

Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall-, Hand- und Plastische Chirurgie
der Ludwig - Maximilians - Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Wolf E. Mutschler

**Serumkonzentrationen der Proteine
MMP-9 und TIMP-1
bei polytraumatisierten Patienten
in der frühen posttraumatischen Phase**

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

vorgelegt von

Mareen Brumann

aus

Münster

2013

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Kim Alexander Boost
Prof. Dr. med. Gerd Regel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Viktoria Bogner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Hintergrund	7
1.1.	Das Polytrauma	7
1.2.	Immunologische Aktivierung - die Entstehung von SIRS, CARS und MARS	11
1.3.	Matrixmetalloproteinasen (MMP-9) und ihre Inhibitoren (TIMP-1)	17
1.3.1.	Die Familie der Matrixmetalloproteinasen	20
1.3.2.	Die Rolle der MMPs und TIMPs im Rahmen der Inflammation	20
1.3.3.	Regulation der MMPs und ihrer Inhibitoren	22
2.	Zielsetzung	25
3.	Patienten und Methoden	28
3.1.	Studiendesign	28
3.2.	Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels ELISA	29
3.3.	Schweregradeinteilung des Verletzungsmusters nach ISS	33
4.	Ergebnisse	34
4.1.	Patienten	34
4.1.1.	Klinische Daten	34
4.1.2.	Epidemiologische Daten	35
4.2.	Serumkonzentration der Proteine MMP-9 und TIMP-1	37
4.2.1.	Serumkonzentration von MMP-9	37
4.2.2.	Serumkonzentration von TIMP-1	38
4.2.3.	Verletzungsschwere und MMP-9	39
4.2.4.	Verletzungsschwere und TIMP-1	40
4.2.5.	Outcome und MMP-9	41
4.2.6.	Outcome und TIMP-1	42
5.	Diskussion	44
5.1.	Methodische Aspekte	46
5.1.1.	Klinische Daten	46
5.1.2.	Studiendesign	47
5.1.3.	Zeitpunkt der Probengewinnung	49
5.1.4.	Serum als Medium für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen	50
5.2.	Serumkonzentrationen	52
5.2.1.	Zeitlicher Verlauf	52
5.2.2.	Korrelation der Serumkonzentrationen mit klinischen Parametern	55
5.2.3.	Mögliche Ursachen für die unterschiedliche Reproduzierbarkeit der vorhergehenden Ergebnisse auf Serumebene	56
5.2.4.	Interpretationsansatz	62

6. Zusammenfassung	66
7. Literatur	69
8. Danksagung	81

Für meine geliebten Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Mediators of Inflammation 2012; 2012:435463

Concentration kinetics of serum MMP-9 and TIMP-1 after blunt multiple injuries in the early posttraumatic period

Brumann M, Kusmenkov T, Ney L, Kanz KG, Leidel BA, Biberthaler P, Mutschler W, Bogner V

1. Einleitung und Hintergrund

1.1. Das Polytrauma

Die Behandlung eines polytraumatisierten Menschen stellt nach wie vor eine der größten Herausforderungen der Medizin dar. Der Definition nach *Tscherne* von 1987 folgend, bezeichnet man mehrere gleichzeitig geschehene Verletzungen verschiedener Körperregionen, wobei mindestens eine oder die Kombination mehrerer Verletzungen lebensbedrohlich ist, als Polytrauma (1). Das gebräuchlichste Scoring-System zur Einteilung dieser schweren Mehrfachverletzungen stellt der *Injury Severity Score*, kurz der *ISS*, dar (2). Eine Verletzung mit einem Schweregrad von 16 Punkten entsprechend des *Injury Severity Scores (ISS)* wird als Polytrauma gewertet [(3); (4)].

Folgt man *Bardenhauer et al* so ist der Verkehrsunfall mit 56,7% in über der Hälfte aller Fälle die häufigste Ursache für ein Polytrauma. Mit 13,9% stellen Stürze aus großer Höhe die zweithäufigste Ursache für eine lebensgefährliche Mehrfachverletzung dar, die dritthäufigste Ursache für eine Polytraumatisierung stellen lebensgefährliche Verletzungen im Rahmen von Suizidversuchen dar (7,4%) (5). Insgesamt kam es in Deutschland laut den Zahlen des Statistischen Bundesamtes im Jahr 2011 zu insgesamt 396.374 Verunglückten bei Straßenverkehrsunfällen. Bei 4.009 Patienten führte dieser Unfall zum Tode. 2011 kam es erstmals seit 20 Jahren wieder zu mehr Todesopfern im Straßenverkehr. Auch die Zahl der Verletzten hat seit 20 Jahren erstmals im Jahr 2011 wieder zugenommen. Ursachen für diese gegensätzliche Entwicklung der ansonsten deutlichen rückläufigen Unfallzahlen in den letzten zwei Jahrzehnten werden vor allem in den schlechten und häufig wechselnden Witterungsbedingungen der letzten zwei Jahre gesehen (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2012). Ansonsten spiegeln die stetig sinkenden Zahlen der Verkehrstoten und Verunglückten auf der einen Seite die Verbesserungen auf dem Gebiet der Sicherheitsstandards insbesondere

im Verkehr und auf der anderen Seite die Entwicklung und den Fortschritt in der Medizin im Verlauf der letzten Jahre wieder. Die kontinuierliche Optimierung der Therapieregime sowie die Anpassung des Zeitmanagements bei der Primärversorgung polytraumatisierter Patienten an deren spezielle Bedürfnisse hat in den letzten Jahren zu einer deutlichen Senkung der Mortalität geführt. Den aktuellen Zahlen des TraumaRegisters der DGU zufolge findet sich eine Letalität von 12,8% unter den polytraumatisierten Patienten, welche das Krankenhaus lebend erreichen (TraumaRegister DGU, Jahresbericht 2012).

Betrachtet man die unterschiedlichen Todesursachen der polytraumatisierten Patienten, lassen sich diese hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs nach erlittenem Trauma und schließlich entsprechend der jeweiligen posttraumatischen Todesursache nach *Trunkey* in drei Gruppen unterteilen (6):

Das *erste Drittel der polytraumatisierten Patienten* verstirbt schon unmittelbar an der Unfallstelle oder innerhalb der ersten 60 Minuten nach Trauma an Verletzungen, die mit dem Überleben nicht vereinbar sind.

Das *zweite Drittel der polytraumatisierten Patienten* ist vor allem während der frühen posttraumatischen Phase gefährdet. Wenn diese Patienten versterben, dann geschieht dies meistens im Schockraum oder innerhalb der ersten vier Stunden nach Trauma an den Folgen schwerster Schädel-Hirn-Traumata (44,9%) oder durch nicht beherrschbare Massenblutungen (35,2%) (6). Aus pathophysiologischer Sicht sind diese Patienten vornehmlich durch die primären Auswirkungen des Blutverlustes gefährdet. Das bedeutet, diese Patienten versterben infolge der durch den Blutverlust erlittenen Hypovolämie und den damit verbundener Folgen der Sauerstoffmangelversorgung, der Hypotension und der massiven Beeinträchtigung des Gerinnungssystems (7). Dieses Patientenkollektiv profitiert demnach von der schnellen,

prioritätenorientierten präklinischen und frühen innerklinischen Versorgung. Mit mittlerweile über einer Million *Advanced Trauma Life Support* (ATLS) zertifizierten Ärzten in über 50 Ländern dieser Welt konnte diese vulnerable Phase in der Versorgung Schwerstverletzter erfolgreich strukturiert und standardisiert werden (8). Nach der statistischen Auswertung des Traumaregisters ergibt sich eine Reduktion der Frühletalität (innerhalb von 24h) von 7,0% (2009) auf 5,3% im Jahr 2011.

Das *letzte Drittel der Patienten* ist in der späteren posttraumatischen Phase gefährdet. Diese Patienten erleiden, folgt man einer prospektiven Studie von *Ciesla et al*, in bis zu 25% der Fälle ein irreversibles Multiorganversagen (MOF) (9). Die Entwicklung eines Multiorganversagens nach erlittenem Trauma weist eine multifaktorielle Ätiologie auf. Die für die Entstehung eines Multiorganversagens wichtigen Einflussgrößen lassen sich nach *Hietbrink et al* in endogene und exogene Faktoren unterteilen (10). Zu den endogenen Einflussgrößen zählen die genetische Prädisposition sowie die Komorbiditäten der Patienten, welche ein schweres Trauma erleiden. So konnte beispielsweise eine Arbeit von *Cobb et al* eine starke Assoziation zwischen einer genetischen Variationen - wie dem TNF-alpha-Polymorphismus - und der Ausbildung eines Multiorganversagens aufzeigen (11). Zu den exogenen Faktoren zählen laut *Hietbrink* das Trauma selbst – der sogenannte „first hit“ oder „trauma load“ - sowie die dem Trauma folgende Operation oder sogar Reanimation - der sogenannte „second hit“ oder „intervention load“ (10) . Aus pathophysiologischer Sicht kommt es bei diesen Patienten im Rahmen des posttraumatischen Verlaufes zum Auftreten einer systemischen Entzündungsreaktion („systemic inflammatory response syndrome“, SIRS). Durch das Trauma wird eine akute Entzündungsreaktion mit möglicherweise konsekutiver Multiorganandysfunktion (MODS) ausgelöst. Das Ausmaß dieser Ganzkörperinflammation hängt unter anderem von „second-hit-Phänomenen“ ab und kann so auch Organe in Mitleidenschaft ziehen, die vom ursprünglichen Trauma nicht direkt betroffen

waren. Unter dem Begriff „second-hit“ werden Schäden durch Mikro- und Makrozirkulationsstörungen, Ischämie und konsekutiver Reperfusion, Hypoxie, Blutungen sowie Infektionen gefasst (12). Auch die Belastung des vorgeschädigten Organismus durch eine langandauernde oder invasive Operation zählt zu diesen „second-hits“ (13). Deshalb sollte es als oberstes Ziel in der Versorgung dieses gefährdeten Patientenkollektivs angesehen werden, die möglichen sekundären Schäden auf ein Mindestmaß zu begrenzen [(14); (15)]. Der Besonderheiten dieses Kollektivs polytraumatisierter Patienten tragen sowohl die Entwicklungen im Bereich der „Damage Control Surgery“ zur Eingrenzung des sekundären operationsbedingten Gewebeschadens als auch die interdisziplinäre intensivmedizinische Therapie Rechnung [(16); (17)].

Die Senkung der Initialmortalität polytraumatisierter Patienten konfrontiert die klinische Medizin mit einer steigenden Anzahl dieser Patienten. Diese sind im posttraumatischen Verlauf von der Entwicklung einer Immundysregulation und eines Multiorganversagens als schwerwiegende Komplikation und häufiger später Todesursache bedroht [(18); (19)]. Entsprechend einer Studie durch *Nast-Kolb et al* entwickeln 33% der Schwerverletzten im Behandlungsverlauf ein vorübergehendes Versagen mindestens eines Organsystems, bei 15% aller Patienten kommt es zu einer manifesten Multiorgandysfunktion (MODS) (20). *Ertel et al* untersuchten 1998 die Bedeutung der Ganzkörperinflammation (*Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS*) bei 1278 Traumapatienten. In einer retrospektiven Analyse konnten sie zeigen, dass der Schweregrad der systemischen Inflammationsreaktion mit der Verletzungsschwere (nach ISS) sowie der Letalität korrelierten. In ihrer Untersuchung lag die Inzidenz der Ganzkörperinflammation für das gesamte Kollektiv bei 57,6%, wobei die Inzidenz mit steigender Traumaschwere deutlich zunahm. So entwickelten 70% der schwerverletzten Patienten (ISS 16-40) und alle Patienten mit einem ISS > 40 ein SIRS. Mit der Unterteilung des SIRS nach Schweregrad (Grad 1-4) konnte gleichzeitig eine direkt

proportionale Korrelation mit der Inzidenz eines *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) sowie *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* (MODS) aufgezeigt werden. Patienten mit einer schweren systemischen Inflammationsreaktion (SIRS Grad 3-4) entwickelten in 9% bzw. 25% ein ARDS und in 22% bzw. 50% der Fälle ein MODS (21).

Bis heute sind die genauen intrazellulären pathophysiologischen Vorgänge, die zu einem posttraumatischen SIRS und MOF führen, nicht endgültig verstanden. Aus diesem Grund ist die Fokussierung auf diese bereits oben beschriebene Phase nach schwerem Trauma mit ihren dargestellten Gefahren sinnvoll und wichtig.

Ziel dieser Arbeit ist es einen Beitrag zum Verständnis posttraumatischer immunologischer Vorgänge hinsichtlich möglicher Ansätze zu Diagnostik und unter Umständen auch Prävention des posttraumatischen SIRS und MOF zu liefern.

1.2. Die immunologische Aktivierung - die Entstehung von SIRS, CARS und MARS

Die Möglichkeit, schwerstverletzte Patienten am Leben zu erhalten, resultierte zwangsläufig in der Entdeckung eines bis dahin unbekanntes posttraumatisches Syndroms: dem Multiorganversagen (MOF) (22). Das Verständnis dieses posttraumatisches Syndroms hat sich innerhalb der vergangenen Jahrzehnte gewandelt und erweitert.

