA on ranks * $p < 0,05$).

Die Grafik (Abb.22) repräsentiert die granulozytäre NF-κB-Aktivität nach der Verletzungsschwere gemäß NISS in polytraumatisierten Patienten. Patienten mit einer geringeren anatomischen Verletzungsschwere gemäß eines NISS kleiner als 24 Punkte zeigten initial bei Aufnahme ($72,3 \pm 11,3$ vs. $140,7 \pm 16,7$ vs. $95,2 \pm 13,2$ [AU]), sowie nach 6 Stunden ($62,3 \pm 18,3$ vs. $147,2 \pm 28,1$ vs. $168,1 \pm 32,4$ [AU]) reduzierte nukleäre NF-κB-Translokation, die nach 12h gegenüber den mittelgradig Verletzten erniedrigt war ($22,4 \pm 4,8$ vs. $27,8 \pm 6,7$ [AU]), um nach 24h signifikant anzusteigen gegenüber den schwerer verletzten Patienten ($108,3 \pm 21,8$ vs. $3,8 \pm 1,2$ vs. $77,6 \pm 19,6$ [AU]; $p=0,014$).

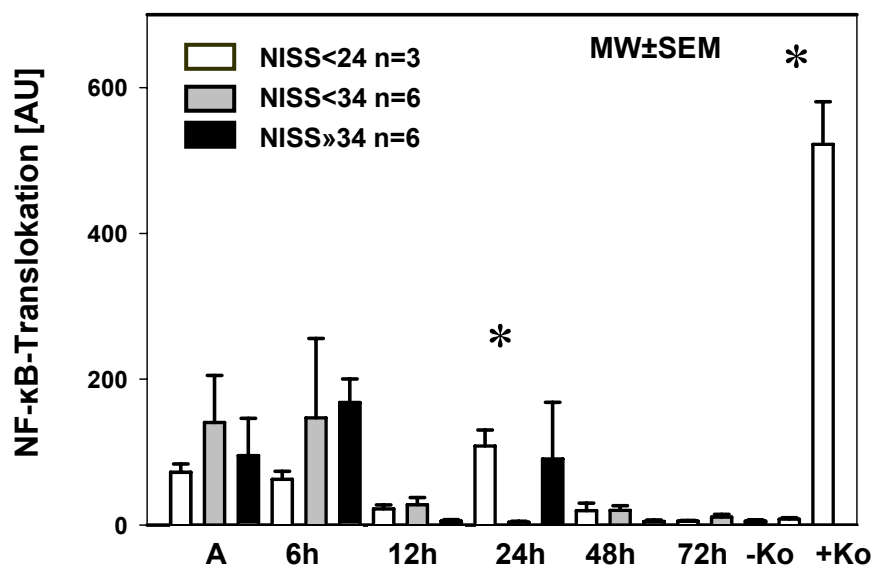


Abb. 22: In dieser Grafik ist die NF-κB-Aktivität in Abhängigkeit von der anatomischen Verletzungsschwere gemäß NISS in Granulozyten polytraumatisierter Patienten dargestellt. Dabei zeigten die Patienten mit einem niedrigem NISS innerhalb der ersten 12h reduzierte Translokation, die 24h nach Trauma signifikant erhöht war gegenüber den schwer Verletzten (t-Test; SNK; ANOVA *on ranks* * $p < 0,014$).

Diese Grafik (**Abb.23**) repräsentiert die nukleäre NF-κB-Translokation in Granulozyten in Abhängigkeit vom klinischen Outcome der Patienten. Patienten, die in der posttraumatischen Phase verstorben waren, zeigten initial signifikant gesteigerte NF-κB-Aktivität ($392,7 \pm 11,1$ vs. $45,3 \pm 4,6$ [AU]) im Vergleich zu Überlebenden ($p=0,001$). Nach 6 Stunden war die Translokationsrate in überlebenden Patienten gegenüber dem Aufnahmewert signifikant erhöht ($212,4 \pm 15,6$ [AU]), während sie in Verstorbenen abnahm ($194,6 \pm 5,2$ [AU]) und somit für den weiteren Zeitraum der Untersuchung unter dem Niveau Überlebender lag. Interessanterweise zeigten überlebende Patienten nach 24 Stunden einen erneuten Anstieg der NF-κB-Translokation ($66,3 \pm 13,3$ vs. $3,4 \pm 0,2$ [AU]; $p=0,002$).

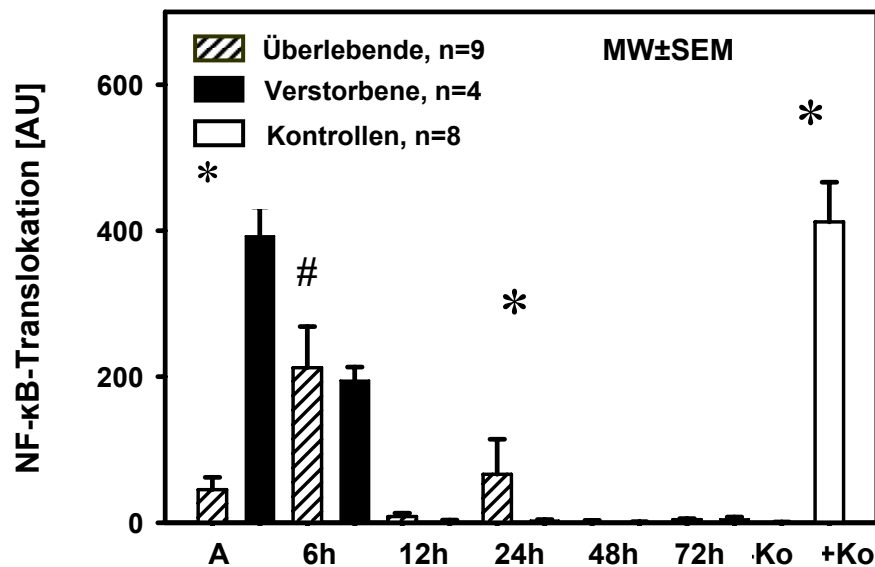


Abb. 23: Diese Grafik repräsentiert die NF-κB-Aktivität in Granulozyten in Abhängigkeit vom klinischen Outcome der Patienten. Dabei war die initiale Aktivität von NF-κB in überlebenden Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme signifikant gegenüber Verstorbenen ($*p=0,002$) reduziert, um rasch anzusteigen und nach 6h signifikant gegenüber dem Aufnahmewert ($\#p=0,001$) anzusteigen. Nach 24h zeigten überlebende Patienten einen signifikanten Anstieg der nukleären NF-κB-Translokation.

4.8.2 NF-κB-Aktivität mittels ELISA

Im Folgenden sind die Ergebnisse der ELISA-Versuchsreihe wiedergegeben. Die u. a. Grafik (Abb. 24) zeigt die photometrisch mittels ELISA detektierte NF-κB-Aktivität in polytraumatisierten Patienten in Abhängigkeit vom Isolierungszeitpunkt nach Trauma. Dabei zeigte sich die Aktivität insgesamt auf relativ konstantem Niveau mit tendentiellem Anstieg nach 24 und 72 Stunden und unterschied sich lediglich signifikant von der LPS-stimulierten Positivkontrolle.

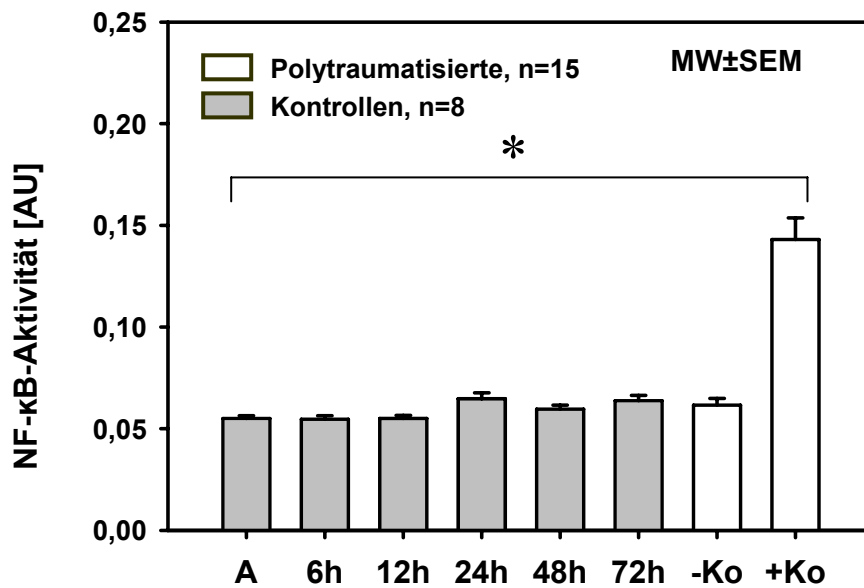


Abb. 24: Die ELISA-Analyse der granulozytäre NF-κB-Aktivität in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Trauma zeigt relativ konstantes Aktivitätsniveau mit tendentiellem Anstieg nach 24h und 72h; * $p < 0,05$.

Hinsichtlich des klinischen Outcomes der eingeschlossenen Patienten ergab sich in den durchgeführten photometrischen Analysen mittels ELISA lediglich ein signifikanter Unterschied der LPS-stimulierten Positivkontrollen. Zwischen überlebenden und verstorbenen Patienten konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Es besteht lediglich ein steigender Trend der Überlebenden nach 24 Stunden.

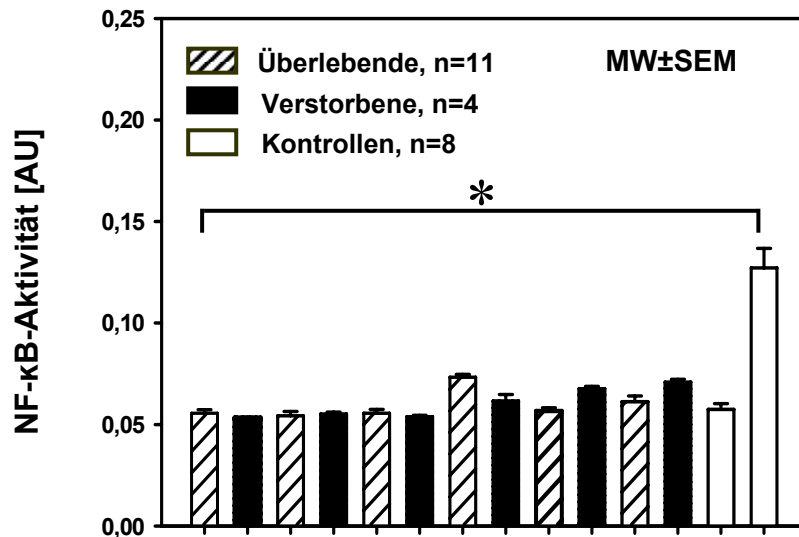


Abb.25 : NF-κB Aktivität nach klinischem outcome in Abhängigkeit vom Detektionszeitpunkt nach Trauma zeigt einen tendentiellen Anstieg der NF-κB-Aktivität in Überlebenden nach 24h; (*p<0,05; t-Test; ANOVA, SNK)

5. Diskussion

Die vorliegende Untersuchung präsentiert erstmalig die Ergebnisse einer sequentiellen Analyse initialer intrazellulärer Aktivierungsmechanismen in humanen Immunzellen polytraumatisierter Patienten in der direkt posttraumatischen Phase. Der Schwerpunkt dieser Studie lag dabei auf der Analyse der nukleären Translokationsdynamik des nukleären Faktors κB in Monozyten und Granulozyten unmittelbar nach schwerem Polytrauma.

Zudem konnte im Rahmen dieser Studie die für den Translokationsnachweis zytoplasmatischer Transkriptionsproteine bestens geeignete Technik des *Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA in den klinischen Forschungslaboren der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der LMU München Innenstadt etabliert werden. Dabei konnte ein Anstieg der Translokationsrate von NF- κB in Monozyten und Granulozyten in der frühen Phase nach schwerem Trauma gezeigt werden, der somit der in der Literatur beschriebenen Reduktion der NF- κB -Aktivität in schwer verletzten Patienten vorausgeht (180;181).

Die essentiell neuen Erkenntnisse dieser Arbeit sind auf der Analyse der nukleären Translokation von NF- κB in immunkompetenten Zellen des unspezifischen Immunsystems polytraumatisierter Patienten in der unmittelbar posttraumatischen Phase begründet.

5.1 Methodische Aspekte

5.1.1 Studiendesign

Das Studiendesign der möglichst frühen Probengewinnung ergibt sich aus den Erkenntnissen vorangegangener Studien zur posttraumatischen Dysfunktion humaner Immunzellen des unspezifischen Immunsystems (182;183). Diese Arbeiten haben klar aufgezeigt, dass der initialen posttraumatischen Phase größte Bedeutung für die Ausbildung und Ausprägung von Organfunktionsstörungen zukommt. So konnten *Botha et al.* an polytraumatisierten Patienten zeigen, dass es bereits innerhalb der ersten 6 Stunden nach Trauma zu einer signifikanter Aktivierung von Immunzellen des angeborenen Immunsystems kommt (184). Daher wurde der Schwerpunkt der experimentellen Blutentnahme auf den initialen Zeitpunkt innerhalb von maximal 90 Minuten nach Trauma bei Aufnahme in unsere Klinik gelegt, sowie die konsekutiven Blutentnahmen zeitlich eng gestaffelt und standardisiert zum Traumazeitpunkt nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt wurden. Auf Grund kurzer Rettungswege in der Landeshauptstadt München war ein sehr früher Zugang zu den schwer verletzten Patienten, die mittels Rettungshubschrauber oder bodengebunden über den Schockraum der Klinik aufgenommen wurden, möglich. Unmittelbar nach Erfassung und Stabilisierung der Vitalfunktionen der polytraumatisierten Patienten im Schockraum (185-187) konnte im Rahmen von dia-

agnostisch notwendigen Blutentnahmen oder notwendigen Zugängen (ZVK-Anlage) die experimentelle Blutentnahme zu diesem Studienzweck angeschlossen werden (188). Die zeitlich eng gestaffelten, konsekutiven Blutentnahmen erfolgten sodann entsprechend der Zeitachse des Studienprotokolls bereits auf der chirurgischen Intensivstation oder im Falle anschließender Primärversorgung lebensbedrohlicher Verletzungen im Operationssaal.

5.1.2 Patientenkollektiv

In diese Studie wurden lediglich Patienten mit stumpfem Polytrauma im Alter von mindestens 18 Jahren eingeschlossen, die innerhalb von 90 Minuten nach Trauma den Schockraum unserer Klinik erreichten. Bei einer Vielzahl immunsuppressiver, maligner und chronisch entzündlicher Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, rheumatoider Arthritis und AIDS konnten permanent erhöhte Expressionswerte von NF- κ B nachgewiesen werden (189). Daher wurden Patienten, die an malignen und chronisch entzündlichen Erkrankungen litten, sowie eine immunsuppressive Therapie erhielten, von dieser Studie ausgeschlossen.

Die epidemiologische Verteilung in dem eingeschlossenen Kollektiv schwer verletzter Patienten stimmt weitgehend mit der Literatur überein. So waren 63% männlichen Geschlechtes, was in etwa dem beschriebenen Geschlechterverhältnis 2:1 männlicher Polytrauma-Patienten entspricht (190). In der nordamerikanischen Literatur findet sich ein größerer Anteil penetrierender Verletzungen im Gegensatz zu vornehmlichen stumpfen Verletzungen verursacht durch Stürze und Rasantraumen. (191). So waren nach Angaben des Traumaregisters der *Arbeitsgemeinschaft Polytrauma der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie* 5,1% (n=1.255) der gesamt dokumentierten Verletzungen (n=23.390) durch penetrierende Verletzungen verursacht worden. In der vorliegenden Studie wurden jedoch nur stumpfe Traumen berücksichtigt. Die Dokumentation der präklinischen und klinischen Daten erfolgte entsprechend den Richtlinien der *Europäischen Konsensuskonferenz zur Aufnahme von Daten polytraumatisierter Patienten* (167).