Glaubte man zunächst, es handele sich hierbei um eine „unbändige Infektion“, folgte die Vorstellung von einem Syndrom, das durch den initialen Blutungs- und konsekutiven Reperfusionsschaden gekoppelt mit einer posttraumatischen Inflammationsreaktion verursacht wurde (22). In den folgenden Jahren gelangen enorme Wissensfortschritte im Hinblick auf die Definition, die Epidemiologie, einzelne Prädiktoren sowie die

zugrundeliegende pathophysiologischen Veränderungen, welche ein zunehmendes und umfassenderes Verständnis dieser posttraumatischen immunologischen Aktivierung mit darauffolgender Organschädigung erlaubten.

Häufiger Ausgangspunkt eines Multiorganversagens ist die posttraumatische immunvermittelte Inflammationsreaktion: das *Systemic Inflammatory Response Syndrome*, kurz *SIRS*. Es ist definiert als das Auftreten mindestens zweier der folgenden Kriterien [(23); (24)]:

- Temperatur $< 36^{\circ}\text{C}$ oder $> 38^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz $> 90/\text{min}$
- Atemfrequenz $> 20/\text{min}$ oder $\text{pCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$
- Leukozytenzahl $< 4 \text{ G/l}$ oder $> 12 \text{ G/l}$ oder Vorhandensein von unreifen Vorläuferzellen von mehr als 10% im peripheren Blut

Charakteristisch für den „traumatischen Schock“ ist sowohl der Blutverlust als auch der mechanische Gewebeschaden. Ersterer resultiert in einer teilweise unzureichenden Gewebepfusion und einer zellulären Hypoxie. Letzterer setzt große Mengen von RNA, DNA, zytosolischen Organellen, Matrix- und Membranfragmenten frei, mit denen sich das Immunsystem unter physiologischen Bedingungen nicht auseinandersetzen muss. Die darauffolgende Aktivierung des körpereigenen Immunsystems zieht eine Vielzahl an Veränderung des traumatisch geschädigten Organismus nach sich (22). Die durch den traumatischen „first hit“ ausgelöste Exposition dieser Antigenstrukturen führt zu einer systemische Entzündungsreaktion des Körpers [(25); (26)].

Die Aktivierung des unspezifischen Immunsystems, bestehend aus dem Komplementsystem,

und der unspezifischen zellulären Immunantwort, bestehend aus Makrophagen, Monozyten, natürlichen Killerzellen und polymorphonukleären Leukozyten (*PMNs*), ist die unmittelbare Folge des erlittenen Traumas. Hierbei aktivieren die durch die traumatische Ischämie und Reperfusion freigesetzten Sauerstoffradikale die *PMNs* und ziehen diese chemotaktisch an. Gleichzeitig kommt es als Antwort des Organismus auf den trauma-assoziierten Stress zu einer exzessiven Ausschüttung zahlreicher proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie z.B. IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α und Interferon- γ durch Makrophagen, Monozyten und *PMNs* [(26); (27); (28) (29); (30);]. Die *PMNs* sind die dominierende Zellpopulation der unspezifischen Immunabwehr und machen 50-60% aller zirkulierenden Leukozyten aus. Im Anschluss an ihre Aktivierung migrieren die *PMNs* mithilfe der Matrixmetalloproteinasen (*MMPs*) aus der Endothelmembran des Gefäßsystems in das Gewebe. Dort kommt es erneut zu einer Degranulation von freien Sauerstoffradikalen, welche wiederum zu einer Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen (insbesondere *MMP-9*) führt (26). Diese Freisetzung von *MMPs* und Sauerstoffradikalen ist entscheidend für die Funktionalität der unspezifischen Immunabwehr, führt aber im Übermaß zu einem zusätzlichen Gewebe- und Organschaden.

Eine weitere entscheidende Funktion der Zellen des unspezifischen Immunsystems liegt in der Phagozytose und anschließenden Antigenpräsentation gegenüber Zellen des spezifischen Immunsystems. So schaffen sie die Verbindung zwischen dem unspezifischen, angeborenen und dem spezifischen, adaptiven Immunsystem.

Die Entstehung eines SIRS wird hauptsächlich durch Zellen der unspezifischen Immunreaktion vermittelt (31). Aber auch Elemente des adaptiven Immunsystems spielen eine wichtige Rolle. Unter den T-Helfer-Zellen kann man in Abhängigkeit ihres Zytokinspektrums zwischen TH0-, TH1- und TH2-Zellen unterscheiden. TH0-Zellen sind

naive T-Zellen und produzieren alle Zytokine (32), während TH1-zellvermittelt vor allem TNF- α , Interferon- γ und IL-2 ausgeschüttet werden (33). Dieses Muster der proinflammatorischen Zytokinproduktion wird auch als TH1-Phänotyp der T-Lymphozyten bezeichnet (34). Leitzytokine der TH2-Zellantwort sind die antiinflammatorischen Zytokine Interleukin 4 und Interleukin 10 (32).

Interessanterweise sorgt eine im Rahmen der hyperinflammatorischen Immunantwort dauerhafte Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 dabei nicht nur für die Akute-Phase-Reaktion des posttraumatischen Immunsystems, sondern führt gleichzeitig zu einer Hochregulation einiger bedeutender antiinflammatorischen Mediatoren. Das bedeutet, dass sich an diese initiale proinflammatorische Reaktion im Rahmen des SIRS die Bildung vorwiegend antiinflammatorisch wirkender Zytokine wie beispielsweise PG-E2, IL-1ra, IL-10 und TGF- β anschließt (35). Außerdem kommt es zu einer Deaktivierung von Monozyten, einer Anergie von T-Lymphozyten und einem Verlust von Immunzellen durch Apoptose (36). Auch jetzt kommt es also zu einem posttraumatischen Zusammenspiel der angeborenen und erworbenen Immunantwort. Die spezifische TH2-vermittelte Immunantwort führt zu einer vermehrten Produktion der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10. Diese Reaktion kann als körpereigene protektive Maßnahme des angeborenen und adaptiven Immunsystems zur Eingrenzung des Gewebeschadens verstanden werden und wird heute als *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome* (CARS) bezeichnet (37). Im Rahmen dieser Immunsuppression oder von manchen Autoren sogar als Immunparalyse beschriebenen Zustands ist der polytraumatisierte Patient erneut besonders gefährdet, da das CARS sowohl zu der Entstehung infektiöser Komplikationen als auch zu der Entwicklung eines MODS prädisponiert [(38); (39); (40)].

Ein weiteres Syndrom erlangt in der neueren Literatur zunehmend Beachtung: das *Mixed Antagonist Response Syndrom* (MARS). Dieses Syndrom bezeichnete zunächst die zeitweilig hergestellte Homöostase während der Transformation von SIRS zu CARS. In einigen Studien konnte mittlerweile aber gezeigt werden, dass nicht etwa SIRS, CARS und MARS im geschädigten Organismus sequentiell aufeinander folgen, sondern dass das *Mixed Antagonist Response Syndrom* als Koinzidenz von SIRS und CARS zu verstehen ist (36).

Die folgende Abbildung stellt den Verlauf der posttraumatischen Immunreaktion graphisch dar.

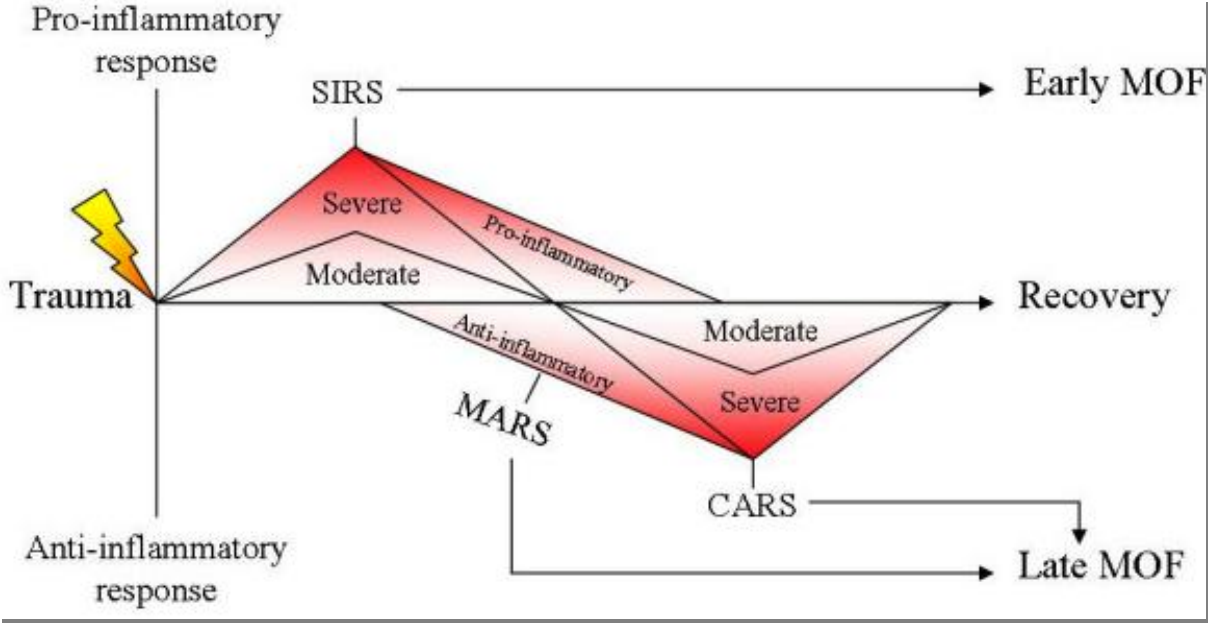


Abbildung 1: Verlauf der Immunantwort nach Trauma aus Hietbrink et al World Journal of Emergency Surgery 2006, 1:15

1.3. Matrixmetalloproteinasen (MMP-9) und ihre Inhibitoren (TIMP-1)

Die Herleitung der Fragestellung dieser Doktorarbeit ergibt sich aus zwei grundlegenden Überlegungen:

Erstens ist für die Entwicklung und Ausprägung des SIRS ein sehr komplexes Zusammenspiel von zellulärer Aktivität, Chemokinen und Zytokinen von Bedeutung. Die simultane inflammatorische Aktivierung von Komplementfaktoren, Zytokinen und Chemokinen durch Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems spielt eine entscheidende Rolle nach schwerem Trauma (26). Die *Matrixmetalloproteinasen* spielen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. Durch Spaltung der Proteinbestandteile der Extrazellulärmatrix (EZM) sind die MMPs maßgeblich an der Wanderung von verschiedenen Immunzellen beteiligt. Im Rahmen der Inflammation stellt die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das betroffene Gewebe die Initialantwort des angeborenen Immunsystems dar. PMNs speichern in ihren Granula unter anderem die Matrixmetalloproteinase-9 [(41, 42)]. Anschließend an die Degranulierung der PMNs und damit Freisetzung der Matrixmetalloproteinase spaltet diese ihre spezifischen Substrate und ermöglicht so - durch die Zerstörung der Basalmembran von Blutgefäßen und Lymphgefäßen - die Emigration der Immunzellen aus dem Blutkreislauf in das Gewebe. Nicht alle Immunzellen des angeborenen Immunsystems können MMPs speichern; Monozyten müssen im Falle einer Inflammationsreaktion MMPs *de novo* synthetisieren (41). Damit die für die Immunantwort so wichtigen Zytokine und Chemokine ihre Aufgaben erfüllen können, müssen diese zunächst aktiviert werden. Dieses geschieht ebenfalls mithilfe der Matrixmetalloproteinasen. MMP-9 katalysiert die Aktivierung der Zytokine IL-1 β und TNF- α sowie die des Chemokins IL-8. Interleukin-8 wiederum stimuliert die Degranulierung von PMNs und führt so zu einer erneuten MMP-Freisetzung, hier besteht also ein positiver Feedback-Mechanismus (41).

In Kenntnis dieser „Schaltfunktion“ in der Immunantwort sind die *Matrixmetalloproteinase-9* und ihr Inhibitor *TIMP-1* in den Fokus dieser Arbeit gerückt.

Zweitens liegen dieser Untersuchung einige Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zugrunde, welche sich mit der Immunantwort nach Polytrauma beschäftigt haben. Dort konnten die Gene, welche für die Proteine *MMP-9* und *TIMP-1* kodieren, in einer genomweiten Microarray-Studie in Monozyten als vielversprechende Marker für den posttraumatischen Immunstatus identifiziert werden (43).