5.1.3 Zellisolation

Zur Zellseparation wurde die Methode des positiven *cell sortings* mittels micro-magnetischer Antikörper, MACS verwendet. So wurden für die Monozytenisolation CD-14, für die Isolation polymorphkerniger Granulozyten CD-15-*micro-magnetic beads* verwendet. *Zahler et al* konnten anhand von Granulozytenseparation mittels micro-magnetischer Antikörpermarkierung zeigen, dass die separationsbedingte Stimulation der Zellen gering ist, jedoch die Spezifität konventioneller Isolierungsmethoden überwiegt (192). Im Gegensatz zu der häufig ver-

wendeten Ficoll-Methode weist die Zellseparation mittels MACS eine größere Spezifität und Reinheit der Probe auf (193). Darüber hinaus bietet sie gegenüber der Methode der negativen Zellseparation neben kosten- und zeitsparenden Aspekten den Vorteil der geringeren künstlichen Stimulation der zu isolierenden Zellen (194;195). Einen weiteren Vorteil der Zellisolation mittels MACS stellt die geringere Menge benötigten Materials dar, welches insbesondere bei schwer verletzten Patienten mit oftmals schon erheblichem Blutverlust bis hin zum hämorrhagischen Schock von wesentlicher Bedeutung ist.

Zur Kontrolle der Isolierungsspezifität wurden FACS-Analysen anhand von Probandenisolaten durchgeführt, welche eine Reinheit von $92\pm 4\%$ der isolierten Monozyten, von $88\pm 6\%$ der isolierten Granulozyten zeigten.

Zur Analyse der nukleären Translokation wurde die EMSA-Methode (196) verwendet, welche hierbei in der Chirurgischen Klinik Innenstadt in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. K. Brandt des Institutes für Klinische Chemie und Klinische Biochemie des Klinikums Rechts-der-Isar der Technischen Universität München etabliert wurde. Die EMSA-Methodik bietet eine hervorragende Möglichkeit des spezifischen Nachweises in geringer Konzentration vorhandener DNA-bindender Proteine, wie Transkriptionsfaktoren (197;198). Auf Grund höherer Sensitivität wurde die auf radioaktiver Phosphorylierung basierende Methodik verwendet (199). Die zelluläre Lyse wurde sowohl mechanisch als auch chemisch mittels NP40 herbeigeführt (200). Basierend auf Voruntersuchungen von *Adib-Conquy et al*, welche keine Unterschiede der Aktivität in p50/p65-Heterodimeren im Vergleich zu p65-Homodimeren erbrachten (201), wurde NF- κ B1, die relevante p50-Untereinheit von NF- κ B, für die EMSA-Technik verwendet. Auf Grund ausgeprägter Störanfälligkeit des Systems wurde auf kontinuierliche Kühlung des Proteins und schnelle Prozessierung der isolierten Proteine geachtet, sowie wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermieden (202). Um Degradation des isolierten Proteins zu vermeiden, die von *Laniel et al* insbesondere durch Proteasen und Deacetylasen gezeigt werden konnte, erfolgte die standardisierte Verwendung von Proteaseinhibitoren, um unkontrolliertem enzymatischem Proteinabbau vorzubeugen (203).

5.1.5 ELISA

Die ELISA-Technik stellt eine seit Jahrzehnten gebräuchliche Methode des quantitativen Proteinnachweises dar (204-206). Ergänzend zum Nachweis der intranukleären Translokation diente die ELISA-Methodik (207-209) dem Nachweis DNA-gebundenen NF- κ B-Proteins, welche eine quantitative Bestimmung mittels photometrischer Analyse gestattet (210-212). Im Rahmen dieser Studie wurden industriell konfektionierte ELISAs zum Nachweis der mittels

EMSA detektierten p50-Untereinheit von NF- κ B verwendet. Zum Zwecke der Etablierung wurden konsekutiv gesteigerte Mengen nukleären Proteins, sowie des verwendeten monoklonalen Erstantikörpers mit spezifischem p50-Epitop, sowie des IgG-HRP-Zweitantikörpers (*anti-rabbit*) verwendet. Als Eichkurve diente reines, synthetisches p50, welches somit eine standardisierte Bestimmung der nukleären Proben gestattete. Diese industriellen ELISAs gestatteten begrenzte Kapazität der Kontrolldurchführung. Zum Zwecke der Etablierung wurden konsekutiv gesteigerte Mengen nukleären Proteins, sowie des verwendeten Erst- und Zweitantikörpers verwendet.

Hierbei erscheinen insbesondere die fehlende Übereinstimmung der im Rahmen der EMSA-Versuche gezeigten Unterschiede und zeitlichen Dynamik der NF- κ B-Aktivität nicht mittels ELISA reproduzierbar, sowie die fehlende Differenzierung zwischen den Proben Verletzter und Gesunder als fragwürdig. Die Hypothese dabei war, es läge eine zu hohe Hintergrund-Detektion vor. Selbst der Verzicht auf das verwendete Humanalbumin brachte keine Detektionsänderung. Die Sensitivität, wie auch die Spezifität der durchgeführten Versuche waren äußerst gering, so dass generell und in Anbetracht des Preises industriell hergestellter Assays von deren Verwendung abzuraten ist, sowie die Ergebnisse als fragwürdig zu erachten sind. Von *Osawa et al* wurde die Induzierbarkeit der p50 und p65-Untereinheiten von NF- κ B durch IFN- α und Chemokine in dendritischen Zellen untersucht. Bezüglich der dabei verwendeten kommerziellen ELISA-Assays wurden keine methodischen Einschränkungen berichtet (213).

5.2 Posttraumatische Immunreaktion

In traumatisch verletzten Organen werden inflammatorische Kaskaden in Gang gesetzt, die vornehmlich der Reparatur verletzter Gewebe dienen. In der frühen posttraumatischen Phase werden insbesondere proinflammatorische Mediatoren wie IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF α und toxische Sauerstoffmetabolite (214-217), die entscheidende Voraussetzungen mittels Vasodilatation, Angiogenese und Makrophagenimmigration liefern, um die geschädigten Gewebe wiederherzustellen. Die Freisetzung dieser Entzündungsmediatoren kann jedoch zu einer generalisierten, systemischen Entzündungsreaktion führen, die auch Organe und Gewebe beeinträchtigen kann, die initial nicht betroffen waren. Diese überschießende Entzündungsreaktion in der frühen posttraumatischen Phase wurde als *Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS, beschrieben (19;218;219).

5.2.1 SIRS

Das posttraumatische SIRS kann zu initial noch reversiblen funktionellen Organausfällen führen (220-222). Ist der Organismus jedoch nicht in der Lage, diese Inflammation zu modulieren, entsteht ein fließender Übergang zur Entwicklung eines frühen *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*, MODS, dessen Irreparabilität in ein strukturelles *Multiple Organ Failure*, MOF, münden kann und das noch immer mit einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate einhergeht (25;223). Durch kontinuierliche Optimierung präklinischer Rettungsregime, sowie chirurgischer und intensivmedizinischer Therapie polytraumatisierter Patienten konnte die Häufigkeit schwerer Organfunktionsstörungen kontinuierlich reduziert werden. Trotzdem bleibt die Manifestation eines MOF nach schwerem Trauma der determinierende Faktor der Spät-Letalität.

Andererseits wurde unlängst eine auf das frühe hyper-inflammatorische SIRS induzierte Kompensationsphase des Organismus beschrieben, das *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome*, CARS, das insbesondere durch vermehrte Freisetzung anti-inflammatorischer Mediatoren, wie IL-1RA und IL-10 charakterisiert ist (224). Im Rahmen der Ausbildung eines CARS ist der humane Organismus durch eine verringerte Immunabwehr mit erhöhtem Infektionsrisiko und erhöhter Inzidenz eines späten MODS gekennzeichnet (225). Die Entwicklung eines CARS ist dabei eher als Effekt des spezifischen Immunsystems anzusehen (37). Unlängst wurde von *Keel et al* ein *Mixed Antagonist Response Syndrom*, MARS als Mittelweg der inflammatorischen Reparaturinduktion und Autoaggression beschrieben (226).

5.2.2 Angeborene Immunität

Eine entscheidende Rolle für das frühe immunmodulatorische Geschehen nach Trauma wird in diesem Zusammenhang den Effektorzellen der frühen unspezifischen Immunantwort, wie dem Monozyten-Makrophagen-System und den polymorphkernigen (PMN-) Granulozyten zugeschrieben (11;227-229) durch die Fähigkeit, proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF α und toxische Sauerstoffmetabolite zu synthetisieren und freizusetzen (230-233). Die in der frühen posttraumatischen Phase freigesetzten Mediatoren spielen eine bedeutende Rolle bei der Wundheilung des verletzten Gewebes, zum anderen bilden sie aber auch die Grundlage der Pathogenese von Kreislaufversagen und Zellläsionen, infolge derer u.a. die Granulozytenadhäsion am Endothel, das *capillary leakage syndrome*, und die Verbrauchskoagulopathie auftreten (51;52).

Somit induzieren diese Effektorzellen des frühen, angeborenen Immunsystems entscheidende Voraussetzungen für die Reparatur der verletzten Gewebe mittels Vasodilatation, Angiogenese und Makrophagenimmigration. Traumatische Hämatome bewirken zusätzliche Immigration immunologisch aktiver Zellen (37;234), wie PMN-Granulozyten und Monozyten/Makrophagen aus dem Blut. Neben der Aktivierung der Gerinnungskaskade sind es in der frühen Phase nach Trauma vor allem diese Zellen der unspezifischen Immunabwehr, die die initiale Freisetzung von toxischen Sauerstoffradikalen, Wachstumsfaktoren, Proteasen und Zytokinen bewirken (40;235;236). Auf Grund hoher kinetischer Energie wie im Rahmen von Hochrasanztraumen oder Stürzen aus großer Höhe entstehen mechanisch bedingte Zellschädigungen, die eine Immigration von Monozyten und Makrophagen aus dem Blut induzieren und in erster Linie der Reparatur und Restitution der verletzten Gewebe dienen (237;238). In Endothelzellen verletzter Gewebe konnten gesteigerte *tissue factor*-, TF-, Konzentrationen nachgewiesen werden in Zusammenhang mit gesteigerter NF-κB-Translokation (239).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die angeborene und erworbene Immunabwehr im Rahmen der posttraumatischen Entzündungsreaktionen eng miteinander interagieren (240). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des unspezifischen Immunsystems mit einiger Latenz zur Induktion des spezifischen Systems führt (241;242).

Trotz zahlreicher Studien konnten bisher die auslösenden Mechanismen der Generalisation ursprünglich lokal begrenzter Entzündungsreaktionen nach Trauma identifiziert werden (11;243-248). Als gesichert gilt, dass es sich um kaskadenartige Aktivierungsmechanismen handelt.

5.3 NF-κB-Translokation

Im Rahmen von *in-vitro* Untersuchungen anderer Autoren konnte NF-κB-Aktivität bereits nach 10-minütiger Stimulation mittels bakteriellem Lipopolysaccharid, LPS induziert werden, die bis 2,5h *post stimulationem* anhielt (249-251). LPS ist der Hauptbestandteil der Außenmembran gramnegativer Bakterien. Monozyten/Makrophagen modulieren die unspezifische Immunantwort auf LPS, indem sie eine Vielzahl an inflammatorischen Zytokinen exprimieren (252). Sowohl LPS als auch LPS-enthaltende Partikel, bilden Komplexe mit *LPS-binding-Protein* (LBP), einem Plasmaprotein. Unter physiologischen Konditionen konnte LBP im humanen Organismus in geringer Plasmakonzentration nachgewiesen werden (3±10mg/ml), wobei ein signifikanter Anstieg des Plasmaspiegels im Rahmen von Akutphase-Reaktionen verzeichnet werden konnte (253).

Auf Grund der frühen pro-inflammatorischen Wirkung nach LPS-Stimulation wurde im Rahmen der ersten Phase dieser Studie eine 90-minütige Stimulation der Monozyten und Granulozyten mittels 10µl einer 100ng/ml LPS-Lösung durchgeführt. Dabei konnte signifikant gesteigerte NF-κB-Translokation nach artifizierter Stimulation mittels LPS gezeigt werden. Die nativ isolierten Proben gesunder Probanden dienten im klinisch-experimentellen Teil dieser Studie als Negativkontrollen, die LPS-stimulierten Proben als Positivkontrollen.

In der Phase II dieser Studie konnte in immunkompetenten Zellen polytraumatisierter Patienten innerhalb von 90 Minuten nach Trauma signifikant gegenüber der *baseline* unverletzter Probanden gesteigerte NF-κB-Aktivität nachgewiesen werden. Den vorliegenden Analysen zu Folge kehrte die nukleäre Signaltransduktion 12 Stunden nach Trauma auf das Niveau gesunder Probanden zurück, um nach 24 Stunden erneut signifikant erhöht zu sein. In Patienten, die im posttraumatischen Verlauf auf Grund eines Multiorganversagens verstorben waren, zeigte sich das Aktivationsniveau innerhalb von 6 Stunden nach Trauma gegenüber Patienten, die die Verletzungen überlebten, signifikant gesteigert. Interessanterweise zeigten Patienten mit einem guten klinischen Outcome 24 Stunden nach Trauma einen erneuten Translokationsanstieg der granulozytären Fraktion.

5.4 Monozyten

Monozyten sind als im peripheren Blut zirkulierende immunkompetente Zellen in der Lage, nach Permeation der Gefäßwand in entzündlich veränderte Gewebe zu immigrieren und dort als Gewebemakrophagen zu fungieren (37;254). Quantitativ stellen sie eher einen geringen Anteil der Blutmakrophagen dar. Durch Schädigung der Zellmembranen in verletzten Regionen wird die Immigration von Monozyten und Makrophagen aus dem Blut zur Beseitigung zu Grunde gegangener Zellverbände und Gewebetrümmer induziert (255;256). Insbesondere in der frühen posttraumatischen Phase konnte gezeigt werden, dass Monozyten/Makrophagen eine wichtige Funktion in der inflammatorischen Phase nach schwerem Trauma zukommt (257-262). CD14 ist ein Oberflächenantigen, das auf der Zelloberfläche myeloider Zellen exprimiert wird. CD14 konnte in löslicher, freier Form im Plasma nachgewiesen werden und vermittelt die LPS-Aktivierung CD14-negativer Zellen, wie z.B. von Endo- und Epithelzellen (263). Sowohl auf biochemischer als auch auf genetischer Ebene konnte die Rolle von CD14 bezüglich der LPS-Aktivierung von Monozyten und Makrophagen bewiesen werden (264;265). In transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von CD-14 mit einer Hypersensitivität gegen LPS einhergeht. Im Gegensatz dazu erweisen sich Mäuse

mit defizitärem CD14 hyporeaktiv gegen LPS und sind 10-fach weniger empfindlich gegenüber LPS im Vergleich zu normalen Mäusen (266).

5.5 Monozytäre NF- κ B-Aktivität

Mittels artifizieller Stimulation durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS aus *E. coli*) konnte in nativ isolierten CD-14 positiven Monozyten gesunder Probanden ein signifikanter Anstieg der nukleären NF- κ B-Translokation induziert werden. Wie aus Zellkulturexperimenten bekannt ist, ist die nukleäre Translokation von NF- κ B artifiziell mittels IL-6, TNF α oder LPS (267-269) induzierbar. *Belge et al* konnten mittels FACS-Analysen CD14⁺-CD16⁺-Monozyten als Hauptquelle von TNF α nachweisen (270). *Maass et al* wiesen im Verbrennungsmodell der Ratte erhöhte NF- κ B und TNF α -Konzentrationen in Kardiomyozyten nach. Dabei konnte durch *ex vivo* Untersuchungen von Alveolarmakrophagen konstante NF- κ B-DNA-Bindung bei konstanter I- κ B α und β -Konzentration nach artifizieller Stimulation nachgewiesen werden.

Unseren Untersuchungen zufolge zeigten polytraumatisierte Patienten initial nach Polytrauma eine signifikante Steigerung der monozytären NF- κ B-Translokation, die kontinuierlich abnahm, um sich 24 Stunden nach Trauma nicht vom Niveau nicht-stimulierter Kontrollen zu unterscheiden. In verstorbenen Patienten konnte anhand unserer Analysen signifikant gesteigerte NF- κ B-Aktivität nach 12 und 24 Stunden gezeigt werden. Dies stimmt überein mit der von *Arnalich et al* demonstrierten erhöhten monozytären NF- κ B-Aktivität in Patienten, die auf Grund einer posttraumatischen Sepsis verstorbenen waren (271).

Adib-Conquy et al zeigten reduzierte NF- κ B-Expression in Monozyten polytraumatisierter und septischer Patienten, wobei die initiale Detektion am ersten Tag erfolgte (272). Der von *Volk et al* beschriebenen *Immunoparalyse* (273), mit konsekutiv verminderter Reagibilität des unspezifischen und spezifischen Immunsystems geht unseren Erkenntnissen zufolge eine initiale Aktivierung des NF- κ B-*Pathways* voraus, die anhand von strikt zum Traumazeitpunkt standardisierten, sequentiellen Analysen der vorliegenden Arbeit erstmalig nachgewiesen werden konnte. Anhand der vorliegenden Studie konnte somit gezeigt werden, dass der postulierten Reduktion der NF- κ B-Aktivität in monozytären Zellen eine signifikante Steigerung in der unmittelbar posttraumatischen Phase vorangeht (274).

5.6 Granulozyten

Neutrophile Granulozyten repräsentieren etwa 50-70% der weißen Blutzellen und stellen eine heterogene Zellgruppe des angeborenen Immunsystems dar, welche aus jungen und älteren, davon segmentierten und hyper-segmentierten Zellen bestehen. Dabei befinden sich etwa 90% des vorhandenen Zellpools im Knochenmark, ca. 5% befinden sich im Bereich der Gefäßwände, sowie weitere 5% in der systemischen Zirkulation. Granulozyten unterliegen einem hohen *turn-over*, der insbesondere durch Apoptose reguliert wird (275). Granulozyten weisen eine Reihe von Oberflächenepitopen auf wie CD3, CD11a/b/c, CD15 und CD18. Dabei konnte von *Zahler et al* eine spezifische positive Zellseparation mittels micro-magnetischer Antikörper gezeigt werden. Während CD11a auf allen Leukozyten exprimiert wird, CD11b neben Granulozyten auf Eosinophilen, Monozyten und NK-Zellen exprimiert wird, ist das CD15-Oberflächenantigen spezifisch für aktivierte neutrophile Granulozyten (276). Daher erfolgten die Zellisolationen aus den entnommenen Vollblutproben mittels *CD-15-micro-magnetic beads*. Die diesbezüglich durchgeführten FACS-Analysen der Zellseparationen wiesen für neutrophile Granulozyten eine Reinheit von $88\pm 6\%$ auf.

Es wurde angenommen, ausdifferenzierte Granulozyten seien nicht zur Synthese inflammatorischer Mediatoren befähigt, abgesehen von sogenannten *respiratory burst* Funktionen. Unlängst zeigten *McDonald et al*, dass PMN in der Lage sind, nach externer Stimulation und konsekutiver NF- κ B-Induktion inflammatorische Mediatoren zu synthetisieren (277). Somit kommt diesen Zellen eine weitere wichtige immun-regulative Funktion zu. Anhand standardisierter, parallel zu den experimentellen Blutentnahmen durchgeführter Differentialblutanalysen der polytraumatisierten Patienten konnte in der 84% der überlebenden Patienten, jedoch in keinem der Verstorbenen ein *Left-shift* zu jüngeren Formen von Granulozyten nachgewiesen werden.

5.7 Granulozytäre NF- κ B-Translokation

In Übereinstimmung mit CD-14-positiven Monozyten zeigte sich die NF- κ B-Translokation in polymorphkernigen Granulozyten (PMN) gesunder Probanden signifikant gesteigert nach LPS-Stimulation (**Abb. 10**). In PMN polytraumatisierter Patienten konnte initial posttraumatisch signifikant gesteigerte NF- κ B-Aktivität gezeigt werden, die auf das Niveau gesunder Probanden zurückging, um ein weiteres Mal 24 Stunden nach Trauma signifikant erhöht zu sein (278). Dabei war der beschriebene biphasische Anstieg 24 Stunden nach Trauma insbesondere in Patienten mit besserem Outcome, insbesondere in Patienten mit weniger ausgeprägten Verletzungen (NISS<24), ohne manifestes Organversagen (MOF<4), sowie überle-

benden Patienten. Interessanterweise zeigte die Subanalyse der anatomischen Verletzungsschwere auch in schwerst verletzten Patienten (NISS>34) den beschriebenen Anstieg der nukleären κ B-Translokation. Dies liegt in zwei Patienten mit hoher Translokation nach 24 Stunden begründet, die ein schweres Verletzungsmuster aufwiesen, jedoch nicht ihren Verletzungen erlagen.

Li et al wiesen in nekrotischen Zellen im Gegensatz zu apoptotischen Zellen, die dem programmierten Zelltod anheimfallen und weiterhin Membranintegrität behalten, vermehrte NF- κ B-induzierte Genexpression pro-inflammatorischer Mediatoren in Fibroblasten und Makrophagen nach. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Rel A eine essentielle Bedeutung der Apoptosesteuerung zukommt. In Rel A-defizienten Mäusen wurde massive Apoptose, sowie signifikant gesteigerte embryonale Letalität gefunden (279).

Martins et al demonstrierten erhöhte ROS in Zusammenhang mit erhöhter Apoptoserate in PMN septischer Patienten, sowie in Patienten im septischen Schock (280). *Baichwal et al* zeigten zellspezifische Apoptoseinduktion oder Inhibition (281). So konnte in B-Lymphozyten anti-apoptotische Wirkung von RelA nachgewiesen werden. Während TNF α direkt intrazellulär apoptosefördernd wirkt, induziert die RelA-Translokation nach TNF α -Rezeptorbindung die Apoptoseaktivität der Zelle. Anhand von *in vitro*-Stimulation durch Serum polytraumatisierter Patienten konnten *McDonald et al* NK- κ B-abhängige Inhibition der posttraumatischen Apoptose nachweisen. Somit scheint in Patienten mit gutem klinischem Outcome geringere Apoptose vorzuherrschen mit konsekutiver Stimulation des Knochenmarkes zu vermehrter Granulopoese (282).

5.8 Klinisches Outcome

5.8.1 Anatomische Verletzungsschwere

Die Schweregrad-Einteilung des Polytraumas erfolgte gemäß dem *Injury Severity Score* (ISS) nach *Greenspan* in der Modifikation nach *Osler et al* (283): Zur Klassifikation der Trauma-Schwere wird hierbei der Körper in sechs Regionen eingeteilt (Oberfläche, Kopf und Gesicht, Hals, Thorax, Abdomen und Becken, Wirbelsäule und Extremitäten), die jeweils in ihrem Verletzungsschweregrad auf einer Skala zwischen 1 (unwesentliche Verletzungen) und 5 (maximal kritische Verletzung mit unsicherer Überlebenschance) bewertet werden. Der ISS wird definiert als die Summe der Quadrate der drei schwersten Verletzungen. Er stellt eine etablierte und seit vielen Jahren anerkannte Möglichkeit zur Klassifikation der Trauma-Schwere dar und erlaubt eine Aussage über voraussichtliche Morbidität und Mortalität (284). Im Gegensatz dazu erlaubt der *New Injury Severity Score* in der Modifikation nach

Osler et al die Bewertung der drei schwersten Verletzungen unabhängig von der anatomischen Region und stellt somit eine exaktere Abbildung der Gesamt-Verletzungsschwere dar (285). Durch das Einschlußkriterium des hohen ISS (≥ 16) wurde ein Patientenkollektiv analysiert, welches aufgrund seiner hohen Inzidenz für ein MOF ($>25\%$) ein relevantes Problem in der Polytraumaversorgung darstellt (286;287). So konnten *Ertel et al.* an einem retrospektiv analysierten Kollektiv von 1278 polytraumatisierten Patienten bei hohem ISS eine Inzidenz für die Entwicklung eines SIRS mit 80%, sowie für die Entwicklung eines posttraumatischen MODS mit 85% (288). Zur Bestimmung eines vorliegenden MOF wurden ebenfalls die initialen Organfunktionen bestimmt.

Zur Unterteilung unseres Patientenkollektivs in zwei relevante Gruppen wurde ein zweiter *Cutoff* von ISS =34 Punkten basierend auf den Vorarbeiten von *Laird et al.*, *Rutledge et al.* und *Schinkel et al.* gewählt, die mit steigendem ISS über 34 Punkten überproportional abnehmende Überlebenswahrscheinlichkeit zeigen konnten (289-291). Der Mittelwert des NISS der eingeschlossenen Patienten lag bei 34 ± 8 Punkten.

Unseren Analysen zufolge wiesen schwer verletzte Patienten mit einem NISS-Wert > 34 Punkten bereits initial signifikante Steigerung der monozytären NF- κ B-Translokation auf, welche im posttraumatischen Verlauf zunahm, um nach 24 Stunden signifikant reduziert zu sein gegenüber leicht Verletzten. In Granulozyten zeigten leicht verletzte Patienten (NISS <24) zunächst abnehmende NF- κ B-Aktivität während der ersten 12 Stunden, um nach 24 Stunden signifikant gegenüber schwerer Verletzten (NISS $>24\ll 34$) erhöht zu sein.

5.8.2 MOF

Zur Dokumentation der physiologischen Verletzungsschwere wurde der *Multiple Organ Failure Score* nach *Goris* in der Modifikation nach *Lefering* verwendet (292). Um eine dichotome Unterteilung in klinisch relevante Gruppen vorzunehmen, werden diese quantitativen kontinuierlichen Daten anhand von *Score*-Systemen gruppiert, wie beispielsweise dem MOF-Score (293). Überschreitet die Summe der Punkte dabei einen bestimmten Wert, erfolgt die entsprechende Einteilung in eine klinische Gruppe (z.B. MOF <4 Punkte: kein relevantes Multiorganversagen, MOF ≥ 4 Punkte: relevantes, manifestes Multi-Organversagen). Unseren Analysen zufolge zeigten Patienten mit einem niedrigen MOF-Wert (<4 Punkte) zum Zeitpunkt der Aufnahme in unsere Klinik, sowie nach 6 Stunden und 24 Stunden signifikant gesteigerte NF- κ B-Aktivität im Vergleich zu Patienten mit einem hohen MOF-Score. Dabei wurde der Punktwert der MOF-Scores täglich simultan zu den durchgeführten experimentellen Blutentnahmen dokumentiert.

Als unabhängige Faktoren für die Entwicklung eines Multiorganversagens wurden insbesondere der Basenüberschuss, *base excess*, BE, sowie die Laktat-Konzentrationen in den ersten Stunden nach Trauma analysiert. Während die Analyse des BE keine signifikanten Unterschiede ergab, zeigten sich bezüglich des Überlebens hochsignifikante Unterschiede zwischen den Laktat-Konzentrationen der untersuchten Patienten. In der Literatur konnten sowohl das initiale Vorliegen einer Azidose, als auch insbesondere der Laktatazidose als Risikofaktoren hinsichtlich der Entwicklung eines MOF, sowie einer erhöhten Letalität gezeigt werden (294-298).

Das frühe posttraumatische *Priming* von Monozyten und Makrophagen konnten von verschiedenen Autoren als Induktor relevanter Veränderungen des angeborenen Immunsystems nach Trauma auf den klinischen Verlauf identifiziert werden (299-301). In gesunden Individuen zirkulieren Monozyten und Makrophagen in ruhendem, inaktivem Zustand, während durch Exposition von *platelet activating factor*, PAF, TNF α oder IL-1 das sog. *Priming* ruhender Monozyten oder PMN erfolgt mit konsekutiver Aktivierung. Bis dato liegen geringe Erkenntnisse bezüglich der posttraumatischen Aktivierung auf transkriptionaler Ebene vor. *Bhatia et al* konnten PMN-*Priming* durch gesteigerte Elastasefreisetzung, sowie IL-8 und IL-11b-Freisetzung aus PMN traumatisierter Patienten als Risikofaktoren für die Entwicklung eines posttraumatischen MOF identifizieren (302). Wir fanden lediglich inkonstante Elastaseerhöhung in einem Teil der Patienten mit einem hohen MOF-Wert nachgewiesen werden.

5.8.3 Überleben

Anhand der monozytären Analyse konnte in überlebenden Patienten signifikante Steigerung der NF- κ B-Aktivität innerhalb von 90 Minuten nach Trauma gezeigt werden, die hingegen zu späteren Zeitpunkten (6h, 12h) signifikant reduziert war gegenüber Patienten, die im posttraumatischen Verlauf verstarben.

Die granulozytäre Analyse zeigte initial hochsignifikant erhöhte NF- κ B-Aktivität in verstorbenen Patienten, die sich rasch äquilibrierte, um sich im späteren posttraumatischen Verlauf nicht mehr von der gesunden Probanden zu unterscheiden. Interessanterweise zeigten Patienten, die ihre Verletzungen überlebten, in der granulozytären Fraktion einen signifikanten NF- κ B-Anstieg nach 6 Stunden gegenüber dem Aufnahmewert, sowie nach temporärer Reduktion einen erneuten signifikanten NF- κ B-Anstieg nach 24 Stunden, welcher in keinem der verstorbenen Patienten nachzuweisen war.

In Patienten mit hohen Punktescores für anatomische (NISS) oder physiologische Verletzungsschwere (MOF), sowie in Patienten mit schlechtem klinischem Outcome, konnten von

Nolan et al erhöhte Apoptoseraten nachgewiesen werden (303). Somit scheint insbesondere ein zweiter Anstieg der granulozytären nukleären NF-κB-Aktivität mit einer besseren klinischen Outcome einherzugehen. Diese erneut gesteigerte NF-κB-Induktion könnte möglicherweise in einer verminderten Apoptoseaktivität begründet sein. Zudem konnte von *Cogswell et al* auch die Existenz mitochondrialer NF-κB-Aktivität nachgewiesen werden, welcher substantielle apoptotische Regulation zukommt (304).

5.9 Geschlechtsspezifische Analyse

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten gesteigerte monozytäre und granulozytäre NF-κB-Translokation weiblicher Patienten innerhalb von 90 Minuten, sowie 24 Stunden nach Trauma im Vergleich zu männlichen Patienten gezeigt werden. Im späteren posttraumatischen Verlauf nicht mehr von der Aktivität gesunder Probanden zu unterscheiden.

Im Rahmen tierexperimenteller Sepsis-Untersuchungen konnten Geschlechtsunterschiede in Bezug auf die Anfälligkeit bzw das Reaktionsniveau nach Exposition nachgewiesen werden. Aus tierexperimentellen Untersuchungen ist bekannt, dass weibliche Individuen länger anhaltender Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren nach Trauma zeigen.

Im Gegensatz zeigten ovariectomierte Individuen erhöhte Kupfferzellaktivierung nach TNFα-Stimulation (305). Im humanen Organismus nach schwerem Trauma konnten zudem genetische Unterschiede in Bezug auf die Zytokin-Antwort nach LPS-Stimulation gezeigt werden, die prädisponierend für die Entwicklung eines SIRS und konsekutivem MODS und MOF angesehen werden müssen (306;307). *Choudhry et al* zeigten anhand von Tierexperimenten höhere Überlebensraten in weiblichen Individuen nach Trauma (308). Nach Verbrennung und Sepsis konnte in weiblichen Patienten besseres Outcome gezeigt werden (309;310). Obwohl die eingeschlossenen Polytrauma-Patientinnen im Alter von 63±31 Jahren waren, zeigten sie initial erhöhte NF-κB-Aktivität, die rasch abnahm, um nach 72 Stunden signifikant gegenüber männlichen Patienten erniedrigt zu sein. Diesbezügliche Hormonbestimmungen wurden nicht durchgeführt.

5.10 NF-κB unter potentiell therapeutischem Aspekt

Als ubiquitär vorhandener, essentieller Induktor einer Vielzahl pro-inflammatorischer Gene schien NF-κB ein reizvolles Ziel potentieller therapeutischer Beeinflussung. Unter der Hypothese, überschießende pro-inflammatorische Prozesse effektiv über den NF-κB-*Pathways* inhibieren zu können, wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt.