Wir gingen von der Überlegung aus, dass die Ausschüttung von immunomodulatorisch wirksamen Signalproteinen über komplexe intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden reguliert wird, und dass die transkriptionale Aktivität von Immunzellen durch das Trauma modifiziert wird. Folglich müssten traumaspezifische Genexpressionsmuster nachweisbar sein. Mittels mRNA-Microarrayscreening wurde in Monozyten polytraumatisierter Patienten nach einem traumaspezifischen Expressionsmuster gesucht. Dabei konnte ein funktionelles Netzwerk von Genen identifiziert werden, welches bei verstorbenen Patienten im Vergleich zu überlebenden Patienten hochsignifikant unterschiedlich exprimiert war. Dieses Netzwerk formiert sich um den Transkriptionsfaktor *c-Jun*. Dieser ist als Bestandteil des Transkriptionsfaktor-Komplexes *AP-1* (*Activating Protein-1 Complex*, bestehend aus u.a. *c-Jun* und *c-Fos*) entscheidend an der transkriptionalen Regulation im Immunsystem beteiligt (44). Dieser *AP-1-Transkriptionsfaktor-Komplex* hat eine dominierende Regulationsfunktion der Genaktivität von proinflammatorischen Mediatoren im posttraumatischen SIRS inne und ist gleichzeitig entscheidend in die Regulation von *MMP-9* und *TIMP-1* involviert. Die Expression und Aktivierung von *MMP-9* wird über die Bindung von *AP-1* an die Promotorregion von *MMP-9* induziert. Eine Inhibition von *AP-1* resultiert folglich in einer Abnahme der *MMP-9*-Expression. Gleiches gilt für den natürlichen Inhibitor von *MMP-9*,

TIMP-1 (45). Die folgende Abbildung (Abb. 2) illustriert den *AP-1* assoziierten Signaltransduktionsweg sowie seine regulatorische Wirkung auf die hier untersuchten Proteine.

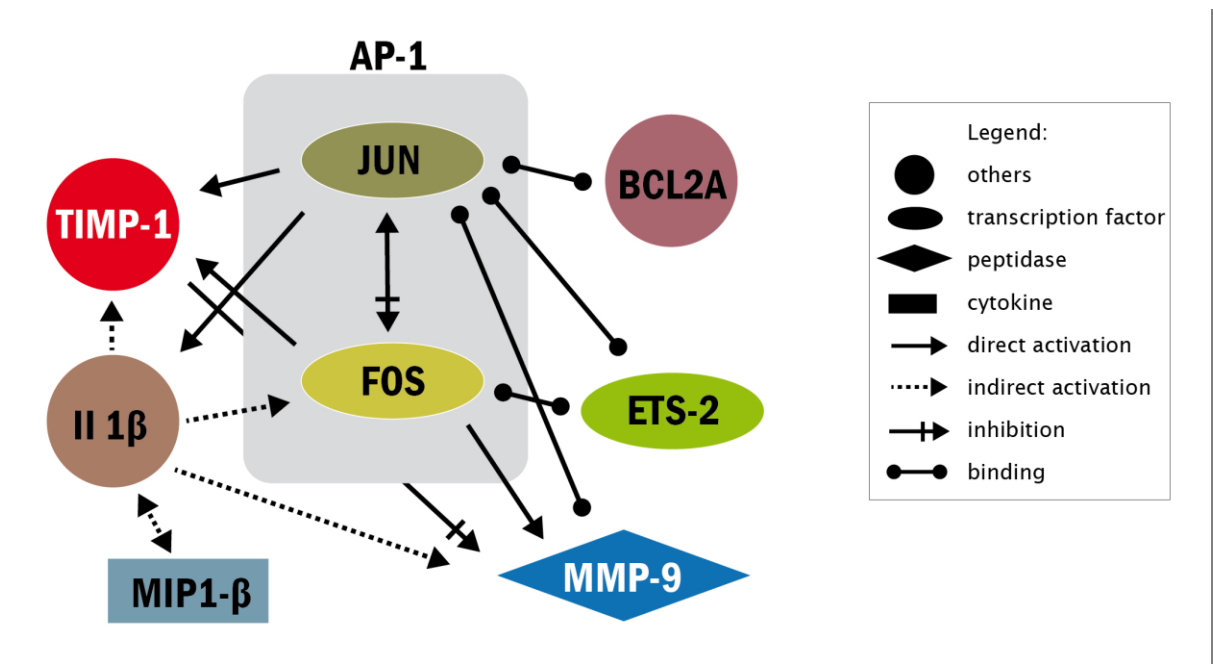


Abbildung 2: Regulationsmechanismen um den Transkriptionsfaktor-Komplex AP-1 und seine Funktion im Rahmen der Regulierung der untersuchten Proteine MMP-9 und TIMP-1

1.3.1. Die Familie der Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) repräsentieren eine Familie strukturverwandter, zinkabhängiger Endopeptidasen, zu denen mittlerweile über 25 Mitglieder zählen [(46); (47)]. Traditionellerweise werden die Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren vor allem im Rahmen ihrer herausragenden Rolle bei der Degradation und bei der Neustrukturierung der Extrazellulärmatrix (EZM) genannt. Betrachtet man gesundes, nicht-proliferierendes Gewebe, findet man ein Gleichgewicht zwischen den auf- und abbauenden Komponenten der EZM vor. Dieser Prozess wird auch als „tissue remodeling“ bezeichnet. Der Abbau der extrazellulären Matrix, die sogenannte Degradation, spielt bei einer Vielzahl von physiologischen sowie pathologischen Prozessen eine entscheidende Rolle (48). Zu den physiologischen Prozessen zählen beispielsweise die Embryogenese, das Knochenwachstum, die Angiogenese, die Neutrophilen-Funktion sowie die Wundheilung [(49); (50); (51)]. Zu den pathologischen Prozessen der Tissue-Resorption und Degradation der EZM gehören u.a. Tumormetastasierung, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, rheumatoide Arthritis, Leberzirrhose, fibrotische Lungenerkrankungen, Atherosklerose sowie unterschiedliche neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer und ALS [(51); (52); (53); (54); (55); (56); (57)]. MMPs und ihre endogenen Inhibitoren, die TIMPs, können durch Spaltung von Peptidbindungen u.a. Kollagenasen und Elastasen abbauen und wirken so entscheidend an der enzymatischen Degradation der EZM, der Basalmembran sowie des interstitiellen Stomas mit.

1.3.2. Die Rolle der MMPs und TIMPs im Rahmen der Inflammation

Die Rolle, die den Matrixmetalloproteinasen im Rahmen der Inflammation zukommt, wird durch ihre Fähigkeit, die Produktion und Aktivierung der an der Immunantwort beteiligten Zytokine und Chemokine als Effektormoleküle zu kontrollieren, bestimmt.

Matrixmetalloproteinasen greifen auf unterschiedliche Weise in die Regulierung der Inflammationsantwort ein, indem sie beispielsweise die transepitheliale Migration und Akkumulation von Leukozyten ermöglichen und die Aktivierung und Kompartimentierung von Chemokinen wesentlich beeinflussen [(47); (58)]. Außerdem regulieren sie das Zellwachstums über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren von der Zellmembran oder aus der Extrazellulärmatrix [(47); (59); (60); (61); (62)]. Die Fähigkeit vieler Entzündungszellen, MMPs zu produzieren, ist hinreichend bekannt, allerdings haben Forschungsergebnisse der letzten Jahre zusätzlich zeigen können, dass neben diesen Zelltypen auch Epithel- und Stromazellen im Rahmen des „tissue remodeling“ in der Lage sind, eine Vielzahl an MMPs zu exprimieren, darunter unter anderem MMP-9 (63).

MMP-9 ist eine Typ VI Kollagenase, wird in den tertiären Granulomen der polymorphonukleären Zellen (PMNs) gespeichert und von einer Vielzahl von Zellen wie beispielsweise Monozyten, Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen sezerniert (64). Betrachtet man die Gesamtheit aller MMPs so scheint, folgt man *Gill et al*, MMP-9 hinsichtlich der Fähigkeit, die Chemokin-Signalwege im Rahmen der Inflammation zu beeinflussen, einer der wichtigsten Vertreter seiner Familie zu sein. Das Wirkungsspektrum reicht hierbei von einer massiven Induktion der Zytokinaktivität bis hin zu einer kompletten Degradation der Zytokine (63). Ein im Rahmen der Inflammationsantwort besonders wichtiges Zytokin stellt TNF- α dar [(65); (66)]. Ein Haupteffekt von TNF- α auf Inflammationsebene ist die Stimulation der MMP-9-Expression durch Monozyten (63).

TIMP-1 ist der natürliche Inhibitor von MMP-9 und kommt in nahezu allen Geweben und Körperflüssigkeiten vor (67). Die Hauptaufgabe der TIMPs besteht in der Regulation der MMPs und so auch in der Regulation der inflammatorischen Antwort - einerseits durch die Kontrolle der Zytokinaktivierung und andererseits durch die Prozessierung und Verarbeitung

der Zelladhäsionsrezeptoren der Entzündungszellen (63). Diese besonders wichtige Wirkungsweise der TIMPs konnte durch den Gebrauch synthetischer Inhibitoren bereits untermauert werden. So konnte die Therapie mit synthetisch hergestellten TIMPs eine Bleomycin-induzierte pulmonale Gewebeschädigung reduzieren (68). TIMP-1 besitzt die Fähigkeit, die Leukozyten-Extravasation zu verhindern und damit die vaskuläre Permeabilität zu verringern (69).

1.3.3. *Regulation der MMPs und ihrer Inhibitoren*

Regulierung der MMPs

Sowohl die Vielfalt an Funktionen, welche die Matrixmetalloproteinasen in physiologischen Prozessen einnehmen, als auch die Fülle an Erkrankungen, die durch eine Dysregulation der MMP-Synthese hervorgerufen werden, unterstreichen die Notwendigkeit einer kontrollierten Regulation ihrer Synthese. Ihre Regulierung erfolgt auf *drei* unterschiedlichen Ebenen: der *Transkriptions-Ebene*, der *posttranslationalen Aktivierung* der inaktiven Proenzyme sowie der *Interaktion der aktiven Enzyme mit ihren Inhibitoren* (70).

Auf *Transkriptions-Ebene* werden die unterschiedliche Expression der einzelnen MMPs sowie ihre Induzierbarkeit geregelt. Hier wird im Hinblick auf das jeweilige teilweise überlappende Substratspektrum im Wesentlichen über die biologische Funktion der Enzyme entschieden (71). Zwei Strukturen, nämlich die Transkriptionsfaktoren (u.a. *AP-1*) und die Promotor-Region, wirken bei der Transkriptionskontrolle zusammen. Diese Ebene bildet den wichtigsten Regulationsmechanismus (siehe Abb. 2) (72). Die Expression eines MMP-Gens wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Man unterscheidet hier Transkriptionsfaktoren von Co-Aktivator- und Co-Repressor-Proteinen. Die Transkriptionsfaktoren binden an die jeweilige Promotor-Region und beeinflussen so die Transkription (73). Zu den Co-

Aktivatoren gehören beispielsweise Wachstumsfaktoren wie EGF, PDGF und bFGF sowie im Rahmen der Immunantwort nach Trauma bedeutenden Zytokine wie IL-1alpha und -beta, IL-6, IL-8, TNF- α und TGF- β [(74); (75); (76); (77)]. Zu den Co-Repressoren zählen beispielsweise das immunsuppressive Zytokin IL-4 sowie Corticosteroide (78). Auch Komponenten der Extrazellulärmatrix selbst können Einfluss auf die Induktion der MMP-Synthese haben (79).

Die *posttranslationale Aktivierung* der Matrixmetalloproteinasen ist ein mehrstufiger Prozess. Sie kann intrazellulär, durch membranständige MMPs an der Zelloberfläche und extrazellulär erfolgen. In der EZM geschieht dies entweder durch andere Proteasen oder durch zuvor aktivierte MMPs (80).

Die *Interaktion der aktiven Enzyme mit ihren Inhibitoren* bildet die dritte Form der Regulation. Nach erfolgter Aktivierung der Zymogene zu aktiven proteolytisch wirksamen Enzymen, werden diese entweder durch ihre spezifischen natürlichen Inhibitoren kontrolliert oder durch unspezifische Hemmung reguliert. Diese TIMPs werden häufig koordiniert mit den Proteinase exprimiert und sezerniert und bilden so auf dem Boden reversibler, 1:1 stöchiometrischer Komplexe eine Balance im Bezug auf das Ausmaß der Matrixdegradation. Kommt es zu einem Ungleichgewicht zugunsten der MMP-Konzentration kann dies ursächlich für eine überschießende Proteolyse und somit ursächlich für das Auftreten bestimmter Erkrankungen sein (81). Einer der Hauptvertreter nicht-spezifischer Inhibitoren ist alpha 2-Makroglobulin. Als Plasmabestandteil ist dieses Protein an der Hemmung der Matrixmetalloproteinase in den Körperflüssigkeiten beteiligt (71).