Während *Islam et al* dosisabhängige NF- κ B-Inhibition durch α -Tocopherol (311) *in vitro* demonstrierten, zeigten *Bowie et al* N-Acetylcystein, NAC, als direkter Inhibitor von NF- κ B. Dabei ist NAC durch Erhöhung der intrazellulären Glutathion-Konzentrationen direkt in der Lage, H₂O₂, sowie HO', Hydroxylradikale, abzufangen. Andererseits wurde auch ein NAC-unabhängiger NF- κ B-Aktivierungsweg beschrieben (312). Von *Roth et al* konnte Homozystein-abhängige Inhibition der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung in Endothelzellen gezeigt werden (313). Pyrrolidindithiocarbamat, PDTC konnte von *Schreck et al* als Inhibitor der H₂O₂, IL-1, TNF α und LPS-vermittelten NF- κ B-Aktivierung in Fibroblasten und Lymphozyten gezeigt werden (314).

Scheinman et al zeigten gesteigerte Glucocorticoidrezeptor-vermittelte NF- κ B-Bindung an I- κ B durch Dexamethason (315). Auf Grund der Komplexität der NF- κ B-Wirkungsweisen mit insbesondere unmittelbar nach Trauma wünschenswerter NF- κ B-Aktivierung scheint in Zusammenschau mit der demonstrierten zellspezifischen Inhibition eine generelle Blockade des NF- κ B-Pathways wenig sinnvoll, bzw. auf allgemein immunsuppressivem Niveau vergleichbar der NF- κ B-Inhibition durch NSAR und Glucocorticoide.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass NF- κ B in einer zellspezifischen und dosisabhängigen Weise reversibel durch eine Vielzahl antioxidativ bzw. antiphlogistisch wirksamer Substanzen inhibiert werden kann (316). Dabei geht die jeweilige Wirkungsweise nicht über bekannte antiphlogistische Prinzipien wie etwa durch NSAR oder Glucocorticoide hinaus, so dass insbesondere die Komplexität pro- und anti-inflammatorischer Prozesse nach schwerem Trauma mit konsekutiver Immunreaktion nicht durch derartige Substanzen therapierbar erscheint. Insbesondere ist nach unseren Erkenntnissen die pro-inflammatorische post-traumatische NF- κ B-Wirkung wünschenswert, so dass eine therapeutische Wirkungsreduktion nicht sinnvoll erscheint.

6. Zusammenfassung

Die Destabilisierung des humanen Immunsystems nach schwerem Trauma stellt auf Grund steigender Zahlen das Unfallereignis primär überlebender Patienten ein wachsendes Problem polytraumatisierter Patienten dar. Nach jahrzehntelanger Optimierung der präklinischen Rettung, sowie der klinischen Therapieregime konnte eine konsekutive Reduktion der Primärsterblichkeit schwer verletztere Patienten erreicht werden. Somit repräsentiert die Entwicklung eines posttraumatischen Multiorganversagens die Hauptursache der Spätletalität nach schwerem Trauma.

Im Rahmen umfangreicher Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass frühen immunologischen Veränderungen nach Trauma eine essentielle Rolle im posttraumatischen Verlauf zukommt. Den Zellen des angeborenen Immunsystems, Monozyten und Granulozyten kommt dabei eine Schlüsselposition der frühen posttraumatischen Immunregulation zu. Zahlreiche Studien der Vergangenheit hatten zur Zielsetzung, pro- und anti-inflammatorische Mediatoren nach Trauma zu identifizieren und zu quantifizieren.

Die vorangehende, übergeordnete transkriptionale Steuerung dieser Effektorzellen ist dabei bis dato weitgehend unbekannt. Als ein essentieller, mittlerweile ubiquitär nachgewiesener Transkriptionsfaktor konnte der nukleäre Faktor κ B identifiziert werden. Dieser ist befähigt, nach traumatischer wie anders gearteter inflammatorischer Aktivierung, in den Zellkern zu translozieren und die Transkription einer Vielzahl pro-inflammatorischer Zielgene zu induzieren. Diese posttraumatische Translokation von NF- κ B ist bis dato nur unzureichend bekannt.

Ziel dieser vorliegenden Untersuchung war es daher:

- i) In humanen Immunzellen der angeborenen Immunabwehr (Monozyten, PMN-Granulozyten) gesunder Probanden unter Nativbedingungen nukleäre Translokation von NF- κ B mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA zu detektieren, sowie nach artifizieller Stimulation mittels bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS aus E.coli) NF- κ B-Translokation zu induzieren.
- ii) Die Dynamik der transkriptionalen NF- κ B-Aktivität in der posttraumatischen Phase bis 72 Stunden nach Trauma in den spezifischen Zellreihen zu analysieren sowie

- iii) Gemeinsame klinische Kriterien, die einer Änderung der nukleären Translokation von NF- κ B in humanen Monozyten und Granulozyten entsprechen, zu identifizieren.

Ad i) Da bis dato keine validen Protokolle der nukleären Translokationsanalyse existierten, wurden in einem ersten Schritt dieser Studie die optimalen Konditionen etabliert, einen nukleären Translokationsnachweis zytoplasmatischer Proteine aus humanen Monozyten und Granulozyten gesunder Probanden unter Nativbedingungen, sowie nach artifizieller Stimulation mittels bakteriellem Lipopolysaccharid zu führen.

Dabei konnte in humanen Monozyten gesunder Probanden lediglich geringe NF- κ B-Aktivität nachgewiesen werden. Die Aktivität unter Nativkonditionen betrug $7,1 \pm 1,6$ [AU]. Nach artifizieller LPS-Stimulation war ein hochsignifikanter ($p=0,001$) Anstieg der κ B-Translokation auf $485,8 \pm 20,3$ [AU] zu verzeichnen.

In ähnlicher Weise konnte für PMN-Granulozyten eine basale NF- κ B-Translokation von $6,3 \pm 0,7$ nachgewiesen werden, welche nach Stimulation der Proben gesunder Probanden mittels LPS eine hochsignifikante Induktion der nukleären Translokation auf $492 \pm 20,1$ [AU] ($p=0,001$) ergab. Somit konnte gezeigt werden, dass das etablierte Protokoll zu validen Messergebnissen führt, welche sowohl unter Exposition mit bakteriellen Lipopolysacchariden, als auch sogar unter Nativkonditionen mit der etablierten EMSA-Technik detektierbar sind.

Ad ii) Nach Etablierung eines Protokolles für *Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA-wurde in einer zweiten Stufe dieser Studie die nukleäre Translokation von NF- κ B in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten initial bei Aufnahme in die Klinik (< 90 Minuten nach Trauma), sowie standardisiert 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma untersucht. Durch sehr frühen Zugang polytraumatisierter Patienten mit konsekutiv zeitlich eng zum Unfallzeitpunkt korrelierten Analysen konnte in den ersten posttraumatischen Stunden ein signifikanter Anstieg der nukleären NF- κ B-Translokation in schwer verletzten Patienten gezeigt werden.

Interessanterweise konnte in Monozyten polytraumatisierter Patienten unmittelbar nach Trauma signifikant gesteigerte NF- κ B-Translokation nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich die Aktivität initial innerhalb von 90 Minuten nach Trauma signifikant auf $163,0 \pm 16,9$ [AU] erhöht, die im Verlauf kontinuierlich auf $68,0 \pm 10,8$ [AU] nach 6h, sowie $21,3 \pm 2,9$ [AU] nach 12 Stunden abnahm. Bis 12 Stunden nach Trauma war die nukleäre Aktivität nach schwerem Polytrauma somit signifikant gegenüber der Negativkontrolle nativ isolierter Probandenpro-

ben erhöht. Ab 24 Stunden nach Trauma war kein signifikanter Unterschied gegenüber gesunden Probanden mehr nachweisbar.

In Granulozyten konnte eine signifikante Aktivierung unmittelbar nach Trauma auf $72,5 \pm 9,6$ [AU] identifiziert werden, welche nach 6 Stunden auf $94,5 \pm 14,3$ [AU] anstieg. Interessanterweise kam es nach einer Reduktion 12 Stunden nach Trauma ($4,9 \pm 0,9$ [AU]) zu einem erneuten, signifikanten Anstieg der nukleären κ B-Translokation auf $51,0 \pm 10,4$ [AU] nach 24h. Nach 48 und 72 Stunden waren keine signifikanten Unterschiede zu unverletzten Probanden mehr nachweisbar.

Somit konnte eine sehr frühe Aktivierung der Zellen des unspezifischen Immunsystems nach schwerem Polytrauma gezeigt werden, welcher eine rasche Reduktion folgt. Im Rahmen dieser vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der in der Literatur beschriebenen Immunparalyse mit der postulierten, bereits initial bestehenden Reduktion des *NF- κ B-Pathways* ein signifikanter Anstieg in den Zellen des unspezifischen, angeborenen Immunsystems vorausgeht. Ebenso konnte hierbei die in der Literatur postulierte bereits initial vorherrschende Depletion des angeborenen Immunsystems in Monozyten widerlegt und eine initiale proinflammatorische Signalinduktion identifiziert werden, welche der posttraumatischen Paralyse des humanen Immunsystems vorausgeht.

Ad iii) Die Analyse der polytraumatisierten Patienten ergab geschlechtsspezifische, wie zellspezifische Unterschiede: In Monozyten weiblicher Patienten konnte initial signifikant erhöhte *NF- κ B-Translokation* ($203,5 \pm 32,8$ vs. $125,5 \pm 14,5$ [AU]) gezeigt werden, welche nach 6 Stunden signifikant reduziert war ($64,6 \pm 10,9$ vs. $24,2 \pm 6,7$ [AU]; $p < 0,05$) und bis 48 Stunden unter dem Niveau männlicher Patienten blieb. Interessanterweise zeigten die männlichen Polytrauma-Patienten in der späteren posttraumatischen Phase ein höheres Aktivationsniveau, welches jedoch 72 Stunden nach Trauma signifikant reduziert war gegenüber weiblichen Patienten ($21,8 \pm 2,9$ vs. $3,5 \pm 0,9$ [AU]).

In Granulozyten zeigten weibliche Patienten zunächst signifikant gesteigerte *NF- κ B-Translokation* ($37,3 \pm 3,6$ vs. $151,8 \pm 4,9$ [AU]), die nach 6 Stunden ($99,8 \pm 20,1$ vs. $82,3 \pm 14,8$ [AU]) und 12 Stunden ($7,1 \pm 1,4$ vs. $4,3 \pm 0,6$ [AU]) gegenüber männlichen Patienten reduziert war. Nach 24h zeigten weibliche Patienten dagegen stärkere Translokation ($119,3 \pm 33,1$ vs. $20,7 \pm 4,6$ [AU]), um sich nach 72 Stunden weder voneinander noch vom Niveau der Probanden zu unterscheiden.

Weder die Analyse der monozytären, noch der granulozytären *NF- κ B-Aktivität* ergab einen statistischen Zusammenhang mit den posttraumatisch durchgeführten operativen Eingriffen.

Hinsichtlich der Ausprägung eines posttraumatischen Multiorganversagens konnten zellspezifische Translokationsmuster identifiziert werden: In Monozyten von Patienten, die bereits initial ein Multiorganversagen (MOF > 4) aufwiesen, war die NF-κB-Translokation bei Aufnahme ($88,4 \pm 13,3$ vs. $282,4 \pm 36,1$ [AU]), sowie nach 6 Stunden ($41,9 \pm 7,5$ vs. $105 \pm 26,8$), signifikant erniedrigt, um sich im weiteren Verlauf anzugleichen (12h: $26,1 \pm 4,6$ vs. $13,6 \pm 2,6$; 24h: $0,8 \pm 0,2$ vs. $8,4 \pm 0,9$; 48h: $0,8 \pm 0,2$ vs. $8,4 \pm 0,9$ [AU]). In Patienten, die geringere Organdysfunktionen aufwiesen, fand sich ein erneuter signifikanter NF-κB Anstieg nach 72 Stunden ($19,6 \pm 5,4$ vs. $1 \pm 0,2$ [AU]).

In Übereinstimmung zeigte ebenso die granulozytäre Analyse signifikant erniedrigte Translokation in Patienten mit bereits initial ausgeprägtem Multiorganversagen ($19,7 \pm 2,4$ vs. $54,5 \pm 7,2$ [AU]) gegenüber Patienten mit geringerer Organdysfunktion, um nach 6h ($128,4 \pm 19,9$ vs. $54,5 \pm 7,2$ [AU]) erhöht zu sein. Nach 12 Stunden zeigten beide Gruppen reduzierte nukleäre Translokation ($10,7 \pm 2,3$ vs. $3,5 \pm 0,9$ [AU]). Patienten mit geringerer Organdysfunktion zeigten nach 24h ($104,7 \pm 21,8$ vs. $2,1 \pm 0,2$ [AU]), sowie nach 72 Stunden ($55,9 \pm 13,9$ vs. $2,4 \pm 0,2$ [AU]) einen erneuten signifikanten Anstieg im Vergleich zu schwerer beeinträchtigten Patienten.

Hinsichtlich der anatomischen Verletzungsschwere gemäß des *New Injury Severity Scores*, NISS, war in Monozyten von Patienten mit einem NISS zwischen 16 und 24 Punkten die NF-κB-Translokation bei Aufnahme signifikant vermindert ($24,3 \pm 3,4$ vs. $30,8 \pm 1,4$; vs. $44,2 \pm 3,2$ [AU]; $p < 0,001$) gegenüber schwerer Verletzten, während in schwer Verletzten mit einem NISS größer 34 Punkten die Aktivität signifikant erhöht war gegenüber mittelgradig und leicht Verletzten.

Ungeachtet der Traumaschwere zeigten alle Gruppen 6 Stunden nach dem Unfall deutlich erhöhte Aktivität, welche sich nicht signifikant unterschied. 12 Stunden nach Trauma war die NF-κB-Aktivität in der Gruppe schwer verletzter Patienten mit einem NISS > 34 signifikant gegenüber den leichter Verletzten erhöht ($p < 0,002$). Interessanterweise zeigten die leicht gradig Verletzten (NISS < 16) nach 72h signifikant höheres Aktivitätsniveau (67 ± 12 vs. 6 ± 2 [AU]; $p = 0,028$) als die schwerer Verletzten (NISS > 24).

Hinsichtlich der granulozytären NF-κB-Aktivität zeigten Patienten mit einem NISS kleiner als 24 Punkte bei Aufnahme ($72,3 \pm 11,3$ vs. $140,7 \pm 16,7$ vs. $95,2 \pm 13,2$ [AU]), sowie nach 6 Stunden ($62,3 \pm 18,3$ vs. $147,2 \pm 28,1$ vs. $168,1 \pm 32,4$ [AU]) reduzierte nukleäre NF-κB-Translokation, die nach 12h gegenüber den mittelgradig Verletzten erniedrigt war ($22,4 \pm 4,8$ vs. $27,8 \pm 6,7$ [AU]), um nach 24h signifikant anzusteigen gegenüber den schwerer verletzten Patienten ($108,3 \pm 21,8$ vs. $3,8 \pm 1,2$ vs. $77,6 \pm 19,6$ [AU]; $p = 0,014$).

In Patienten, die ihre Vielfachverletzungen überlebten, war die monozytäre NF-κB-Translokation innerhalb von maximal 90 Minuten nach Trauma gegenüber verstorbenen Patienten erhöht. Überlebende Patienten zeigten 6 Stunden ($75,9 \pm 11,8$ vs. $399,3 \pm 86$ [AU]; $p=0,001$) und 12 Stunden nach Trauma ($13,7 \pm 1,8$ vs. $114,8 \pm 32$ [AU]; $p=0,001$) signifikant reduzierte NF-κB-Aktivität gegenüber den verstorbenen Patienten. Interessanterweise nahm die Aktivität in den Verstorbenen kontinuierlich ab, um gegenüber den Überlebenden nach 24 Stunden signifikant reduziert zu sein ($2,3 \pm 0,4$ vs. $12,1 \pm 2,3$ [AU]; $p=0,003$).