Regulierung der Inhibitoren (TIMPs)

Zur Aufrechterhaltung des wichtigen Gleichgewichts zwischen Matrixmetalloproteinasen und ihren endogenen Inhibitoren, den TIMPs, unterliegt die Expression der MMP-Inhibitoren ebenfalls einer strengen Regulationskontrolle. So konnte beispielsweise die Arbeitsgruppe um *Overall et al* zeigen, dass Interleukin-1beta in gleichem Maße sowohl die Transkription von MMPs sowie von TIMP-1 stimuliert (82). Ebenfalls stimulierenden Effekt auf die TIMP-1-Produktion haben EGF (83) und IL-6 (84). Die Wirkweise von TNF auf die TIMP-1-Produktion ist konzentrationsabhängig. Liegt es in hoher Menge vor, wirkt es hemmend, liegt es in niedriger Konzentration vor, so wirkt es stimulierend auf die TIMP-1-Synthese (85). Außerdem führen Phorbolster und Interleukine sowohl zu einer Steigerung der MMP- als auch der TIMP-1-Produktion, wohingegen TGF-beta beispielsweise die MMP-Expression hemmt, aber die TIMP-1-Expression fördert. Folglich können MMPs, vor allem MMP-9 und TIMP-1 sowohl gleichsinnig als auch gegensinnig reguliert werden (67).

2. Zielsetzung

Die posttraumatische Morbidität und Mortalität polytraumatisierter Patienten ist wesentlich durch das Ausmaß der posttraumatischen Inflammationsreaktion dominiert. Ausgangspunkt ist die Störung des Immunsystems im Rahmen einer lebensbedrohlichen Mehrfachverletzung. Bis heute sind allerdings die exakten Mechanismen, die für die Pathogenese des SIRS verantwortlich sind, noch nicht endgültig verstanden.

Biberthaler et al konnten 2005 in einer *Oligonukleotid-Microarray-Studie* erstmals hochspezifische mRNA-Expressionsprofile in Monozyten polytraumatisierter Patienten ermitteln, welche schon in der frühen posttraumatischen Phase hochsignifikant mit der Verletzungsschwere sowie dem klinischen Outcome hinsichtlich Tod oder Überleben korrelierten. Mittels dieser genomweiten mRNA-Microarrayanalyse wurde so ein funktionelles Netzwerk von Genen identifiziert, welches bei Patienten, die das initiale Trauma überlebten, im Vergleich zu denen, die posttraumatisch verstarben, hoch signifikant unterschiedlich exprimiert war (86). Im Zentrum dieses Netzwerkes stand der *Transkriptionsfaktor c-Jun*, welcher Teil des bereits besprochenen *AP-1-Komplexes* ist. Dieser wiederum hat eine dominierende Stellung im Rahmen der transkriptionellen Regulierungsmechanismus der MMPs inne. Außerdem zeigte sich eine differentielle Expression der Gene, welche für die Proteine *MMP-9* und *TIMP-1* kodieren. Eine weitere Studie, die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, beschäftigte sich ebenfalls mit der *Genomebene* und untersuchte die Frage, ob das in Monozyten durch Microarrayscreening nachgewiesene Genexpressionsprofil auch in einer weiteren Zellpopulation, den Granulozyten, existiert. Hierzu wurde an einem größeren Patientenkollektiv mittels *real time-polymerase chain reaction* (RT-PCR) quantitativ die Expression von Genen bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass unter anderem die erhöhte Expression der Gene *MMP-9* und

TIMP-1 im Zeitraum von 6 bis 24 Stunden nach Trauma signifikant mit dem Überleben der Patienten verknüpft war. Außerdem war eine erhöhte Expression des *Genes TIMP-1* signifikant mit dem Vorliegen eines Schädel-Hirn-Traumas assoziiert [unveröffentlichte Daten].

Die transkribierte RNA allerdings muss nicht zwangsläufig in ein entsprechendes Proteinmuster umgesetzt werden. Da aber die biologische Aktivität und die von uns untersuchten entsprechenden immunologischen Effekte von den durch die RNA kodierten Proteine hervorgerufen wird, war es in einem nächsten Schritt unerlässlich, das hochsignifikante Expressionsmuster auf monozytärer *Genomebene* auch in der nächsten Ebenen - *der Proteomebene* - zu untersuchen. Hier zeigte sich, dass die signifikant erhöhte Expression von *c-Jun* auf mRNA-Ebene auch eine erhöhte Menge aktivierten und damit biologisch wirksamen Proteins in Monozyten bedingt. In der unmittelbaren posttraumatischen Phase war *c-Jun* in Monozyten verstorbener Patienten statistisch signifikant höher aktiviert als in Zellen überlebender Patienten. So konnte gezeigt werden, dass auch abhängig vom klinischen Parameter „Überleben“ auf eine differentielle mRNA-Expression eine differentielle Aktivierung des betreffenden Genprodukts folgt (87).

In Zusammenschau dieser Ergebnisse und mit dem Wissen um den bedeutenden Einfluss des Transkriptionsfaktoren-Komplex um *c-Jun* auf die Regulierung von *MMP-9* und *TIMP-1* stellten wir daher die Hypothese auf, dass - vorausgesetzt, dass der aufgezeigten veränderten transkriptionalen Aktivierung auch eine erhöhte biologische Aktivität des Proteins im Serum folgte - die Proteine *MMP-9* und *TIMP-1* im Serum polytraumatisierter Patienten ebenfalls eine traumaspezifische erhöhte Aktivität aufzeigen müssten.

Konsequenterweise schloss sich daher die Proteinbestimmung von *MMP-9* und *TIMP-1* auf der dritten Ebene an: *der Serumebene* oder *der Körperebene*.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden,

- ob *MMP-9* und *TIMP-1* im Serum von polytraumatisierten Patienten überhaupt detektierbar sind,
- ob und wie sich die Proteinkonzentrationen dieser beiden Proteine im Serum der polytraumatisierten Patienten im zeitlichen Verlauf der frühen posttraumatischen Phase verändern,
- ob auch die Serumproteinkonzentrationen von *MMP-9* und *TIMP-1* mit den klinischen Variablen „Verletzungsschwere“ und „Outcome“ im Sinne eines Überlebens oder Versterbens innerhalb von 90 Tagen nach Trauma korrelieren.

3. Patienten und Methoden

3.1. Studiendesign

Im Rahmen unserer klinisch-experimentellen Studie wurden insgesamt 60 polytraumatisierte Patienten mit einem *Injury Severity Score (ISS)* von mindestens 16 Punkten, welche über den Schockraum der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München innerhalb von 90 Minuten nach Trauma aufgenommen wurden, eingeschlossen. Die Genehmigung durch die lokale Ethikkommission liegt unter dem Aktenzeichen 012/00 vor. Die zu untersuchenden Blutproben wurden initial nach Trauma, d.h. bei Erreichen des Schockraums innerhalb von 90 Minuten, und erneut 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma entnommen. Im Anschluss an die initiale vitale Stabilisierung der polytraumatisierten Patienten im Rahmen der Schockraumversorgung und die darauffolgenden - entsprechend dem Verletzungsmuster - vorgenommenen Operationen wurden die Patienten auf die chirurgische Intensivstation aufgenommen. Die präklinischen und klinischen Daten wurden entsprechend der Richtlinien der Europäischen Konsensus-Konferenz zur Aufnahme von Daten polytraumatisierter Patienten dokumentiert. Zur objektiven Erfassung der Verletzungsschwere wurde der *Injury Severity Score* herangezogen (88). Zur Feststellung des definitiven klinischen Outcomes wurde in unserer Studie das 90-Tage-Überleben als Endpunkt definiert. Eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten wurde auf folgende Weise eingeholt. Aufgrund der klinischen Situation der Patienten, welche in einer Vielzahl der Fälle durch Bewusstlosigkeit, Intubation, zentral wirksame Analgosedierung oder ähnliches gekennzeichnet war, konnten diese die Einverständniserklärung zum Zeitpunkt des Eintreffens in den Schockraum in der Regel nicht abgeben. In enger Absprache mit der Ethikkommission wurde daher das Einverständnis erst nach Wiedererlangung des Bewusstseins und der damit verbundenen kognitiven

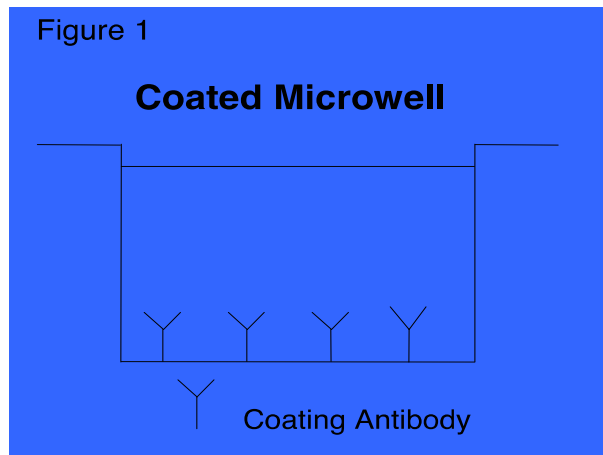
Befähigungen des jeweiligen Patienten eingeholt. Wenn der Patient diese Fähigkeit nicht in ausreichendem Maße wiedererreichte, so wurde in Anlehnung an das Ethikvotum das Einverständnis zur Studienteilnahme von einem gesetzlichen Vertreter oder einem nahen Angehörigen eingeholt. Unterschiedliche Parameter galten als Ausschlusskriterien unserer Studie. So wurden Patienten, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach Trauma verstorben waren, nicht in die Studie aufgenommen. Außerdem schlossen wir Patienten mit isoliertem Schädel-Hirn-Trauma, chronischen oder malignen Erkrankungen sowie Patienten, die eine immunsuppressive Therapie erhielten und auch schwangere Patientinnen sowie unter Betreuung stehende Patienten/innen aus dem Studienkollektiv aus.

3.2. Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels ELISA

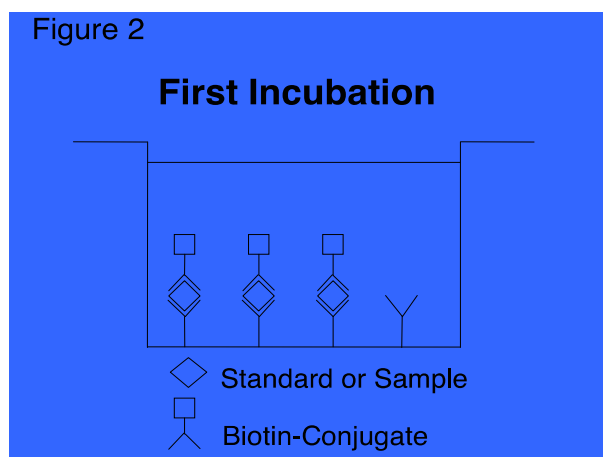
Human MMP-9/TIMP-1 Platinum ELISA

Zum Nachweis der MMP-9-Konzentrationen im Patientenserum wurde das *Human MMP-9 Platinum ELISA* (BMS2016/2CE and BMS2016/2TENCE; charge 46428004; Bender Medsystems GmbH, Campus Vienna Biocenter 2, Vienna, Austria) der Firma Medsystems GmbH verwendet. Zum Nachweis der TIMP-1-Konzentrationen im Patientenserum wurde das *Human TIMP-1 Platinum ELISA* (BMS2018/CE and BMS2018TEN; charge 46427002; Bender Medsystems GmbH, Campus Vienna Biocenter 2, Vienna, Austria) der Firma Medsystems GmbH verwendet. Das Testprinzip sieht wie folgt aus.:

In einem ersten Schritt (Fig. 1) werden die 96-Well-Mikrotiterplatten mit dem *coating-Antikörper*, dem *Anti-Human-MMP-9-Antikörper*, bzw. dem *Anti-Human-TIMP-1-Antikörper* inkubiert.

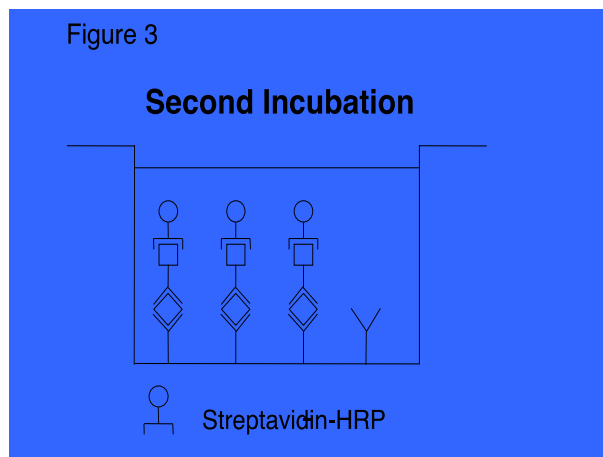


Im zweiten Schritt (Fig. 2) bindet das im Patientenserum vorliegende MMP-9/TIMP-1 an den an die Mikrotiterplatte gebundenen Antikörper. Anschließend erfolgt die Inkubation der festen Phase mit dem zweiten Antikörper, dem *detection*-Antikörper, welcher mit Biotin gekoppelt ist. Dieser bindet nun an das schon durch den *Capture*-Antikörper gebundene MMP-9, bzw. TIMP-1.