Im Gegensatz zu Monozyten war in Granulozyten verstorbener Patienten die initiale NF-κB-Aktivität signifikant gesteigert ($392,7 \pm 11,1$ vs. $45,3 \pm 4,6$ [AU]; $p=0,001$). Während die Translokation in Überlebenden nach 6h gegenüber dem Aufnahmewert signifikant erhöht war ($212,4 \pm 15,6$), war sie in Verstorbenen reduziert ($194,6 \pm 5,2$ [AU]) und lag für den weiteren Zeitraum der Untersuchung unter dem Niveau Überlebender. Interessanterweise zeigten überlebende Patienten nach 24 Stunden einen erneuten signifikanten Anstieg der NF-κB-Translokation ($66,3 \pm 13,3$ vs. $3,4 \pm 0,2$ [AU]; $p=0,002$).

Somit konnte im Rahmen dieser Studie erstmalig ein Zusammenhang der nukleären κB-Translokation in Zellen der angeborenen Immunabwehr polytraumatisierter Patienten mit in der Literatur als prädiktiv identifizierten Scores der Organdysfunktion, sowie der Verletzungsschwere und dem Überleben der eingeschlossenen Patienten nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich prinzipiell ein biphasischer Verlauf als günstig, der in Patienten mit niedrigerem MOF, niedrigerer Verletzungsschwere, sowie in überlebenden Patienten gezeigt werden konnte.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch 2006 für die Bundesrepublik Deutschland. 4 A.D.
- (2) Ruchholtz S, Nast-Kolb D, Waydhas C, Schweiberer L. [The injury pattern in polytrauma. Value of information regarding accident process in clinical acute management]. *Unfallchirurg* 1996; 99(9):633-641.
- (3) Schweiberer L, Nast-Kolb D, Duswald KH, Waydhas C, Muller K. [Polytrauma--treatment by the staged diagnostic and therapeutic plan]. *Unfallchirurg* 1987; 90(12):529-538.
- (4) Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 2005; 36(6):691-709.
- (5) Ruchholtz S, Nast-Kolb D, Waydhas C, Betz P, Schweiberer L. [Early mortality in polytrauma. A critical analysis of preventable errors]. *Unfallchirurg* 1994; 97(6):285-291.
- (6) Nast-Kolb D, Waydhas C, Kastl S, Duswald KH, Schweiberer L. [The role of an abdominal injury in follow-up of polytrauma patients]. *Chirurg* 1993; 64(7):552-559.
- (7) Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Norris JM, Lezotte DC, Hamman RF. Multiple organ failure can be predicted as early as 12 hours after injury. *J Trauma* 1998; 45(2):291-301.
- (8) Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I, Monchi M, Vinsonneau C, Fitting C et al. Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-like" syndrome. *Circulation* 2002; 106(5):562-568.
- (9) Alho A, Lahdensuu M, Jaattela A, Avikainen V, Karaharju E, Lepisto P et al. Biochemical quantification of blunt injuries. *Eur J Intensive Care Med* 1975; 1(2):61-64.
- (10) Ayala A, Chung CS, Grutkoski PS, Song GY. Mechanisms of immune resolution. *Crit Care Med* 2003; 31(8 Suppl):S558-S571.
- (11) Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:649-683.
- (12) Ward PA, Lentsch AB. Endogenous regulation of the acute inflammatory response. *Mol Cell Biochem* 2002; 234-235(1-2):225-228.
- (13) Pastores SM, Thakkar A, Gennis P, Katz DP, Kvetan V. Posttraumatic multiple-organ dysfunction syndrome: role of mediators in systemic inflammation and subsequent organ failure. *Acad Emerg Med* 1996; 3(6):611-622.
- (14) Plank LD, Hill GL. Sequential metabolic changes following induction of systemic inflammatory response in patients with severe sepsis or major blunt trauma. *World J Surg* 2000; 24(6):630-638.
- (15) Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Haenel JB, Read RA, Lezotte DC. Early predictors of postinjury multiple organ failure. *Arch Surg* 1994; 129(1):39-45.

- (16) Schinkel C, Zimmer S, Kremer JP, Walz A, Rordorf-Adam C, Henckel vD et al. Comparative analysis of transcription and protein release of the inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 beta) and interleukin-8 (IL-8) following major burn and mechanical trauma. *Shock* 1995; 4(4):241-246.
- (17) Moore FA, Moore EE, Read RA. Postinjury multiple organ failure: role of extrathoracic injury and sepsis in adult respiratory distress syndrome. *New Horiz* 1993; 1(4):538-549.
- (18) Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am* 1995; 75(2):257-277.
- (19) Gumanenko EK, Nemchenko NS, Goncharov AV, Pashkovskii EV. [Pathogenetical features of the acute period of traumatic disease. Traumatic shock as a special manifestation of the acute period]. *Vestn Khir Im I I Grek* 2004; 163(6):52-56.
- (20) Ertel W, Keel M, Marty D, Hoop R, Safret A, Stocker R et al. [Significance of systemic inflammation in 1,278 trauma patients]. *Unfallchirurg* 1998; 101(7):520-526.
- (21) Moore FA, Moore EE, Read RA. Postinjury multiple organ failure: role of extrathoracic injury and sepsis in adult respiratory distress syndrome. *New Horiz* 1993; 1(4):538-549.
- (22) Beal AL, Cerra FB. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *JAMA* 1994; 271(3):226-233.
- (23) Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am* 1995; 75(2):257-277.
- (24) Deitch EA, Goodman ER. Prevention of multiple organ failure. *Surg Clin North Am* 1999; 79(6):1471-1488.
- (25) Ertel W, Trentz O. [Polytrauma and multi-organ failure syndrome. Definition--pathophysiology--therapy]. *Zentralbl Chir* 1994; 119(3):159-167.
- (26) Nast-Kolb D, Aufmkolk M, Rucholtz S, Obertacke U, Waydhas C. Multiple organ failure still a major cause of morbidity but not mortality in blunt multiple trauma. *J Trauma* 2001; 51(5):835-841.
- (27) Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 2001; 193(3):237-244.
- (28) Faist E, Baue AE, Dittmer H, Heberer G. Multiple organ failure in polytrauma patients. *J Trauma* 1983; 23(9):775-787.
- (29) Moore FA, Sauaia A, Moore EE, Haenel JB, Burch JM, Lezotte DC. Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J Trauma* 1996; 40(4):501-510.
- (30) Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 2001; 193(3):237-244.
- (31) Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Haenel JB, Read RA, Lezotte DC. Early predictors of postinjury multiple organ failure. *Arch Surg* 1994; 129(1):39-45.

- (32) Schinkel C, Zimmer S, Kremer JP, Walz A, Rordorf-Adam C, Henckel vD et al. Comparative analysis of transcription and protein release of the inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 beta) and interleukin-8 (IL-8) following major burn and mechanical trauma. *Shock* 1995; 4(4):241-246.
- (33) Pastores SM, Thakkar A, Gennis P, Katz DP, Kvetan V. Posttraumatic multiple-organ dysfunction syndrome: role of mediators in systemic inflammation and subsequent organ failure. *Acad Emerg Med* 1996; 3(6):611-622.
- (34) Plank LD, Hill GL. Sequential metabolic changes following induction of systemic inflammatory response in patients with severe sepsis or major blunt trauma. *World J Surg* 2000; 24(6):630-638.
- (35) Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Haenel JB, Read RA, Lezotte DC. Early predictors of postinjury multiple organ failure. *Arch Surg* 1994; 129(1):39-45.
- (36) Schinkel C, Zimmer S, Kremer JP, Walz A, Rordorf-Adam C, Henckel vD et al. Comparative analysis of transcription and protein release of the inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 beta) and interleukin-8 (IL-8) following major burn and mechanical trauma. *Shock* 1995; 4(4):241-246.
- (37) Winet H, Hsieh A, Bao JY. Approaches to study of ischemia in bone. *J Biomed Mater Res* 1998; 43(4):410-421.
- (38) Robinson CM. Current concepts of respiratory insufficiency syndromes after fracture. *J Bone Joint Surg Br* 2001; 83(6):781-791.
- (39) Antrum RM, Solomkin JS. Complement activation products and monocyte migratory function in trauma. *Curr Surg* 1985; 42(4):301-303.
- (40) Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:821-852.
- (41) Schlag G, Redl H. Mediators of injury and inflammation. *World J Surg* 1996; 20(4):406-410.
- (42) Armstead VE, Opentanova IL, Minchenko AG, Lefer AM. Tissue factor expression in vital organs during murine traumatic shock: role of transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Anesthesiology* 1999; 91(6):1844-1852.
- (43) Ballard-Croft C, Maass DL, Sikes P, White J, Horton J. Activation of stress-responsive pathways by the sympathetic nervous system in burn trauma. *Shock* 2002; 18(1):38-45.
- (44) Bell MJ, Kochanek PM, Doughty LA, Carcillo JA, Adelson PD, Clark RS et al. Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma* 1997; 14(7):451-457.
- (45) Bhaumik G, Srivastava KK, Selvamurthy W, Purkayastha SS. The role of free radicals in cold injuries. *Int J Biometeorol* 1995; 38(4):171-175.
- (46) Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg* 1996; 224(5):647-664.

- (47) Carsin H, Assicot M, Feger F, Roy O, Pennacino I, Le Bever H et al. Evolution and significance of circulating procalcitonin levels compared with IL-6, TNF alpha and endotoxin levels early after thermal injury. *Burns* 1997; 23(3):218-224.
- (48) Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47(6):921-928.
- (49) Cioffi WG, Bureson DG, Pruitt BA, Jr. Leukocyte responses to injury. *Arch Surg* 1993; 128(11):1260-1267.
- (50) van den BR, Haenen GR, van den BH, Bast A. Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr* 2001; 86 Suppl 1:S121-S127.
- (51) Rose S, Marzi I. [Pathophysiology of polytrauma]. *Zentralbl Chir* 1996; 121(11):896-913.
- (52) Hack CE, Nuijens JH, Strack van Schijndel RJ, Abbink JJ, Eerenberg AJ, Thijs LG. A model for the interplay of inflammatory mediators in sepsis--a study in 48 patients. *Intensive Care Med* 1990; 16 Suppl 3:S187-S191.
- (53) Ege T, Us MH, Sungun M, Duran E. Cytokine response in lower extremity ischaemia/reperfusion. *J Int Med Res* 2004; 32(2):124-131.
- (54) Ege T, Us MH, Sungun M, Duran E. Cytokine response in lower extremity ischaemia/reperfusion. *J Int Med Res* 2004; 32(2):124-131.
- (55) Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, Hall JC. Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust N Z J Surg* 1998; 68(8):554-561.
- (56) Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, Wolf DA, Zahler S, Boekstegers P et al. Tumor necrosis factor-alpha contributes to ischemia- and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res* 1999; 84(4):392-400.
- (57) Kupiec-Weglinski JW, Busuttill RW. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37(4):1653-1656.
- (58) Lai EW, Toledo-Pereyra LH, Walsh J, Lopez-Nebolina F, Anaya-Prado R. The role of MAP kinases in trauma and ischemia-reperfusion. *J Invest Surg* 2004; 17(1):45-53.
- (59) Rose S, Marzi I. Mediators in polytrauma--pathophysiological significance and clinical relevance. *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383(3-4):199-208.
- (60) Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry (Mosc)* 1998; 63(7):766-781.
- (61) Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R et al. Ischemia at 4 degrees C: a novel mouse model to investigate the effect of hypothermia on postischemic hepatic microcirculatory injury. *Res Exp Med (Berl)* 2001; 200(2):93-105.
- (62) Haljamae H. The pathophysiology of shock. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1993; 98:3-6.

- (63) Schlag G, Redl H. Lung in shock--posttraumatic lung failure (organ failure)--MOFS. *Prog Clin Biol Res* 1989; 308:3-16.
- (64) Suter PM, Morel DR, Laverriere MC. [Post-traumatic pulmonary insufficiency: therapeutic measures]. *Schweiz Med Wochenschr* 1989; 119(11):364-368.
- (65) Nerlich AG, Nerlich ML, Joachim H, Muller PK. Biochemical changes in parenchymal lung tissue associated with posttraumatic respiratory failure. *Eur J Clin Invest* 1984; 14(3):190-198.
- (66) Stene JK. Renal failure in the trauma patient. *Crit Care Clin* 1990; 6(1):111-119.
- (67) Whelton A. Post-traumatic acute renal failure. *Bull N Y Acad Med* 1979; 55(2):150-162.
- (68) Vivino G, Antonelli M, Moro ML, Cottini F, Conti G, Bufi M et al. Risk factors for acute renal failure in trauma patients. *Intensive Care Med* 1998; 24(8):808-814.
- (69) Stene JK. Renal failure in the trauma patient. *Crit Care Clin* 1990; 6(1):111-119.
- (70) Whelton A. Post-traumatic acute renal failure. *Bull N Y Acad Med* 1979; 55(2):150-162.
- (71) Eknoyan G. Emergence of the concept of acute renal failure. *Am J Nephrol* 2002; 22(2-3):225-230.
- (72) O'Keefe GE, Maier RV. New regimens in the management of posttraumatic respiratory failure. *Curr Opin Pulm Med* 1997; 3(3):227-233.
- (73) Suter PM, Morel DR, Laverriere MC. [Post-traumatic pulmonary insufficiency: therapeutic measures]. *Schweiz Med Wochenschr* 1989; 119(11):364-368.
- (74) Nerlich AG, Nerlich ML, Joachim H, Muller PK. Biochemical changes in parenchymal lung tissue associated with posttraumatic respiratory failure. *Eur J Clin Invest* 1984; 14(3):190-198.
- (75) Wong HR, Wispe JR. The stress response and the lung. *Am J Physiol* 1997; 273(1 Pt 1):L1-L9.
- (76) Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, Moody FG, Weisbrodt NW, Moore FA. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock* 2001; 15(1):1-10.
- (77) Hierholzer C, Kalff JC, Billiar TR, Bauer AJ, Tweardy DJ, Harbrecht BG. Induced nitric oxide promotes intestinal inflammation following hemorrhagic shock. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286(2):G225-G233.
- (78) Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, Hall JC. Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust N Z J Surg* 1998; 68(8):554-561.
- (79) Kuebler JF, Toth B, Rue LW, Bland KI, Chaudry IH. Differential alterations in intestinal permeability after trauma-hemorrhage. *J Surg Res* 2003; 112(2):198-204.

- (80) Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, Moody FG, Weisbrodt NW, Moore FA. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock* 2001; 15(1):1-10.
- (81) Henrion J. Ischemia/reperfusion injury of the liver: pathophysiologic hypotheses and potential relevance to human hypoxic hepatitis. *Acta Gastroenterol Belg* 2000; 63(4):336-347.
- (82) Hill AG, Hill GL. Metabolic response to severe injury. *Br J Surg* 1998; 85(7):884-890.
- (83) Klein D, Einspanier R, Bolder U, Jeschke MG. Differences in the hepatic signal transcription pathway and cytokine expression between thermal injury and sepsis. *Shock* 2003; 20(6):536-543.
- (84) Laudanski K, Wyczechowska D. Monocyte-related immunopathologies in trauma patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53(4):321-328.
- (85) Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 1999; 11(3):153-159.
- (86) Zedler S, Bone RC, Baue AE, von Donnersmarck GH, Faist E. T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med* 1999; 27(1):66-72.
- (87) Alexander JW, Stinnett JD, Ogle CK, Ogle JD, Morris MJ. A comparison of immunologic profiles and their influence on bacteremia in surgical patients with a high risk of infection. *Surgery* 1979; 86(1):94-104.
- (88) Rose S, Marzi I. Mediators in polytrauma--pathophysiological significance and clinical relevance. *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383(3-4):199-208.
- (89) Szebeni J, Baranyi L, Savay S, Gotze O, Alving CR, Bunger R et al. Complement activation during hemorrhagic shock and resuscitation in swine. *Shock* 2003; 20(4):347-355.
- (90) Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF. CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest* 1997; 100(2):279-289.
- (91) Hietbrink F, Oudijk EJ, Braams R, Koenderman L, Leenen L. Aberrant regulation of polymorphonuclear phagocyte responsiveness in multitrauma patients. *Shock* 2006; 26(6):558-564.
- (92) Hierholzer C, Billiar TR, Tweardy DJ, Harbrecht B. Reduced hepatic transcription factor activation and expression of IL-6 and ICAM-1 after hemorrhage by NO scavenging. *Arch Orthop Trauma Surg* 2003; 123(2-3):55-59.
- (93) Lederer JA, Liou JS, Kim S, Rice N, Lichtman AH. Regulation of NF-kappa B activation in T helper 1 and T helper 2 cells. *J Immunol* 1996; 156(1):56-63.
- (94) Fosse E, Mollnes TE, Aasen AO, Trumpy JH, Stokke T. Complement activation following multiple injuries. *Acta Chir Scand* 1987; 153(5-6):325-330.

- (95) Hill J, Lindsay TF, Ortiz F, Yeh CG, Hechtman HB, Moore FD, Jr. Soluble complement receptor type 1 ameliorates the local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *J Immunol* 1992; 149(5):1723-1728.
- (96) Lindsay TF, Hill J, Ortiz F, Rudolph A, Valeri CR, Hechtman HB et al. Blockade of complement activation prevents local and pulmonary albumin leak after lower torso ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1992; 216(6):677-683.
- (97) Hildebrand F, Pape HC, Krettek C. [The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction.]. *Unfallchirurg* 2005; 108(10):793-803.
- (98) Hietbrink F, Oudijk EJ, Braams R, Koenderman L, Leenen L. Aberrant regulation of polymorphonuclear phagocyte responsiveness in multitrauma patients. *Shock* 2006; 26(6):558-564.
- (99) Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 1999; 11(3):153-159.
- (100) Baue AE, Durham R, Faist E. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock* 1998; 10(2):79-89.
- (101) Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 2004; 8(4):445-454.
- (102) Cioffi WG, Bureson DG, Pruitt BA, Jr. Leukocyte responses to injury. *Arch Surg* 1993; 128(11):1260-1267.
- (103) van den BR, Haenen GR, van den BH, Bast A. Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr* 2001; 86 Suppl 1:S121-S127.
- (104) Knobloch SM, Faden AI. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 1998; 153(1):143-151.
- (105) Ballard-Croft C, Maass DL, Sikes P, White J, Horton J. Activation of stress-responsive pathways by the sympathetic nervous system in burn trauma. *Shock* 2002; 18(1):38-45.
- (106) Bell MJ, Kochanek PM, Doughty LA, Carcillo JA, Adelson PD, Clark RS et al. Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma* 1997; 14(7):451-457.
- (107) Bhaumik G, Srivastava KK, Selvamurthy W, Purkayastha SS. The role of free radicals in cold injuries. *Int J Biometeorol* 1995; 38(4):171-175.
- (108) Biffi WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg* 1996; 224(5):647-664.
- (109) Carsin H, Assicot M, Feger F, Roy O, Pennacino I, Le Bever H et al. Evolution and significance of circulating procalcitonin levels compared with IL-6, TNF alpha and endotoxin levels early after thermal injury. *Burns* 1997; 23(3):218-224.

- (110) Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47(6):921-928.
- (111) Islam KN, Mendelson CR. Potential role of nuclear factor kappaB and reactive oxygen species in cAMP and cytokine regulation of surfactant protein-A gene expression in lung type II cells. *Mol Endocrinol* 2002; 16(6):1428-1440.
- (112) Jeschke MG, Low JF, Spies M, Vita R, Hawkins HK, Herndon DN et al. Cell proliferation, apoptosis, NF-kappaB expression, enzyme, protein, and weight changes in livers of burned rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280(6):G1314-G1320.
- (113) Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Henkel T, Stockinger H, Baeuerle PA. Selective recognition of the activated form of transcription factor NF-kappa B by a monoclonal antibody. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376(1):9-16.
- (114) Kim GM, Xu J, Xu J, Song SK, Yan P, Ku G et al. Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 2001; 21(17):6617-6625.
- (115) Kim PK, Deutschman CS. Inflammatory responses and mediators. *Surg Clin North Am* 2000; 80(3):885-894.
- (116) Schulze-Luehrmann J, Ghosh S. Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity* 2006; 25(5):701-715.
- (117) Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47(6):921-928.
- (118) Traenckner EB, Wilk S, Baeuerle PA. A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *EMBO J* 1994; 13(22):5433-5441.
- (119) van den BR, Haenen GR, van den BH, Bast A. Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr* 2001; 86 Suppl 1:S121-S127.
- (120) Islam KN, Mendelson CR. Potential role of nuclear factor kappaB and reactive oxygen species in cAMP and cytokine regulation of surfactant protein-A gene expression in lung type II cells. *Mol Endocrinol* 2002; 16(6):1428-1440.
- (121) Jeschke MG, Low JF, Spies M, Vita R, Hawkins HK, Herndon DN et al. Cell proliferation, apoptosis, NF-kappaB expression, enzyme, protein, and weight changes in livers of burned rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280(6):G1314-G1320.
- (122) Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Henkel T, Stockinger H, Baeuerle PA. Selective recognition of the activated form of transcription factor NF-kappa B by a monoclonal antibody. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376(1):9-16.
- (123) Kim GM, Xu J, Xu J, Song SK, Yan P, Ku G et al. Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis pro-

- tein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 2001; 21(17):6617-6625.
- (124) Fan C, Li Q, Zhang Y, Liu X, Luo M, Abbott D et al. IkappaBalpha and IkappaBbeta possess injury context-specific functions that uniquely influence hepatic NF-kappaB induction and inflammation. *J Clin Invest* 2004; 113(5):746-755.
- (125) King DJ, Bassett SE, Li X, Fennewald SA, Herzog NK, Luxon BA et al. Combinatorial selection and binding of phosphorothioate aptamers targeting human NF-kappa B RelA(p65) and p50. *Biochemistry* 2002; 41(30):9696-9706.
- (126) Mayo MW, Norris JL, Baldwin AS. Ras regulation of NF-kappa B and apoptosis. *Methods Enzymol* 2001; 333:73-87.
- (127) Ward PA, Lentsch AB. Endogenous regulation of the acute inflammatory response. *Mol Cell Biochem* 2002; 234-235(1-2):225-228.
- (128) Burke JR. Targeting I kappa B kinase for the treatment of inflammatory and other disorders. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2003; 6(5):720-728.
- (129) Fan C, Li Q, Zhang Y, Liu X, Luo M, Abbott D et al. IkappaBalpha and IkappaBbeta possess injury context-specific functions that uniquely influence hepatic NF-kappaB induction and inflammation. *J Clin Invest* 2004; 113(5):746-755.
- (130) Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:141-179.
- (131) Finco TS, Baldwin AS. Mechanistic aspects of NF-kappa B regulation: the emerging role of phosphorylation and proteolysis. *Immunity* 1995; 3(3):263-272.
- (132) Nichols TC. NF-kappaB and reperfusion injury. *Drug News Perspect* 2004; 17(2):99-104.
- (133) Wullaert A, Heyninck K, Beyaert R. Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF-kappaB and JNK activation in hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 2006; 72(9):1090-1101.
- (134) Gilston V, Jones HW, Soo CC, Coumbe A, Blades S, Kaltschmidt C et al. NF-kappa B activation in human knee-joint synovial tissue during the early stage of joint inflammation. *Biochem Soc Trans* 1997; 25(3):518S.
- (135) Schulze-Luehrmann J, Ghosh S. Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity* 2006; 25(5):701-715.
- (136) Yamamoto Y, Gaynor RB. Role of the NF-kappaB pathway in the pathogenesis of human disease states. *Curr Mol Med* 2001; 1(3):287-296.
- (137) Drent M, van den BR, Haenen GR, van den BH, Wouters EF, Bast A. NF-kappaB activation in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2001; 18(1):50-56.
- (138) Yamamoto K. [The activation and function of p53 in cellular response to environmental stress]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 1999; 44(15 Suppl):2507-2510.

- (139) Yamamoto Y, Gaynor RB. Role of the NF-kappaB pathway in the pathogenesis of human disease states. *Curr Mol Med* 2001; 1(3):287-296.
- (140) Baldwin AS, Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 2001; 107(1):3-6.
- (141) Zhang G, Ghosh S. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2000; 6(6):453-457.
- (142) Neugebauer E, Hensler T, Rose S, Maier B, Holanda M, Raum M et al. [Severe craniocerebral trauma in multiple trauma. An assessment of the interaction of local and systemic mediator responses]. *Unfallchirurg* 2000; 103(2):122-131.
- (143) Sanz O, Acarin L, Gonzalez B, Castellano B. NF-kappaB and IkappaBalpha expression following traumatic brain injury to the immature rat brain. *J Neurosci Res* 2002; 67(6):772-780.
- (144) Hang CH, Shi JX, Li JS, Li WQ, Wu W. Expressions of intestinal NF-kappaB, TNF-alpha, and IL-6 following traumatic brain injury in rats. *J Surg Res* 2005; 123(2):188-193.
- (145) Yang K, Mu XS, Hayes RL. Increased cortical nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) DNA binding activity after traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett* 1995; 197(2):101-104.
- (146) Sullivan PG, Bruce-Keller AJ, Rabchevsky AG, Christakos S, Clair DK, Mattson MP et al. Exacerbation of damage and altered NF-kappaB activation in mice lacking tumor necrosis factor receptors after traumatic brain injury. *J Neurosci* 1999; 19(15):6248-6256.
- (147) Maass DL, Hybki DP, White J, Horton JW. The time course of cardiac NF-kappaB activation and TNF-alpha secretion by cardiac myocytes after burn injury: contribution to burn-related cardiac contractile dysfunction. *Shock* 2002; 17(4):293-299.
- (148) Ballard-Croft C, Maass DL, Sikes P, White J, Horton J. Activation of stress-responsive pathways by the sympathetic nervous system in burn trauma. *Shock* 2002; 18(1):38-45.
- (149) Adib-Conquy M, Asehnoune K, Moine P, Cavaillon JM. Long-term-impaired expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha in peripheral blood mononuclear cells of trauma patients. *J Leukoc Biol* 2001; 70(1):30-38.
- (150) Kanz KG, Sturm JA, Mutschler W. [Algorithm for prehospital blunt trauma management]. *Unfallchirurg* 2002; 105(11):1007-1014.
- (151) Kanz KG, Eitel F, Waldner H, Schweiberer L. [Development of clinical algorithms for quality assurance in management of multiple trauma]. *Unfallchirurg* 1994; 97(6):303-307.
- (152) Regel G, Grotz M, Weltner T, Sturm JA, Tscherne H. Pattern of organ failure following severe trauma. *World J Surg* 1996; 20(4):422-429.

- (153) Goodman RB, Pugin J, Lee JS, Matthay MA. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14(6):523-535.
- (154) Rowe SJ, Allen L, Ridger VC, Hellewell PG, Whyte MK. Caspase-1-deficient mice have delayed neutrophil apoptosis and a prolonged inflammatory response to lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J Immunol* 2002; 169(11):6401-6407.
- (155) Szalay L, Umar F, Khadem A, Jafarmadar M, Furst W, Ohlinger W et al. Increased plasma D-lactate is associated with the severity of hemorrhagic/traumatic shock in rats. *Shock* 2003; 20(3):245-250.
- (156) Taniguchi T, Koido Y, Aiboshi J, Yamashita T, Suzaki S, Kurokawa A. The ratio of interleukin-6 to interleukin-10 correlates with severity in patients with chest and abdominal trauma. *Am J Emerg Med* 1999; 17(6):548-551.
- (157) Toth B, Yokoyama Y, Kuebler JF, Schwacha MG, Rue LW, III, Bland KI et al. Sex differences in hepatic heme oxygenase expression and activity following trauma and hemorrhagic shock. *Arch Surg* 2003; 138(12):1375-1382.
- (158) Cioffi WG, Bureson DG, Pruitt BA, Jr. Leukocyte responses to injury. *Arch Surg* 1993; 128(11):1260-1267.
- (159) van den BR, Haenen GR, van den BH, Bast A. Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr* 2001; 86 Suppl 1:S121-S127.
- (160) Hang CH, Shi JX, Li JS, Li WQ, Wu W. Expressions of intestinal NF-kappaB, TNF-alpha, and IL-6 following traumatic brain injury in rats. *J Surg Res* 2005; 123(2):188-193.
- (161) Schinkel C, Zimmer S, Kremer JP, Walz A, Rordorf-Adam C, Henckel vD et al. Comparative analysis of transcription and protein release of the inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 beta) and interleukin-8 (IL-8) following major burn and mechanical trauma. *Shock* 1995; 4(4):241-246.
- (162) Ono M, Yu B, Hardison EG, Mastrangelo MA, Tweardy DJ. Increased susceptibility to liver injury after hemorrhagic shock in rats chronically fed ethanol: role of nuclear factor-kappa B, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Shock* 2004; 21(6):519-525.
- (163) Adib-Conquy M, Asehnoune K, Moine P, Cavillon JM. Long-term-impaired expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha in peripheral blood mononuclear cells of trauma patients. *J Leukoc Biol* 2001; 70(1):30-38.
- (164) Cioffi WG, Bureson DG, Pruitt BA, Jr. Leukocyte responses to injury. *Arch Surg* 1993; 128(11):1260-1267.
- (165) Pepperl S, Dorger M, Ringel F, Kupatt C, Krombach F. Hyperoxia upregulates the NO pathway in alveolar macrophages in vitro: role of AP-1 and NF-kappaB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280(5):L905-L913.
- (166) van den BR, Haenen GR, van den BH, Bast A. Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr* 2001; 86 Suppl 1:S121-S127.

- (167) Ruchholtz S, Nast-Kolb D, Waydhas C, Lefering R. [The trauma register of the 'Polytrauma' Committee of the German Society of Trauma Surgery as the basis for quality management in the management of severely injured patients]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1997; 114:1265-1267.
- (168) Greenspan L, McLellan BA, Greig H. Abbreviated Injury Scale and Injury Severity Score: a scoring chart. *J Trauma* 1985; 25(1):60-64.
- (169) Stewart TC, Lane PL, Stefanits T. An evaluation of patient outcomes before and after trauma center designation using Trauma and Injury Severity Score analysis. *J Trauma* 1995; 39(6):1036-1040.
- (170) Osler T, Baker SP, Long W. A modification of the injury severity score that both improves accuracy and simplifies scoring. *J Trauma* 1997; 43(6):922-925.
- (171) Lefering R, Goris RJ, van Nieuwenhoven EJ, Neugebauer E. Revision of the multiple organ failure score. *Langenbecks Arch Surg* 2002; 387(1):14-20.
- (172) Aslar AK, Kuzu MA, Elhan AH, Tanik A, Hengirmen S. Admission lactate level and the APACHE II score are the most useful predictors of prognosis following torso trauma. *Injury* 2004; 35(8):746-752.
- (173) Kamolz LP, Andel H, Schramm W, Meissl G, Herndon DN, Frey M. Lactate: early predictor of morbidity and mortality in patients with severe burns. *Burns* 2005; 31(8):986-990.
- (174) Schulman AM, Claridge JA, Carr G, Diesen DL, Young JS. Predictors of patients who will develop prolonged occult hypoperfusion following blunt trauma. *J Trauma* 2004; 57(4):795-800.
- (175) James JH, Luchette FA, McCarter FD, Fischer JE. Lactate is an unreliable indicator of tissue hypoxia in injury or sepsis. *Lancet* 1999; 354(9177):505-508.
- (176) James PM, Jr., Bredenberg CE, Jr., Collins JA, Hightower F. Tolerance of lactate infusion by wounded in hemorrhagic shock. *Am Surg* 1972; 38(3):124-129.
- (177) Baker SP, O'Neill B. The injury severity score: an update. *J Trauma* 1976; 16(11):882-885.
- (178) Baker SP, O'Neill B, Haddon W, Jr., Long WB. The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J Trauma* 1974; 14(3):187-196.
- (179) Steinbach G, Bolke E, Schulte Am EJ, Peiper M, Zant R, Schwarz A et al. Comparison of whole blood interleukin-8 and plasma interleukin-8 as a predictor for sepsis in postoperative patients. *Clin Chim Acta* 2006.
- (180) Biberthaler P, Stegmaier J, Mayer V, Kirchhoff C, Neth P, Mussack T et al. Initial posttraumatic translocation of NF-kappaB and TNF-alpha mRNA expression in peripheral blood monocytes of trauma patients with multiple injuries: a pilot study. *Shock* 2004; 22(6):527-532.