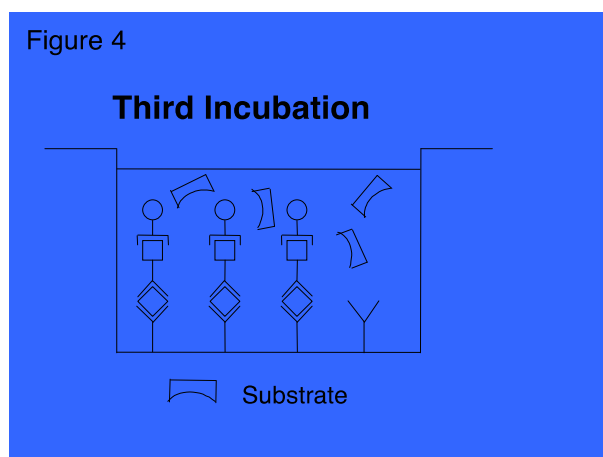


Im dritten Schritt (Fig. 3) wird der überschüssige, nicht gebundene, Biotin-gekoppelte Antikörper von der Mikrotiterplatte gewaschen. Anschließend wird das Enzym, in unserer

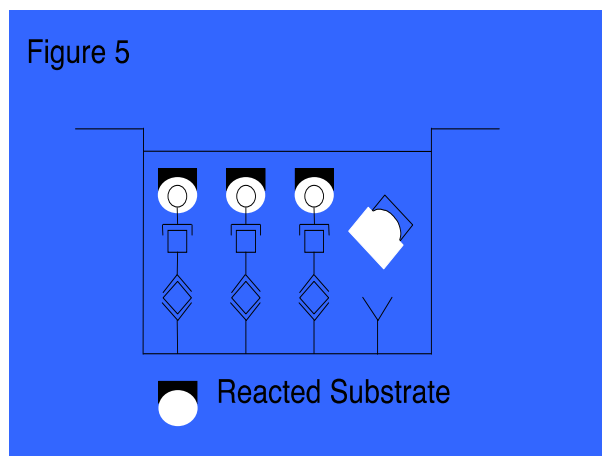
Versuchsreihe handelt es sich um Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Streptavidin-HRP), hinzugegeben. Dieses bindet an den polyklonalen Biotin-gekoppelten Anti-MMP-9/TIMP-1 - Antikörper.



Im vierten Schritt (Fig. 4) folgt ein erneutes Waschen der Platte, um das überschüssige Enzym zu entfernen. Dann wird das mit Streptavidin-HRP reagierende Substrat auf die 96-Well-Platte gegeben.



Im fünften und letzten Schritt (Fig. 5) kommt es durch die Substratumwandlung zu einem Reaktionsprodukt, welches sich in einer Farbreaktion darstellt. Die Extinktionswerte werden photometrisch ermittelt und die entsprechenden Konzentrationen in ng/ml angegeben. Der im Experiment festgestellte Farbumschlag verhält sich proportional zur Menge des in der Probe vorliegenden MMP-9/TIMP-1. Durch das Zugeben von Säure, der sogenannten Stopplösung, wird die Reaktion terminiert. Die Absorption wird mithilfe eines Spektrophotometers gemessen. Als primäre Wellenlänge werden 450nm verwendet. Eine Standardkurve für das gemessene Signal wird mithilfe von einer aus sieben MMP-9-Proben respektive TIMP-1-Proben bestehenden Standardverdünnungsreihe erstellt. Anschließend werden die Proteinkonzentrationen der gemessenen Patientenseren bestimmt.



3.3. Schweregradeinteilung des Verletzungsmusters nach ISS

Die Schweregradeinteilung der jeweiligen Verletzung erfolgte gemäß *Injury Severity Score (ISS)* nach *Baker et al* (88). Der ISS ist ein Bewertungssystem für die Beurteilung der Gesamtschwere der Verletzungen einer verletzten Person. Die Bewertung basiert auf den Überlebenschancen der Einzelverletzungen, welche nach der *Abbreviated Injury Scale (AIS)* bewertet werden. Die Berechnung des ISS ergibt Werte zwischen null und 75. Zur Berechnung des ISS wurde die aktuellste Version des AIS, nämlich der AIS90/98-Code, als Proxy-Variable für die Schwere der erlittenen Verletzung genutzt. Für die Gruppierung der Verletzung nach Körperregionen wird der *Anatomical Localizer* des AIS90/98 herangezogen. Hierbei wird der Körper zur Klassifikation der Verletzungsschwere in sechs Regionen unterteilt. Die einzelnen Regionen des ISS teilen sich wie folgt auf: (1) *Kopf und Nacken*, (2) *Gesicht*, (3) *Thorax*, (4) *Abdomen*, (5) *Extremitäten* und (6) *Körperoberfläche*. Entsprechend der Schwere der Verletzung werden unterschiedliche Punktzahlen vergeben. Diese richten sich nach der Schwere der einzelnen Verletzungen und liegen auf einer Skala zwischen null und sechs entsprechend des AIS90/98. Ein Punktwert von eins entspricht einer sehr leichten Verletzung, wohingegen ein Punktwert von fünf eine maximal kritische Verletzung mit unsicherer Überlebenschance beziffert. Bei einem AIS-Code von sechs wird der ISS automatisch auf 75 Punkte gesetzt und entspricht damit einer infausten Prognose. Betrachtet werden jeweils die Maximalwerte der AIS-Codes für die sechs ISS-Körperregionen. Der ISS wird nun laut Erstbeschreibung als die Summe der Quadrate der drei höchsten AIS-Codes definiert nach *Baker et al* von 1974 (Update 1977) berechnet. Der Injury Severity Score stellt eine etablierte und seit vielen Jahren anerkannte Möglichkeit zur Klassifikation der Verletzungsschwere dar und erlaubt so eine Aussage über die voraussichtliche Morbidität und Mortalität (2).

4. Ergebnisse

4.1. Patienten

4.1.1. Klinische Daten

Insgesamt wurden 60 Patienten - gemäß den oben besprochenen Einschlusskriterien - in unsere Studie aufgenommen. Der Tabelle 1 sind die epidemiologischen Daten und klinischen Angaben der eingeschlossenen Patienten zu entnehmen. Zu den klinischen Daten, welche wir im Rahmen der Studie dokumentierten, zählen Angaben zu Verletzungsmuster und Verletzungsschwere sowie das Outcome, gemessen am 90-Tage-Überleben nach Trauma. Die Verletzungsschwere wurde mit Hilfe des *ISS (Injury Severity Score)* kodiert.

Von 60 Patienten waren 42 (70%) männliche und 18 (30%) weibliche Patienten/Patientinnen. Das Alter der Patienten lag zwischen 18 und 94 Jahren, das mittlere Alter bei 45,48 Jahren. Die Verletzungsschwere variierte zwischen 17 und 66 Punkten mit einem Median von 33 Punkten. Entsprechend dieses Median teilten wir die Patienten in 2 Gruppen (Gruppe 1 (n=33) $ISS \leq 33$; Gruppe 2 (n=27) $ISS > 33$).

Die mittlere Verletzungsschwere aller 60 Patienten lag bei einem ISS von 34,63 Punkten. Bei den Patienten der Gruppe 1 mit einem $ISS \leq 33$ kam es im Mittel zu einem ISS von 26,18 +/- 4,75 SD. Die Patientengruppe 2, welche ein schweres Polytrauma mit einem $ISS > 33$ Punkten erlitten, wiesen im Mittel einen ISS von 45,37 +/- 9,11 Punkten auf. Sechs Patienten verstarben im posttraumatischen Intervall von 90 Tagen (Gruppe B), 54 Patienten überlebten das traumatische Ereignis (Gruppe A). Damit liegt der Anteil der verstorbenen Patienten in unserem Studienkollektiv bei 10%. Das mittlere Alter der verstorbenen Patienten lag bei 58,3 Jahren, deren mittlere Verletzungsschwere bei einem ISS von 40 Punkten mit einer Standardabweichung von +/- 16,70.

4.1.2. Epidemiologische Daten

	ISS	Verstorben	Geschlecht	Todesursache	Alter
1	33	N	m		33
2	66	N	w		32
3	36	N	m		18
4	36	N	m		53
5	25	N	w		54
6	18	N	m		49
7	21	N	m		49
8	17	N	m		44
9	36	N	m		53
10	29	N	w		24
11	29	N	w		74
12	34	N	m		33
13	22	N	m		20
14	41	J	w	SHT	37
15	50	N	w		25
16	29	N	m		40
17	27	N	m		62
18	29	N	m		58
19	24	N	m		75
20	24	J	m	MOV	49
21	17	J	w	MOV	63
22	59	J	m	RI	94
23	16	N	m		45
24	32	N	m		46
25	50	N	m		65
26	34	N	w		61
27	29	N	m		36
28	27	N	w		65
29	26	N	w		74
30	43	N	m		23
31	40	N	m		48
32	29	N	m		60
33	22	N	w		57
34	36	N	w		35
35	57	N	m		44
36	29	N	m		84
37	42	N	m		37
38	42	N	m		72
39	29	N	m		51
40	29	N	m		37
41	50	N	m		30

42	50	J	m	MOV	59
43	29	N	m		51
44	54	N	m		34
45	41	N	m		29
46	57	N	m		34
47	35	N	w		48
48	33	N	m		38
49	29	N	m		45
50	50	N	m		23
51	33	N	m		49
52	25	N	w		24
53	57	N	m		57
54	45	N	w		51
55	34	N	m		32
56	34	N	w		28
57	24	N	m		39
58	21	N	m		23
59	29	N	w		40
60	50	J	w	SHT	48

Tabelle 1 Epidemiologische Daten der 60 eingeschlossenen Patienten

MOV Multiorganversagen
SHT Schädel-Hirn-Trauma
RI Respiratorische Insuffizienz

4.2. Serumkonzentration der Proteine MMP-9 und TIMP-1

Alle Proteinkonzentrationen werden in ng/ml angegeben. Es wird jeweils der Mittelwert der gemessenen Werte mit der entsprechenden Standard Error of the Mean (+/- SEM) graphisch dargestellt. Alle statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe von SigmaStat/Plot Version 12.0 erstellt. Das ausgewählte Testverfahren war der Mann-Whitney Rank Sum Test, ein Unterschied von $p \leq 0.05$ wurde als statistisch signifikant bewertet.

4.2.1. Serumproteinkonzentration von MMP-9

Alle polytraumatisierten Patienten zeigen eine initial hohe Serumkonzentration von MMP-9. Gegenüber der anfänglichen Serumkonzentration - gemessen innerhalb der ersten 90 Minuten nach Trauma (0 h) - kommt es bei allen Patienten zu einem signifikanten Abfall der MMP-9-Proteinkonzentration innerhalb von 72 Stunden nach Trauma (Abb.3). Die blaue Linie verdeutlicht den signifikanten Konzentrationsabfall.

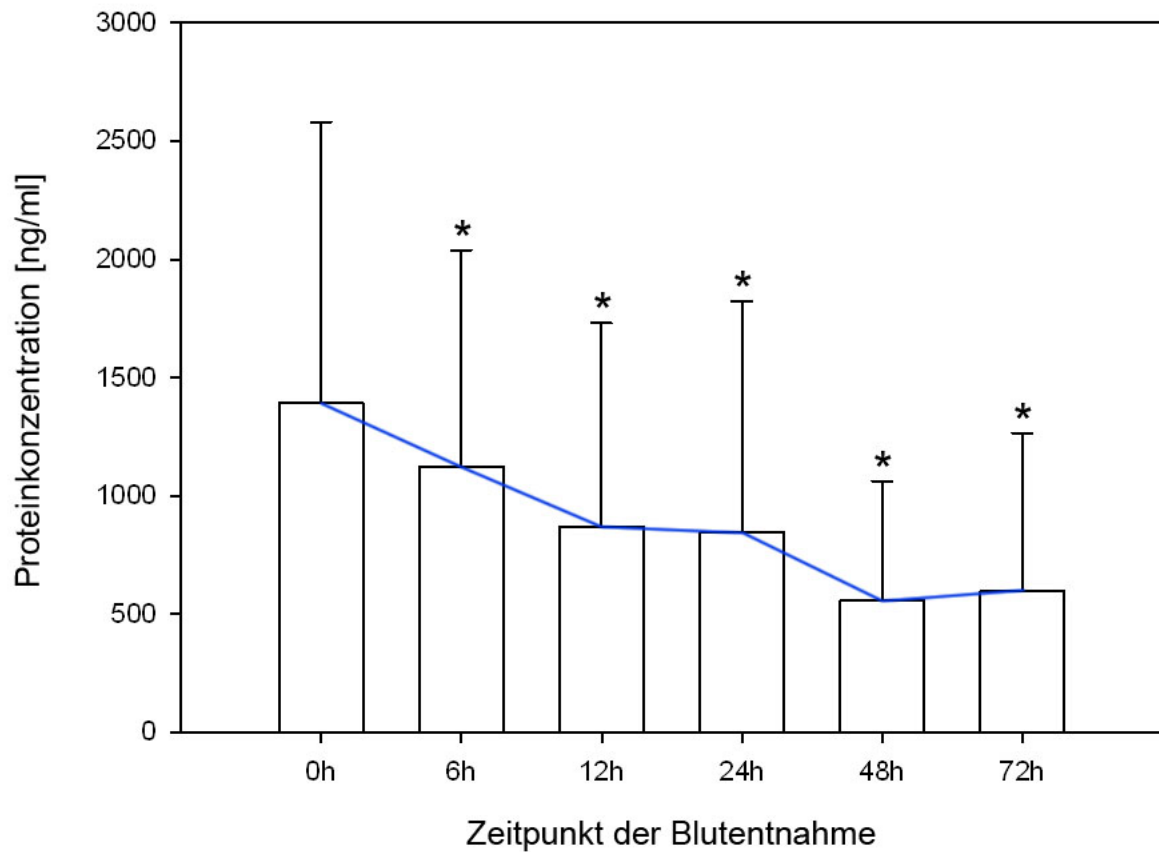


Abbildung 3: Verlauf der MMP-9-Serumkonzentrationen aller Patienten (n=60) über einen Zeitraum von 72 Stunden

* $p \leq 0.05$ Mann-Whitney Rank Sum Test

4.2.2. Serumproteinkonzentration von TIMP-1

TIMP-1 zeigt eine anfänglich niedrige Serumproteinkonzentration (0h), welche im weiteren Verlauf, jeweils bezogen auf den Initialwert nach Trauma, zu jedem gemessenen Zeitpunkt signifikant ansteigt (Abb. 4). Die rote Linie verdeutlicht den signifikanten Konzentrationsanstieg.

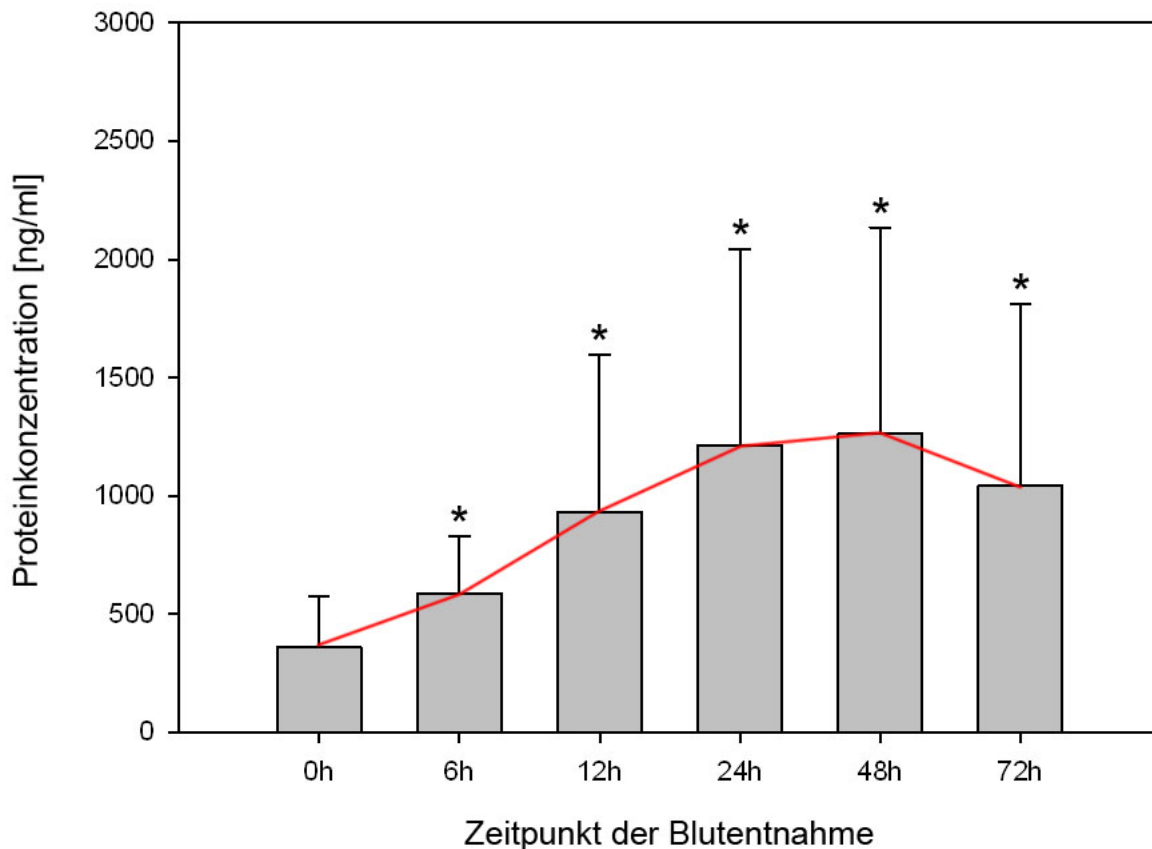


Abbildung 4: Verlauf der TIMP-1-Serumkonzentrationen aller Patienten (n=60) über einen Zeitraum von 72 Stunden
**p ≤ 0.05 Mann-Whitney Rank Sum Test*

4.2.3. Verletzungsschwere und MMP-9

In Abbildung 5 werden die MMP-9-Proteinkonzentrationen der Patienten mit einem ISS ≤ 33 (Gruppe 1, n=33) mit den Proteinkonzentrationen der Patienten verglichen, die einen ISS > 33 (Gruppe 2, n=27) aufwiesen. Hier zeigt sich eine tendenziell niedrigere Konzentration von MMP-9 zwischen 0h und 24h in der Gruppe 2. Nach 48h zeigt sich in eine ähnliche Serumkonzentration in beiden Gruppen. Am Endpunkt unserer Untersuchung zeigt sich erneut eine erniedrigte MMP-9-Serumproteinkonzentration in Gruppe 2. Im gesamten Verlauf zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen.

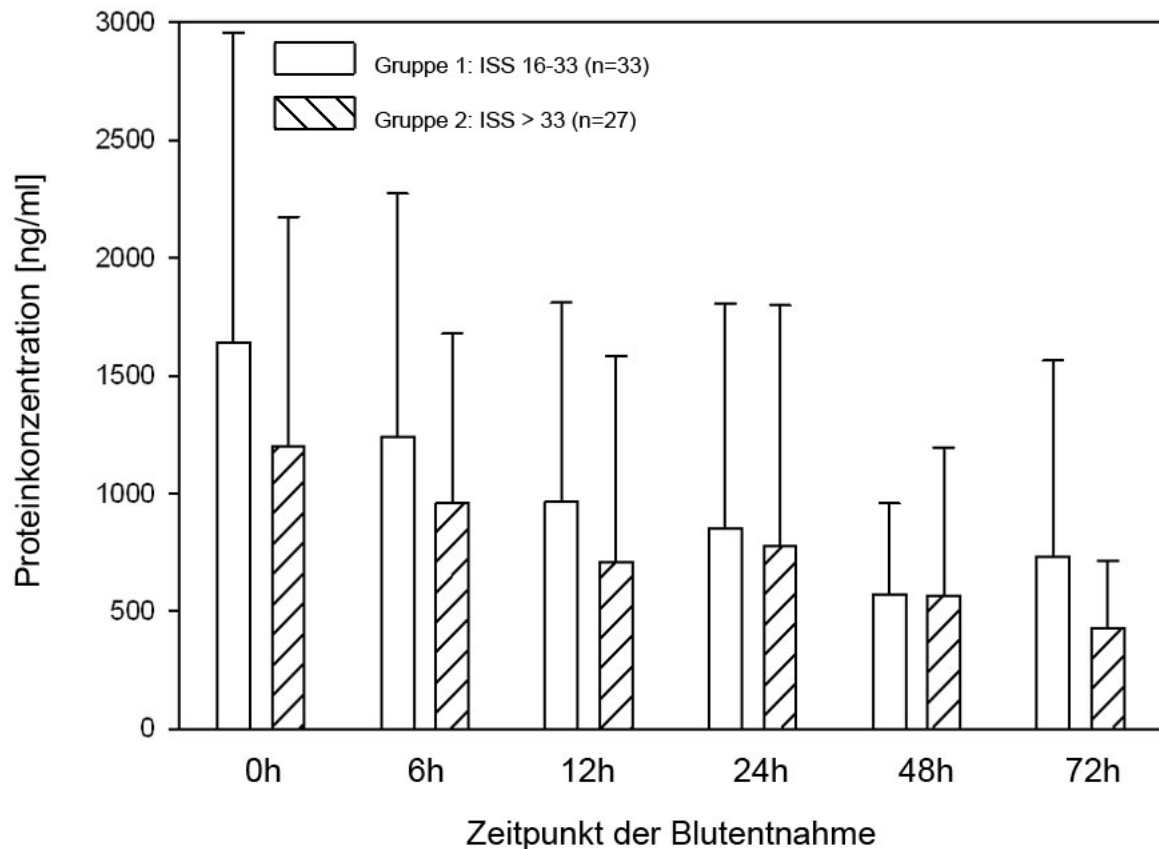


Abbildung 5: Verlauf der MMP-9-Serumkonzentrationen in dem nach der Verletzungsschwere unterteilten Patientenkollektiv

4.2.4. Verletzungsschwere und TIMP-1

In Abbildung 6 zeigt die Gegenüberstellung der Serumkonzentrationen von TIMP-1 der Gruppen 1 und 2 eine tendenziell niedrigere Konzentration von TIMP-1 zwischen 0h und 12h bei den Patienten, welche ein schweres Polytrauma erlitten (Gruppe 2). Nach 24h und 48h zeigt sich in dieser Patientengruppe eine erhöhte Serumkonzentration von TIMP-1. Am Endpunkt unserer Untersuchung zeigt sich eine ähnliche Serumproteinkonzentration von TIMP-1 in beiden untersuchten Gruppen. Im gesamten Verlauf zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

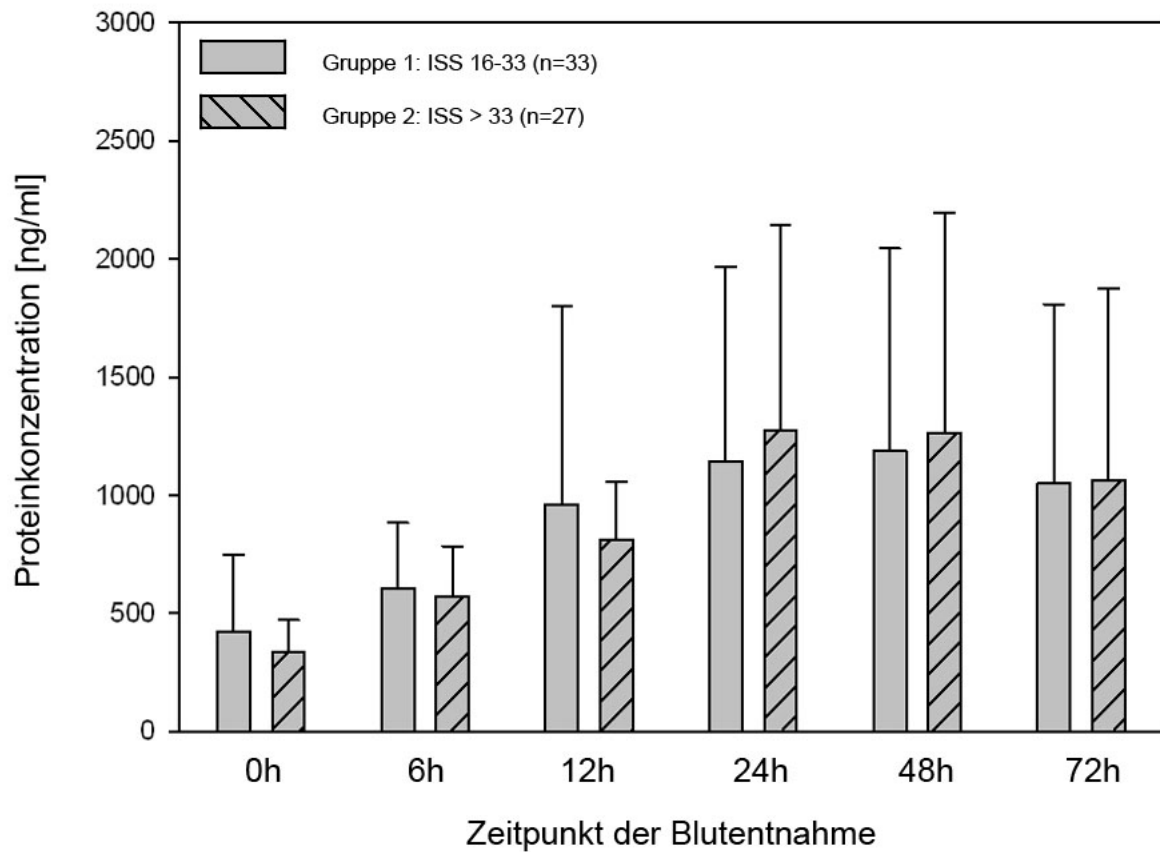


Abbildung 6: Verlauf der TIMP-1-Serumkonzentrationen in dem nach der Verletzungsschwere unterteilten Patientenkollektiv

4.2.5. Outcome und MMP-9

Über den Verlauf von 72 Stunden zeigt sich eine erniedrigte MMP-9-Serumproteinkonzentrationen bei Patienten, die innerhalb von 90 Tagen nach Trauma verstarben (Gruppe B). Die Unterschiede in den beiden Gruppen waren allerdings nicht statistisch signifikant.