- (181) Stegmaier J, Kirchhoff C, Kanz KG, Mayer V, Landes J, Euler E et al. Analysis of NF-kappaB nuclear translocation in PMN-neutrophils of major trauma patients in the early post-traumatic period: a pilot study. *World J Surg* 2006; 30(12):2142-2151.
- (182) Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996; 125(8):680-687.
- (183) Faist E, Schinkel C, Zimmer S. Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World J Surg* 1996; 20(4):454-459.
- (184) Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Sauaia A, Banerjee A, Peterson VM. Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure. *J Trauma* 1995; 39(3):411-417.
- (185) Kanz KG, Eitel F, Waldner H, Schweiberer L. [Development of clinical algorithms for quality assurance in management of multiple trauma]. *Unfallchirurg* 1994; 97(6):303-307.
- (186) Mutschler W, Marzi I. [Management of polytrauma]. *Zentralbl Chir* 1996; 121(11):895.
- (187) Schweiberer L, Nast-Kolb D, Duswald KH, Waydhas C, Muller K. [Polytrauma--treatment by the staged diagnostic and therapeutic plan]. *Unfallchirurg* 1987; 90(12):529-538.
- (188) Kanz KG, Sturm JA, Mutschler W. [Algorithm for prehospital blunt trauma management]. *Unfallchirurg* 2002; 105(11):1007-1014.
- (189) Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999; 45(1):7-17.
- (190) Wick M, Ekkernkamp A, Muhr G. [The epidemiology of multiple trauma]. *Chirurg* 1997; 68(11):1053-1058.
- (191) Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Moser KS, Brennan R, Read RA et al. Epidemiology of trauma deaths: a reassessment. *J Trauma* 1995; 38(2):185-193.
- (192) Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods* 1997; 200(1-2):173-179.
- (193) Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods* 1997; 200(1-2):173-179.
- (194) Cotter MJ, Norman KE, Hellewell PG, Ridger VC. A novel method for isolation of neutrophils from murine blood using negative immunomagnetic separation. *Am J Pathol* 2001; 159(2):473-481.

- (195) Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods* 1997; 200(1-2):173-179.
- (196) Green DR, Faist E. Trauma and the immune response. *Immunol Today* 1988; 9(9):253-255.
- (197) Ono M, Yu B, Hardison EG, Mastrangelo MA, Tweardy DJ. Increased susceptibility to liver injury after hemorrhagic shock in rats chronically fed ethanol: role of nuclear factor-kappa B, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Shock* 2004; 21(6):519-525.
- (198) Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med* 2003; 31(1 Suppl):S105-S111.
- (199) Green DR, Faist E. Trauma and the immune response. *Immunol Today* 1988; 9(9):253-255.
- (200) McDonald PP, Bald A, Cassatella MA. Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* 1997; 89(9):3421-3433.
- (201) Adib-Conquy M, Asehnoune K, Moine P, Cavaillon JM. Long-term-impaired expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha in peripheral blood mononuclear cells of trauma patients. *J Leukoc Biol* 2001; 70(1):30-38.
- (202) van den BR, Haenen GR, van den BH, Bast A. Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr* 2001; 86 Suppl 1:S121-S127.
- (203) Laniel MA, Guerin SL. Improving sensitivity of the electrophoretic mobility shift assay by restricting tissue phosphatase activities. *Biotechniques* 1998; 24(6):964-970.
- (204) Wang J, Li ML, Hua D, Chen Q. Exonuclease-mediated ELISA-like assay for detecting DNA-binding activity of transcription factors: measurement of activated NF-kappaB. *Biotechniques* 2006; 41(1):79-88, 90.
- (205) Santhi WS, Sebastian P, Varghese BT, Prakash O, Pillai MR. NF-kappaB and COX-2 during oral tumorigenesis and in assessment of minimal residual disease in surgical margins. *Exp Mol Pathol* 2006; 81(2):123-130.
- (206) Zhang L, Jin M, Hu XS, Zhu JH. Homocysteine stimulates nuclear factor kappaB activity and interleukin-6 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Cell Biol Int* 2006; 30(7):592-597.
- (207) Wang J, Li ML, Hua D, Chen Q. Exonuclease-mediated ELISA-like assay for detecting DNA-binding activity of transcription factors: measurement of activated NF-kappaB. *Biotechniques* 2006; 41(1):79-88, 90.
- (208) Osawa Y, Iho S, Takauji R, Takatsuka H, Yamamoto S, Takahashi T et al. Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2006; 177(7):4841-4852.

- (209) Lackman RL, Cresswell P. Exposure of the promonocytic cell line THP-1 to *Escherichia coli* induces IFN-gamma-inducible lysosomal thiol reductase expression by inflammatory cytokines. *J Immunol* 2006; 177(7):4833-4840.
- (210) Wang J, Li ML, Hua D, Chen Q. Exonuclease-mediated ELISA-like assay for detecting DNA-binding activity of transcription factors: measurement of activated NF-kappaB. *Biotechniques* 2006; 41(1):79-88, 90.
- (211) Osawa Y, Iho S, Takauji R, Takatsuka H, Yamamoto S, Takahashi T et al. Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2006; 177(7):4841-4852.
- (212) Lackman RL, Cresswell P. Exposure of the promonocytic cell line THP-1 to *Escherichia coli* induces IFN-gamma-inducible lysosomal thiol reductase expression by inflammatory cytokines. *J Immunol* 2006; 177(7):4833-4840.
- (213) Osawa Y, Iho S, Takauji R, Takatsuka H, Yamamoto S, Takahashi T et al. Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2006; 177(7):4841-4852.
- (214) Pastores SM, Thakkar A, Gennis P, Katz DP, Kvetan V. Posttraumatic multiple-organ dysfunction syndrome: role of mediators in systemic inflammation and subsequent organ failure. *Acad Emerg Med* 1996; 3(6):611-622.
- (215) Plank LD, Hill GL. Sequential metabolic changes following induction of systemic inflammatory response in patients with severe sepsis or major blunt trauma. *World J Surg* 2000; 24(6):630-638.
- (216) Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Haenel JB, Read RA, Lezotte DC. Early predictors of postinjury multiple organ failure. *Arch Surg* 1994; 129(1):39-45.
- (217) Schinkel C, Zimmer S, Kremer JP, Walz A, Rordorf-Adam C, Henckel vD et al. Comparative analysis of transcription and protein release of the inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 beta) and interleukin-8 (IL-8) following major burn and mechanical trauma. *Shock* 1995; 4(4):241-246.
- (218) Moore FA, Moore EE, Read RA. Postinjury multiple organ failure: role of extrathoracic injury and sepsis in adult respiratory distress syndrome. *New Horiz* 1993; 1(4):538-549.
- (219) Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am* 1995; 75(2):257-277.
- (220) Moore FA, Moore EE, Read RA. Postinjury multiple organ failure: role of extrathoracic injury and sepsis in adult respiratory distress syndrome. *New Horiz* 1993; 1(4):538-549.
- (221) Beal AL, Cerra FB. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *JAMA* 1994; 271(3):226-233.

- (222) Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am* 1995; 75(2):257-277.
- (223) Deitch EA, Goodman ER. Prevention of multiple organ failure. *Surg Clin North Am* 1999; 79(6):1471-1488.
- (224) Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 2001; 193(3):237-244.
- (225) Faist E, Baue AE, Dittmer H, Heberer G. Multiple organ failure in polytrauma patients. *J Trauma* 1983; 23(9):775-787.
- (226) Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 2005; 36(6):691-709.
- (227) Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 2001; 193(3):237-244.
- (228) Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Haenel JB, Read RA, Lezotte DC. Early predictors of postinjury multiple organ failure. *Arch Surg* 1994; 129(1):39-45.
- (229) Schinkel C, Zimmer S, Kremer JP, Walz A, Rordorf-Adam C, Henckel vD et al. Comparative analysis of transcription and protein release of the inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 beta) and interleukin-8 (IL-8) following major burn and mechanical trauma. *Shock* 1995; 4(4):241-246.
- (230) Pastores SM, Thakkar A, Gennis P, Katz DP, Kvetan V. Posttraumatic multiple-organ dysfunction syndrome: role of mediators in systemic inflammation and subsequent organ failure. *Acad Emerg Med* 1996; 3(6):611-622.
- (231) Plank LD, Hill GL. Sequential metabolic changes following induction of systemic inflammatory response in patients with severe sepsis or major blunt trauma. *World J Surg* 2000; 24(6):630-638.
- (232) Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Haenel JB, Read RA, Lezotte DC. Early predictors of postinjury multiple organ failure. *Arch Surg* 1994; 129(1):39-45.
- (233) Schinkel C, Zimmer S, Kremer JP, Walz A, Rordorf-Adam C, Henckel vD et al. Comparative analysis of transcription and protein release of the inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 beta) and interleukin-8 (IL-8) following major burn and mechanical trauma. *Shock* 1995; 4(4):241-246.
- (234) Robinson CM. Current concepts of respiratory insufficiency syndromes after fracture. *J Bone Joint Surg Br* 2001; 83(6):781-791.
- (235) Antrum RM, Solomkin JS. Complement activation products and monocyte migratory function in trauma. *Curr Surg* 1985; 42(4):301-303.
- (236) Schlag G, Redl H. Mediators of injury and inflammation. *World J Surg* 1996; 20(4):406-410.
- (237) Cioffi WG, Burleson DG, Pruitt BA, Jr. Leukocyte responses to injury. *Arch Surg* 1993; 128(11):1260-1267.

- (238) van den BR, Haenen GR, van den BH, Bast A. Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr* 2001; 86 Suppl 1:S121-S127.
- (239) Armstead VE, Opentanova IL, Minchenko AG, Lefer AM. Tissue factor expression in vital organs during murine traumatic shock: role of transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Anesthesiology* 1999; 91(6):1844-1852.
- (240) Laudanski K, Wyczechowska D. Monocyte-related immunopathologies in trauma patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53(4):321-328.
- (241) Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 1999; 11(3):153-159.
- (242) Zedler S, Bone RC, Baue AE, von Donnersmarck GH, Faist E. T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med* 1999; 27(1):66-72.
- (243) Ballard-Croft C, Maass DL, Sikes P, White J, Horton J. Activation of stress-responsive pathways by the sympathetic nervous system in burn trauma. *Shock* 2002; 18(1):38-45.
- (244) Bell MJ, Kochanek PM, Doughty LA, Carcillo JA, Adelson PD, Clark RS et al. Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma* 1997; 14(7):451-457.
- (245) Bhaumik G, Srivastava KK, Selvamurthy W, Purkayastha SS. The role of free radicals in cold injuries. *Int J Biometeorol* 1995; 38(4):171-175.
- (246) Biffi WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg* 1996; 224(5):647-664.
- (247) Carsin H, Assicot M, Feger F, Roy O, Pennacino I, Le Bever H et al. Evolution and significance of circulating procalcitonin levels compared with IL-6, TNF alpha and endotoxin levels early after thermal injury. *Burns* 1997; 23(3):218-224.
- (248) Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47(6):921-928.
- (249) Hang CH, Shi JX, Li JS, Li WQ, Yin HX. Up-regulation of intestinal nuclear factor kappa B and intercellular adhesion molecule-1 following traumatic brain injury in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11(8):1149-1154.
- (250) Ono M, Yu B, Hardison EG, Mastrangelo MA, Tweardy DJ. Increased susceptibility to liver injury after hemorrhagic shock in rats chronically fed ethanol: role of nuclear factor-kappa B, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Shock* 2004; 21(6):519-525.
- (251) Schinkel C, Licht K, Zedler S, Schinkel S, Fraunberger P, Fuchs D et al. Interferon-gamma modifies cytokine release in vitro by monocytes from surgical patients. *J Trauma* 2001; 50(2):321-327.
- (252) Schilling D, Beissert T, Fenton MJ, Nixdorff K. Negative regulation of IL-1beta production at the level of transcription in macrophages stimulated with LPS. *Cytokine* 2001; 16(2):51-61.

- (253) Takahashi GW, Andrews DF, III, Lilly MB, Singer JW, Alderson MR. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes. *Blood* 1993; 81(2):357-364.
- (254) Robinson CM. Current concepts of respiratory insufficiency syndromes after fracture. *J Bone Joint Surg Br* 2001; 83(6):781-791.
- (255) Cioffi WG, Bureson DG, Pruitt BA, Jr. Leukocyte responses to injury. *Arch Surg* 1993; 128(11):1260-1267.
- (256) van den BR, Haenen GR, van den BH, Bast A. Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. *Br J Nutr* 2001; 86 Suppl 1:S121-S127.
- (257) Ege T, Us MH, Sungun M, Duran E. Cytokine response in lower extremity ischaemia/reperfusion. *J Int Med Res* 2004; 32(2):124-131.
- (258) Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, Hall JC. Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust N Z J Surg* 1998; 68(8):554-561.
- (259) Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, Wolf DA, Zahler S, Boekstegers P et al. Tumor necrosis factor-alpha contributes to ischemia- and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res* 1999; 84(4):392-400.
- (260) Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37(4):1653-1656.
- (261) Rose S, Marzi I. Mediators in polytrauma--pathophysiological significance and clinical relevance. *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383(3-4):199-208.
- (262) Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R et al. Ischemia at 4 degrees C: a novel mouse model to investigate the effect of hypothermia on postischemic hepatic microcirculatory injury. *Res Exp Med (Berl)* 2001; 200(2):93-105.
- (263) Ulmer AJ, Flad H, Rietschel T, Mattern T. Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). *Toxicology* 2000; 152(1-3):37-45.
- (264) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249(4975):1431-1433.
- (265) Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001; 13(2):85-94.
- (266) West MA, Baker J, Bellingham J. Kinetics of decreased LPS-stimulated cytokine release by macrophages exposed to CO₂. *J Surg Res* 1996; 63(1):269-274.
- (267) McDonald PP, Bald A, Cassatella MA. Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* 1997; 89(9):3421-3433.
- (268) Schinkel C, Zimmer S, Kremer JP, Walz A, Rordorf-Adam C, Henckel vD et al. Comparative analysis of transcription and protein release of the inflammatory cyto-

- kines interleukin-1 beta (IL-1 beta) and interleukin-8 (IL-8) following major burn and mechanical trauma. *Shock* 1995; 4(4):241-246.
- (269) Ono M, Yu B, Hardison EG, Mastrangelo MA, Tweardy DJ. Increased susceptibility to liver injury after hemorrhagic shock in rats chronically fed ethanol: role of nuclear factor-kappa B, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Shock* 2004; 21(6):519-525.
- (270) Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002; 168(7):3536-3542.
- (271) Arnalich F, Garcia-Palomero E, Lopez J, Jimenez M, Madero R, Renart J et al. Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect Immun* 2000; 68(4):1942-1945.
- (272) Adib-Conquy M, Asehnoune K, Moine P, Cavaillon JM. Long-term-impaired expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha in peripheral blood mononuclear cells of trauma patients. *J Leukoc Biol* 2001; 70(1):30-38.
- (273) Volk HD, Reinke P, Docke WD. Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem Immunol* 2000; 74:162-177.
- (274) Biberthaler P, Stegmaier J, Mayer V, Kirchhoff C, Neth P, Mussack T et al. Initial posttraumatic translocation of NF-kappaB and TNF-alpha mRNA expression in peripheral blood monocytes of trauma patients with multiple injuries: a pilot study. *Shock* 2004; 22(6):527-532.
- (275) Kobayashi SD, Voyich JM, Whitney AR, Deleo FR. Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *J Leukoc Biol* 2005; 78(6):1408-1418.
- (276) Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods* 1997; 200(1-2):173-179.
- (277) McDonald PP, Bald A, Cassatella MA. Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* 1997; 89(9):3421-3433.
- (278) Stegmaier J, Kirchhoff C, Kanz KG, Mayer V, Landes J, Euler E et al. Analysis of NF-kappaB nuclear translocation in PMN-neutrophils of major trauma patients in the early post-traumatic period: a pilot study. *World J Surg* 2006; 30(12):2142-2151.
- (279) Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F et al. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* 2001; 166(12):7128-7135.
- (280) Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomao R. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* 2003; 20(3):208-212.