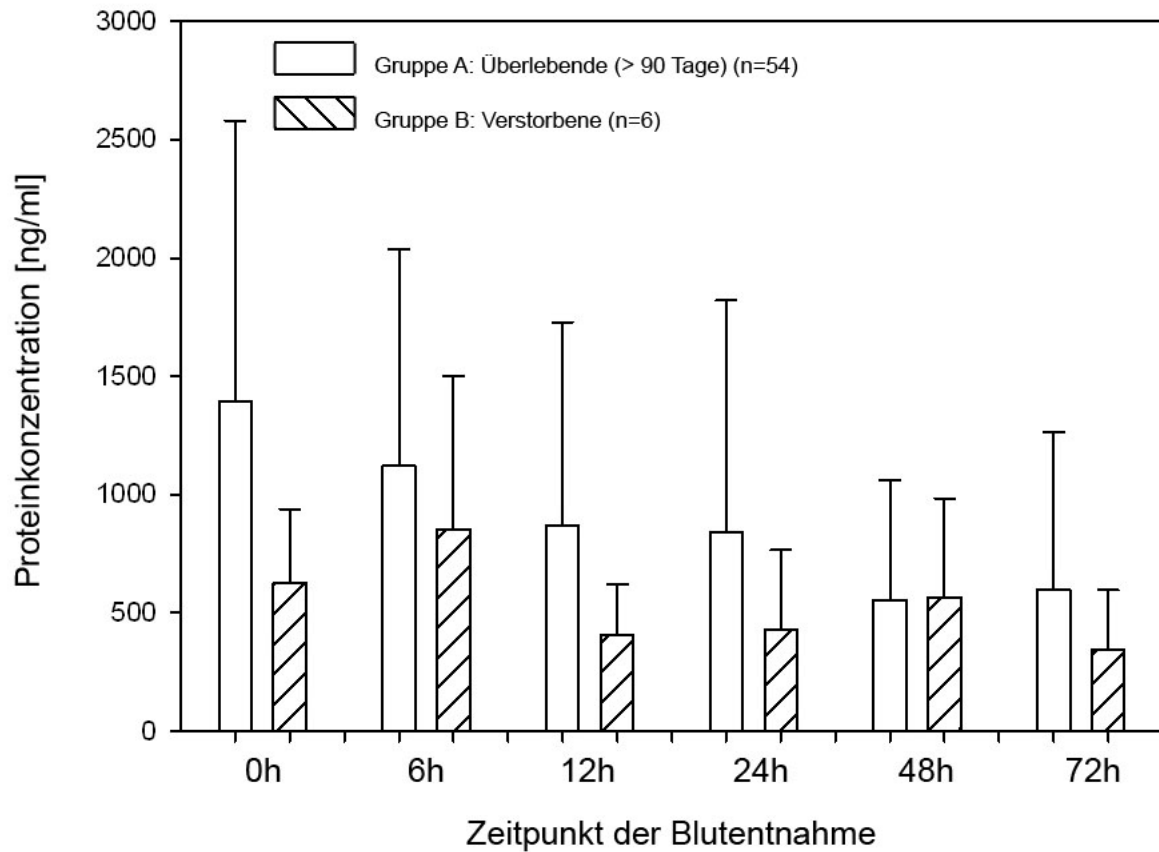


Abbildung 7: Verlauf der MMP-9-Serumkonzentrationen in dem nach dem Überleben unterteilten Patientenkollektiv

4.2.6. Outcome und TIMP-1

Abbildung 8 zeigt eine erniedrigte TIMP-1-Konzentration im Serum der verstorbenen Patienten innerhalb der ersten 24 Stunden (Gruppe B). Anschließend nimmt die Konzentration von TIMP-1 bei den Patienten, die innerhalb des betrachteten Intervalls verstarben, zu. Die TIMP-1-Serumkonzentrationen waren nicht signifikant unterschiedlich.

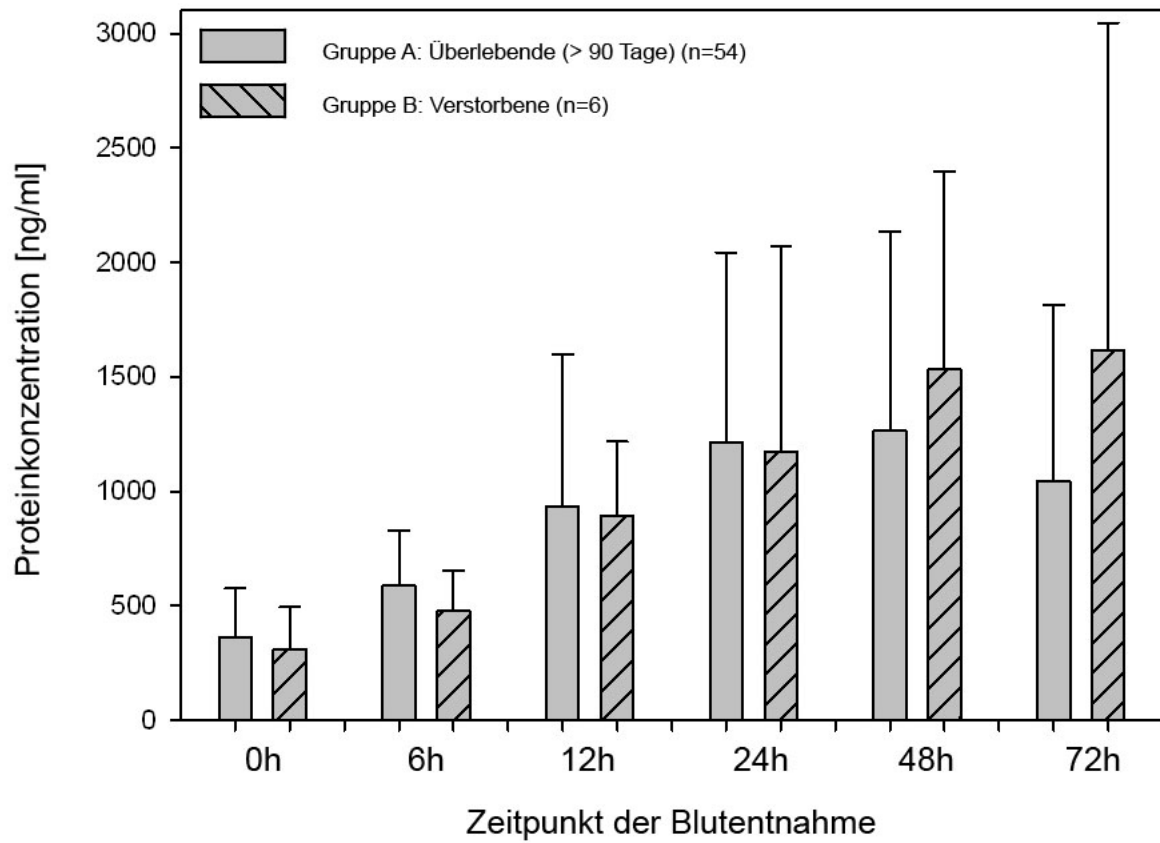


Abbildung 8: Verlauf der TIMP-1-Serumkonzentrationen in dem nach dem Überleben unterteilten Patientenkollektiv

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht und beschreibt erstmals die Konzentrationskinetik der Proteine MMP-9 und die des physiologischen Inhibitors TIMP-1 im Serum polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase.

Vorausgegangene Studien konnten sowohl auf Genomebene in Monozyten (86) und neutrophilen Granulozyten als auch auf Proteomebene intrazellulär in Monozyten (87) bereits eine differentielle Expression unterschiedlicher Gene, bzw. intrazelluläre Proteinkonzentrationsveränderungen in Abhängigkeit von klinischen Parametern wie der Entwicklung eines Multiorganversagens und dem Überleben bei Polytraumatisierten zeigen. Zwei dieser in der genomweiten mRNA-Analyse identifizierten „Outcome-klassifizierenden“ Gene kodieren für die hier untersuchten Proteine: *MMP-9* und *TIMP-1*. Die in den oben genannten Vorarbeiten herausgestellten sogenannten „Kandidatengene“ scheinen, bedingt durch ihre Bedeutung in verschiedenen intra- und extrazellulären Signalkaskaden des humanen Immunsystems, eine Schlüsselrolle bezüglich der Immunantwort nach Trauma und damit in der Entwicklung einer posttraumatischen Entzündungsreaktion zu spielen (86). Diese Entdeckungen legen die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Genen um potentielle Prädiktoren für den Immunstatus eines polytraumatisierten Patienten handeln könnte. Eine zuverlässige Auskunft über den individuellen Immunstatus eines polytraumatisierten Patienten zu erhalten, um so die individuelle Gefährdung für die Entwicklung einer schweren posttraumatischen Immundysregulation eines jeden Einzelnen abschätzen zu können, ist von großem klinischen Interesse. So könnte ein „Proteinmonitoring“ unter Umständen dazu beitragen, diese besonders gefährdeten Patienten frühzeitig zu erkennen und so die Folgen einer schweren posttraumatischen Immunfehlfunktion unter Umständen abzumildern.

Auch sind die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchte Matrixmetalloproteinase (MMP-9) und ihr Inhibitor (TIMP-1) in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus des Forschungsinteresses gelangt. Insbesondere ihre Schlüsselrolle im Rahmen der Inflammation und des „tissue remodeling“ macht sie auch für die hier vorgestellte Arbeit zu besonders wichtigen Proteinen unter der Vielzahl an Kandidatengen [89]; (90)].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteinkonzentrationen von MMP-9 und TIMP-1 und ihre zugrunde liegende Kinetik in der frühen posttraumatischen Phase im Serum der polytraumatisierten Patienten herausgearbeitet und mit den klinischen Parametern *Verletzungsschwere* und *Outcome* korreliert.

Insbesondere hinsichtlich der Tatsache, dass sowohl eine Genomanalyse als auch eine Analyse intrazellulärer Proteine sehr zeitaufwendige, kostenintensive, auf wenige Zentren beschränkte und daher schwer zugängliche Methoden darstellen, war es die Motivation dieser Arbeit, zwei spezifische „Serummarker“ zu finden, die Aufschluss über den individuellen posttraumatischen Immunstatus geben könnten; hier würde die Serumanalyse eine weitaus schnellere, günstigere und auch jederzeit und allorts verfügbare Methode darstellen.

Die zentralen Ergebnisse dieser Arbeit waren, dass sich zwar ein charakteristischer Verlauf der Serumproteine MMP-9 und TIMP-1 entwickelt, dass sich aber das „Outcome-klassifizierende“ Expressionsmuster auf Genomebene in der Serumebene nicht reproduzieren ließ.

5.1. Methodische Aspekte

5.1.1. Klinische Daten

Insgesamt wurden 60 Traumapatienten in diese Studie eingeschlossen. Sie waren im Mittel 45,25 Jahre alt. Darunter waren 42 (70%) männliche und 18 (30%) weibliche Patienten; dies entspricht einem Verhältnis von 2,3 : 1. Die Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) gibt in ihrem Jahresbericht des TraumaRegisters für das Jahr 2012 folgende Auswertung ihrer im Jahr 2011 erhobenen Daten an:

Das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei 47,0 Jahren; im Gesamtkollektiv des TraumaRegisters (seit Dokumentationsbeginn) lag es bei 44,4 Jahren. 72% der Polytraumapatienten waren männlich (Gesamtkollektiv: ebenfalls 72%) Diese Daten entsprechen sowohl hinsichtlich des durchschnittlichen Alters als auch hinsichtlich der Geschlechterverteilung denen unseres Kollektivs. Sowohl bei *Liener et al* als auch bei *Bardenheuer et al* liegt das Durchschnittsalter der eingeschlossenen Patienten unter dem durchschnittlichen Alter unseres Patientenkollektivs [(5); (91)]. Dieser Unterschied lässt sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Auswertungs-Zeiträume erklären. Diesbezüglich ist an dieser Stelle anzumerken, dass eine Reihe neuerer Studien bezüglich der Altersverteilung polytraumatisierter Patienten einen deutlichen Trend zum „älteren“ Polytraumapatienten feststellen können. So konnten beispielsweise *Aldrian et al* 2007 zeigen, dass das mittlere Alter schwerstverletzter Patienten pro Kalenderjahr um durchschnittlich 0,75 Jahre ansteigt (92). Auch *Soreide et al* fanden in ihrer Untersuchung in einem Intervall von neun Jahren aus demselben Jahr heraus, dass das Alter der Patienten, die posttraumatisch verstarben, von im Mittel 42 Jahren auf durchschnittlich 51 Jahre, das heißt um fast eine Dekade, anstieg (93).