- (281) Baichwal VR, Baeuerle PA. Activate NF-kappa B or die? *Curr Biol* 1997; 7(2):R94-R96.
- (282) Kobayashi SD, Voyich JM, Whitney AR, Deleo FR. Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *J Leukoc Biol* 2005; 78(6):1408-1418.
- (283) Osler T, Baker SP, Long W. A modification of the injury severity score that both improves accuracy and simplifies scoring. *J Trauma* 1997; 43(6):922-925.
- (284) Oestern HJ, Kabus K. [Comparison of various trauma score systems. An overview]. *Unfallchirurg* 1994; 97(4):177-184.
- (285) Osler T, Baker SP, Long W. A modification of the injury severity score that both improves accuracy and simplifies scoring. *J Trauma* 1997; 43(6):922-925.
- (286) Waydhas C, Nast-Kolb D, Trupka A, Zettl R, Kick M, Wiesholler J et al. Posttraumatic inflammatory response, secondary operations, and late multiple organ failure. *J Trauma* 1996; 40(4):624-630.
- (287) Waydhas C, Nast-Kolb D, Jochum M, Trupka A, Lenk S, Fritz H et al. Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma. *Arch Surg* 1992; 127(4):460-467.
- (288) Ertel W, Keel M, Marty D, Hoop R, Safret A, Stocker R et al. [Significance of systemic inflammation in 1,278 trauma patients]. *Unfallchirurg* 1998; 101(7):520-526.
- (289) Rutledge R, Hoyt DB, Eastman AB, Sise MJ, Velky T, Canty T et al. Comparison of the Injury Severity Score and ICD-9 diagnosis codes as predictors of outcome in injury: analysis of 44,032 patients. *J Trauma* 1997; 42(3):477-487.
- (290) Rutledge R. Injury severity and probability of survival assessment in trauma patients using a predictive hierarchical network model derived from ICD-9 codes. *J Trauma* 1995; 38(4):590-597.
- (291) Laird AM, Miller PR, Kilgo PD, Meredith JW, Chang MC. Relationship of early hyperglycemia to mortality in trauma patients. *J Trauma* 2004; 56(5):1058-1062.
- (292) Lefering R, Goris RJ, van Nieuwenhoven EJ, Neugebauer E. Revision of the multiple organ failure score. *Langenbecks Arch Surg* 2002; 387(1):14-20.
- (293) Grotz M, von Griensven M, Stalp M, Kaufmann U, Hildebrand F, Pape HC. [Scoring multiple organ failure after severe trauma. Comparison of the Goris, Marshall and Moore scores]. *Chirurg* 2001; 72(6):723-730.
- (294) Aslar AK, Kuzu MA, Elhan AH, Tanik A, Hengirmen S. Admission lactate level and the APACHE II score are the most useful predictors of prognosis following torso trauma. *Injury* 2004; 35(8):746-752.
- (295) Kamolz LP, Andel H, Schramm W, Meissl G, Herndon DN, Frey M. Lactate: early predictor of morbidity and mortality in patients with severe burns. *Burns* 2005; 31(8):986-990.

- (296) Schulman AM, Claridge JA, Carr G, Diesen DL, Young JS. Predictors of patients who will develop prolonged occult hypoperfusion following blunt trauma. *J Trauma* 2004; 57(4):795-800.
- (297) James JH, Luchette FA, McCarter FD, Fischer JE. Lactate is an unreliable indicator of tissue hypoxia in injury or sepsis. *Lancet* 1999; 354(9177):505-508.
- (298) James PM, Jr., Bredenberg CE, Jr., Collins JA, Hightower F. Tolerance of lactate infusion by wounded in hemorrhagic shock. *Am Surg* 1972; 38(3):124-129.
- (299) Ogura H, Tanaka H, Koh T, Hashiguchi N, Kuwagata Y, Hosotsubo H et al. Priming, second-hit priming, and apoptosis in leukocytes from trauma patients. *J Trauma* 1999; 46(5):774-781.
- (300) Ogura H, Hashiguchi N, Tanaka H, Koh T, Noborio M, Nakamori Y et al. Long-term enhanced expression of heat shock proteins and decelerated apoptosis in polymorphonuclear leukocytes from major burn patients. *J Burn Care Rehabil* 2002; 23(2):103-109.
- (301) Pallister I, Bhatia R, Katpalli G, Allison D, Parker C, Topley N. Alteration of polymorphonuclear neutrophil surface receptor expression and migratory activity after isolation: comparison of whole blood and isolated PMN preparations from normal and postfracture trauma patients. *J Trauma* 2006; 60(4):844-850.
- (302) Bhatia R, Dent C, Topley N, Pallister I. Neutrophil priming for elastase release in adult blunt trauma patients. *J Trauma* 2006; 60(3):590-596.
- (303) Nolan B, Collette H, Baker S, Duffy A, De M, Miller C et al. Inhibition of neutrophil apoptosis after severe trauma is NFkappabeta dependent. *J Trauma* 2000; 48(4):599-604.
- (304) Cogswell PC, Kashatus DF, Keifer JA, Guttridge DC, Reuther JY, Bristow C et al. NF-kappa B and I kappa B alpha are found in the mitochondria. Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF-kappa B. *J Biol Chem* 2003; 278(5):2963-2968.
- (305) Knoferl MW, Angele MK, Diodato MD, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG et al. Female sex hormones regulate macrophage function after trauma-hemorrhage and prevent increased death rate from subsequent sepsis. *Ann Surg* 2002; 235(1):105-112.
- (306) Hildebrand F, Pape HC, Griensven M, Meier S, Hasenkamp S, Krettek C et al. Genetic predisposition for a compromised immune system after multiple trauma. *Shock* 2005; 24(6):518-522.
- (307) Ono M, Yu B, Hardison EG, Mastrangelo MA, Tweardy DJ. Increased susceptibility to liver injury after hemorrhagic shock in rats chronically fed ethanol: role of nuclear factor-kappa B, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Shock* 2004; 21(6):519-525.
- (308) Choudhry MA, Schwacha MG, Hubbard WJ, Kerby JD, Rue LW, Bland KI et al. Gender differences in acute response to trauma-hemorrhage. *Shock* 2005; 24 Suppl 1:101-106.

- (309) Horton JW, White DJ, Maass DL. Gender-related differences in myocardial inflammatory and contractile responses to major burn trauma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286(1):H202-H213.
- (310) Schroder J, Kahlke V, Staubach KH, Zabel P, Stuber F. Gender differences in human sepsis. *Arch Surg* 1998; 133(11):1200-1205.
- (311) Islam KN, Devaraj S, Jialal I. alpha-Tocopherol enrichment of monocytes decreases agonist-induced adhesion to human endothelial cells. *Circulation* 1998; 98(21):2255-2261.
- (312) Bowie A, O'Neill LA. Studies into the mechanism of NF kappa B activation by IL1, TNF and H2O2 in primary and transformed endothelial cells. *Biochem Soc Trans* 1997; 25(1):125S.
- (313) Roth J, Goebeler M, Ludwig S, Wagner L, Kilian K, Sorg C et al. Homocysteine inhibits tumor necrosis factor-induced activation of endothelium via modulation of nuclear factor-kappa b activity. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1540(2):154-165.
- (314) Schreck R, Baeuerle PA. Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-kappa B. *Methods Enzymol* 1994; 234:151-163.
- (315) Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS, Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995; 270(5234):283-286.
- (316) Bowie A, O'Neill LA. Studies into the mechanism of NF kappa B activation by IL1, TNF and H2O2 in primary and transformed endothelial cells. *Biochem Soc Trans* 1997; 25(1):125S.

8. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ARDS	<i>Adult Respiratory Distress Syndrome</i> , akutes Lungenversagen
ANV	Akutes, als posttraumatisches zumeist prä-renales Nierenversagen
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome, auch als <i>second hit</i> bezeichnete kompensatorische, posttraumatischen Entzündungsreaktion
DNA	Die Gesamtheit der genetischen Information eines Organismus enthaltende Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acids</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked Immuno Sorbent Assay, auf Antikörperbindung basierende Methode zur (semi-) quantitativen Proteinnachweises
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> , auf radioaktiver Phosphorylierung basierende experimentelle Nachweismethode der nukleären translokation zytoplasmatischer Proteine
I κ B	Inhibitor κ B, inhibitorisch auf NF- κ B wirkendes Protein
IKK	I κ B α -Kinase-Komplex
IL	Interleukin
ISS	<i>Injury Severity Score</i> , Ausmaß der anatomischen Verletzungsschwere

LPS	Auf der Oberfläche gram-negativer Bakterien exprimiertes Lipopolysaccharid
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MODS	<i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i> , Multiorgan-Dysfunktionssyndrom
MOF	Multiple Organ Failure, Multiorganversagen
MW	Mittelwert
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NK	Natürliche Killerzellen
NISS	<i>New Injury Severity Score</i> , T. Osler, (167)
PMN	Polymorphonucleäre neutrophile Granulozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RES	Retikulo-Endotheliales System, Gesamtheit aller zur Phagozytose befähigten Zellen
ROI	Reaktive Sauerstoffmetabolite
SEM	<i>Standard error of the means</i> , Standardabweichung der Mittelwerte
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> , posttraumatische, systemische Entzündungsreaktion
TEMED	N,N,N,N'-Tetraethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Julia Cornelia Gabriele Stegmaier
Geburtsdaten: * 23. 06. 1975 in München
Konfession: Römisch-katholisch
Eltern: Heinz D. H. Stegmaier, Studienrat a. D.
Renate S. L. Stegmaier, geborene Fischer

Schulbildung:

1981- 85 Grundsule am Dom-Pedro-Platz, 80636 München
1985- 95 Luisengymnasium 80333 München, Abitur: 30.06.1995
08/ 95 – 10/ 95 Pflegepraktikum, Deutsches Herzzentrum München, Internistische Intensivstation
10/ 95 – 09/ 96 Entwicklunghilfeprojekt der Iglesia Luterana Alemana, San Jose, Costa Rica
10/96 – 06/04 Praktikum/ studentische Tätigkeit Chirurgie/Orthopädie
Rot-Kreuz-Krankenhaus München

Hochschulstudium:

4/ 97- 06/ 04 Studium der Humanmedizin
Ludwig-Maximilians-Universität München
06/ 2003 – 06/ 2004 Praktisches Jahr an Lehrkrankenhäusern der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Approbation: 14.06.2004
Seit 01/2000 Experimentelle, chirurgische Forschung
AG Trauma/Resuscitation
PD Dr. med. Peter Biberthaler

Beruflicher Werdegang:

07/2004 – 10/04 Ärztin im Praktikum
Chirurgische Klinik und Poliklinik
LMU München Innenstadt

Seit 10/2004 Wissenschaftliche Assistentin
Chirurgische Klinik und Poliklinik
LMU München Innenstadt
Direktor: Prof. Dr. W. Mutschler

Mitgliedschaften:

Deutsche Gesellschaft für Chirurgie
Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie
Sektion Chirurgische Forschung der
Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

Preise, Auszeichnungen

1. Posterpreis der Vereinigung Mittelrheinischer Chirurgen:

Stegmaier J, Vester H, Ruckdeschel K, Kirchhoff C, Bogner V, Heesemann J, Mutschler W, Biberthaler P. Dynamik der transkriptionalen Aktivität von STAT3 und mRNA-Expression von SOCS3 in PMN-Granulozyten polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase. Posterpreis. *93. Jahrestagung der Vereinigung Mittelrheinischer Chirurgen 22-24.09.2005*

1. Posterpreis der Vereinigung der Bayerischen Chirurgen

C. Kirchhoff, **J. Stegmaier**, T. Vogel, K.-G. Kanz, S. Buhmann, W. Mutschler NT proBNP als kardialer Marker bei Patienten nach Polytrauma *Poster, 82. Jahrestagung der Vereinigung der Bayerischen Chirurgen, Bamberg, 20.-22.07.05*

1. Posterpreis der Society for Complexity in Acute Illness

Bogner V., Baker H.V., Kirchhoff C., **Stegmaier J.**, Mutschler W., Moldawer L.L., Biberthaler P. Massive blood transfusion induces characteristic monocyte mRNA expression patterns in patients after multiple major trauma: a microarray pilot study *4th International conference on complexity in acute illness, ICCAI 2005, 29.09-01.10.2005, Cologne, Abstractband*

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Stegmaier J, Biberthaler P, Kirchhoff C, Neth P, Mutschler W, Jochum M. Analyse der transkriptionalen Aktivität der p50-Untereinheit von NF- κ B in Monozyten polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase. Vortrag, 121. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin, 27.-30.04.04. In: *Ulrich B, Jauch KW, Bauer H (Hrsg.): Chirurgisches Forum 2004 für experimentelle und klinische Forschung. Springer, Berlin u.a., 2004, S.391-3, ISBN 3-540-20027-4*

Biberthaler P, Stegmaier J, Mayer V, Kirchhoff C, Neth P, Mussack T et al. Initial posttraumatic translocation of NF-kappaB and TNF-alpha mRNA expression in peripheral blood monocytes of trauma patients with multiple injuries: a pilot study. *Shock 2004; 22(6):527-532*

Stegmaier J, Kirchhoff C, Kanz KG, Mayer V, Landes J, Euler E et al. Analysis of NF-kappaB nuclear translocation in PMN-neutrophils of major trauma patients in the early post-traumatic period: a pilot study. *World J Surg 2006; 30(12):2142-2151*

10. Danksagung

Mein Dank gebührt meinem geschätzten Doktorvater und Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik, Herrn Professor Dr. med. W. Mutschler, für die jahrelange uneingeschränkte wissenschaftliche und klinische Förderung und Unterstützung.

Herrn PD Dr. med. Peter Biberthaler möchte ich auf diesem Wege herzlich für die Betreuung dieser Arbeit, für das uneingeschränkte Interesse und die permanente wissenschaftliche und klinische Förderung, sowie für die stetige Motivation und die Freundschaft danken.

Herzlichen Dank Frau Prof. Dr. rer. nat. Marianne Jochum, Leitung der Abteilung für Klinische Chemie und klinische Biochemie, sowie Frau Dr. rer. nat. Cornelia Gippner-Steppert, sowie Herrn Dr. rer. nat. Siegfried Zedler und Frau Maren Klein für die stets wohlwollende Unterstützung insbesondere der ELISA-Versuche danken.

Meinen herzlichen Dank Herrn Prof. Dr. K. Brandt, sowie Frau G. Eisele des Institutes für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums München Rechts-der Isar für die zielführende Unterstützung der EMSA-Etablierung.

Herrn Professor Dr. Dr. J. Heesemann, sowie insbesondere Herrn Dr. med. K. Ruckdeschl und Frau Gudrun Pfaffinger danke ich sehr für die jahrelange Unterstützung und Begleitung der EMSA-Experimente und die Überlassung der Laborräume des Max-von-Pettenkofer-Institutes.

Herzlichen Dank Herrn OA Dr. med. K.-G. Kanz, sowie Frau OÄ Dr. med. Th. Hummel, den Kollegen und dem Pflegepersonal der Chirurgischen Notaufnahme, sowie der Chirurgischen Intensivstation der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der LMU München Innenstadt für die permanente Unterstützung.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe *Trauma and Resuscitation*, Herrn Dr. med. Chlodwig Kirchhoff, Herrn Dr. med. Jürgen Landes und Frau Verena Mayer möchte ich für die Unterstützung der gemeinsamen Projekte und für ihre Freundschaft danken.

Darüber hinaus danke ich meiner Familie, sowie meinem Freund, Alexander Sasse für ihre Unterstützung, ihr stetiges Verständnis und konstruktive Auseinandersetzung.