Die durchschnittliche Verletzungsschwere, welche mittels Injury Severity Score (ISS) ermittelt und quantifiziert wurde, lag in unserem Patientenkollektiv bei 34,63 Punkten. Die durchschnittliche Verletzungsschwere der ins TraumaRegister eingegangenen Patienten liegt

mit einem mittleren ISS von 18,3 Punkten im Jahresbericht 2012 und einem Wert von 20,7 Punkten im TraumaRegister-Gesamtkollektiv deutlich unter dem Wert unseres Patientenkollektivs. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte die Tatsache sein, dass in unsere Studie ausschließlich Patienten mit einem Injury Severity Score ≥ 16 Punkte eingeschlossen wurden. Der ISS der Patienten, welche 2011 Eingang in die TraumaRegister-Erfassung fanden, lag nur in 53% der Fälle bei einem Wert von ≥ 16 Punkte; das Gesamtkollektiv aller TraumaRegister-Patienten wies in insgesamt 61% der Fälle eine Verletzungsschwere mit einem ISS ≥ 16 Punkten auf.

Die Mortalität betrug in unserem Kollektiv 10%. Die Auswertung des TraumaRegisters ergeben eine Früh-Letalität von 5,3% im Jahr 2011 und im Gesamtkollektiv von 6,7%; es zeigt sich eine Krankenhausletalität von 10,3% für 2011 sowie von 12,8% bezogen auf das Gesamtkollektiv. *Liener et al* berichten in ihrer Studie von einer Mortalität von 14%. Beide Erhebungen decken sich in etwa mit der Mortalität in der hier vorliegenden Studie.

5.1.2. Studiendesign

In unsere Studie wurden entsprechend der oben genannten Einschlusskriterien nur Patienten aufgenommen, welche mit einem minimalen ISS von 16 Punkten den Schockraum der Chirurgischen Klinik der LMU - Innenstadt innerhalb von 90 Minuten erreichten. Entsprechend der Vorgaben der Europäischen Konsensuskonferenz erfolgte die Dokumentation der präklinischen und klinischen Daten aller in die Studie aufgenommenen polytraumatisierten Patienten. Die Verletzungsschwere, quantifiziert mittels Injury Severity Score sowie das Outcome, gemessen am 90-Tage Überleben nach Polytraumatisierung, zählten zu den klinischen Parametern, mit denen die ermittelten Serumkonzentrationen von MMP-9 und TIMP-1 korreliert wurden.

Die Klassifizierung der Verletzungsschwere unserer in die Studie aufgenommenen Patienten erfolgte nach ISS (88). Trotz der Kenntnis, dass sich das individuelle Verletzungsmuster eines jeden Patienten nur unzureichend mittels eines Scores abbilden lässt, ist der Injury Severity Score (ISS) und die ihm zugrunde liegende Abbreviated Injury Scale (AIS) seit seiner Erstbeschreibung durch *Baker et al* 1974 weiterhin das im klinischen Alltag relevanteste und weitverbreitetste Scoring-System zur Einschätzung der Verletzungsschwere eines Polytraumatisierten (2). Der ISS stellt als anatomisches Scoring-System immer noch den Goldstandard zur Bemessung der Schwere eines Polytraumas dar (2), obwohl seit seiner Erstbeschreibung sowohl im Bereich der Prävention als auch in der Akutversorgung von Schwerstverletzten signifikante Veränderungen stattgefunden haben (94). Eine Schwäche des AIS/ISS wird in der mangelnden Fähigkeit gesehen, den natürlicherweise dynamischen pathophysiologischen Verlauf nach erlittenem Trauma nicht ausreichend abzubilden, obwohl dieser einen gewichtigen Einfluss auf das posttraumatische Outcome hat (2). Die Möglichkeit einer zuverlässigen Einschätzung von Outcome und Mortalität bietet beispielsweise der TRISS Score, welcher von der DGU im Rahmen des TraumaRegisters ermittelt wird (2). Allerdings bemängeln einige Autoren bei TRISS die Fehleinschätzung, bzw. Unterschätzung der Traumaschwere, vor allem bei schwersten Verletzungsmustern [(4); (95); (96)]. Auch der New Injury Severity Score (NISS) wurde von einigen Autoren zur besseren Abbildung der Verletzungsschwere als Alternative zum ISS vorgeschlagen, da er in der Lage sei, vor allem bei Patienten mit mittlerem bis schwerem Schädelhirntrauma, exaktere Vorhersagen bezüglich eines notwendigen Intensivaufenthalts oder LOS (*length of stay*) zu treffen [(96); (97); (98)]. Aber auch dieses Scoring-System spielt im klinischen Alltag eine eher untergeordnete Rolle. Zusammenfassend muss man also sagen, dass der von uns verwendete ISS zwar durchaus Mängel hinsichtlich der exakten Einschätzung der individuellen Verletzungsschwere aufweist, es allerdings bisher keinen adäquaten Ersatz im klinischen

Alltag gibt. Die Idee von einer exakten Definition des Polytraumas durch ein entsprechendes Scoring-System bleibt also nach wie vor „eine multinationale Herausforderung“ (2).

5.1.3. Zeitpunkt der Probengewinnung

Im Rahmen unserer Untersuchung wurde allen 60 Patienten zu sechs definierten Zeitpunkten Blut entnommen. Diese Zeitpunkte sollten in bestmöglicher Annäherung an eine kontinuierliche Abbildung der posttraumatischen immunologischen Veränderungen einen Kompromiss zwischen größtmöglicher zeitlicher Auflösung dieser dynamischen Phase sowie geringstmöglicher Schädigung des jeweiligen Patienten innerhalb dieses vulnerablen Zeitfensters nach gerade erlittenem Trauma bilden. Die Anforderungen an die experimentelle Polytraumaforschung, welche sich mit der frühen posttraumatischen Immunalteration beschäftigt, ergeben sich aus einer Vielzahl von Studien zu diesem Thema, welche einheitlich die Notwendigkeit (1) serieller Messungen in der (2) frühen posttraumatischen Phase herausstellen [zu (1) siehe (33); (99) und zu (2) siehe (100); (101)]. Der - entsprechend Punkt (1) geforderten - möglichst kontinuierlichen Erfassung der stattfindenden immunologischen Modulationen im posttraumatischen Intervall tragen unsere Messungen zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten, nämlich initial bei Eintreffen im Schockraum und erneut 6h, 12h, 24h, 48h und 72h nach erlittenem Trauma, Rechnung. Diese Zeitpunkte wurden in Anlehnung an andere Forschungsgruppen gewählt (102-105). Dass ein möglichst zeitnahe Beginn der Messungen – wie in Punkt (2) gefordert - von entscheidender Bedeutung ist, ergibt sich aus der Tatsache, dass besonders die initiale posttraumatische Phase - geprägt durch einen schnellen und dynamischen Verlauf - maßgeblich für die Entwicklung einer posttraumatischen Immundysfunktion angesehen wird. So konnten beispielsweise *Liener et al* in ihrer Untersuchung zur posttraumatischen Chemokin-Aktivierung zeigen, dass der systemische IL-8 Spiegel bereits eine Stunde nach dem Unfallereignis eine Unterscheidung

zwischen überlebenden und verstorbenen Patienten erlaubte (106). Auch *Seekamp et al* und *Martin et al* konnten bereits sehr früh nach Traumatisierung anhand von erhöhten IL-6 Plasmakonzentration einerseits Patienten mit einem komplizierten Verlauf von solchen mit einem unkomplizierten posttraumatischen Verlauf unterscheiden sowie andererseits bereits initial erhöhte IL-6 Konzentration als Risikomarker für eine spätere Infektion identifizieren [(107); (108)].

5.1.4. Serum als Medium für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen

In der von uns durchgeführten Studie wurde Serum als Medium zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen von MMP-9 und TIMP-1 gewählt. Das Serum wurde entsprechend der laborchemischen Standards durch Zentrifugation von zellulären Bestandteilen separiert, um schließlich die Proteinkonzentrationen mittels ELISA zu quantifizieren.

Grundsätzlich werden die Matrixmetalloproteinasen intrazellulär als Präproenzyme synthetisiert; anschließend erfolgt über sequentiell lytische Prozesse die Überführung der inaktiven Pro-Enzyme, welche in den Extrazellularraum sezerniert werden, in eine aktive Enzymform (109). Vor ungefähr 25 Jahren wurde erstmalig beschrieben, dass Matrixmetalloproteinasen in unterschiedlichen Formen im peripheren Blut vorliegen (110). Sie können in gelöster, konstitutiver Form im Plasma oder Serum vorliegen oder als initial intrazelluläre Zymogene in Monozyten oder Leukozyten vorkommen. Diese werden anschließend in die zirkulierende Blutbahn abgegeben [(110); (111); (112)]. Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Matrixmetalloproteinasen und ihren natürlichen Inhibitoren in peripherem Blut stellt für viele Autoren eine empfehlenswerte, nichtinvasive und gleichzeitig leicht zu handhabende Möglichkeit dar, verschiedene mit MMPs assoziierte Erkrankungen zu diagnostizieren sowie in ihrem Verlauf zu beobachten, da man davon ausgehen kann, dass die

intrazelluläre Aktivität von Matrixmetalloproteinasen sowohl im Blutplasma als auch im Blutserum zuverlässig wiedergespiegelt wird (113). Eine Reihe von Untersuchungen bei unterschiedlichsten Erkrankungen konnte diesbezüglich demonstrieren, dass eine Konzentrationsänderung der MMPs - gemessen im Serum - ein zuverlässiger Marker für die intrazelluläre Proteaseaktivität ist, weshalb die Bestimmung von MMP- und TIMP-Serumkonzentrationen mittlerweile eine weitverbreitete und etablierte Methode darstellt (114). Hierbei handelt es sich vor allem um Erkrankungen, die durch eine inflammatorische Reaktion des Organismus geprägt sind, wie beispielsweise die Multiple Sklerose [(115); (116)], die koronare Herzkrankheit [(117); (118); (119)], das Multiple Myelom [(120); (121)] oder die chronisch lymphatische Leukämie [(122); (123)]. Um einige neuere Arbeiten zu nennen, wurden beispielsweise Serumkonzentrationsänderungen von MMP-9 und/oder TIMP-1 mit folgenden Erkrankungen in Verbindung gebracht: Sepsis (124), COPD (125), essentieller arterieller Hypertonie (126) sowie Diabetes mellitus Typ II (127).

Allerdings konnte erstmals 1990 durch *Kodama et al* gezeigt werden, dass ein Unterschied bezüglich der MMP-Proteinkonzentrationen in Abhängigkeit vom verwendeten Medium existiert (128). So wiesen beispielsweise *Jung et al* nach, dass die Art der Probengewinnung und das verwendete Medium Einfluss auf die MMP-Konzentrationen ausüben (129). Sie fanden heraus, dass die Konzentrationen von Matrixmetalloproteinasen und ihren Inhibitoren im Serum höher ausfallen als im Plasma (130). Ursächlich für diesen Umstand sei am ehesten eine in Serumproben durch Koagulation und Fibrinolyse induzierte Freisetzung der intrazellulären MMPs [(131); (132)]. Außerdem könnte eine solche vermehrte Freisetzung von MMPs im Rahmen des „ex-vivo-clotting-Prozesses“ durch die Degranulation von Thrombozyten und Leukozyten erfolgen und so zu falsch hohen Werten für Matrixmetalloproteinasen im Serum führen (133). Nach *Thraikill et al* ist es ebenfalls denkbar, dass die Matrixmetalloproteinasen aus zirkulierenden Zellen freigesetzt werden und

so die erhöhten MMP-Konzentrationen im Serum bereits Ausdruck einer pathologischen Situation sind (114).

Betrachtet man zusammenfassend die dargelegte Literatur, so scheint die von uns gewählte „Serum-Methode“ eine alles in allem sehr zuverlässige Möglichkeit zu sein, um die Proteinkonzentrationen von MMP-9 und TIMP-1 abzubilden.

5.2. Serumproteinkonzentrationen

5.2.1. Zeitlicher Verlauf

Im Rahmen der durchgeführten Studie konnte erstmals der spezifische Verlauf von MMP-9 und dem endogenen Inhibitor TIMP-1 im Serum polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase (72h) ermittelt werden. Betrachtet man die Konzentrationskinetik im gesamten Patientenkollektiv so zeigt sich ein universelles Konzentrationsmuster beider Proteine. Es konnte der signifikante Anstieg der serologisch bestimmten mittleren MMP-9-Konzentrationen sowie der gleichzeitige signifikante Abfall seines spezifischen Inhibitors TIMP-1 unmittelbar nach einem schweren Trauma aufgezeigt werden. Durch die hohe zeitliche Auflösung der durchgeführten Messungen gelang uns die Abbildung des gegensinnigen zeitlichen Verlaufs beider Proteine. Die beiden Proteine weisen eine antiproportionale Balance auf (siehe Abbildung 9).

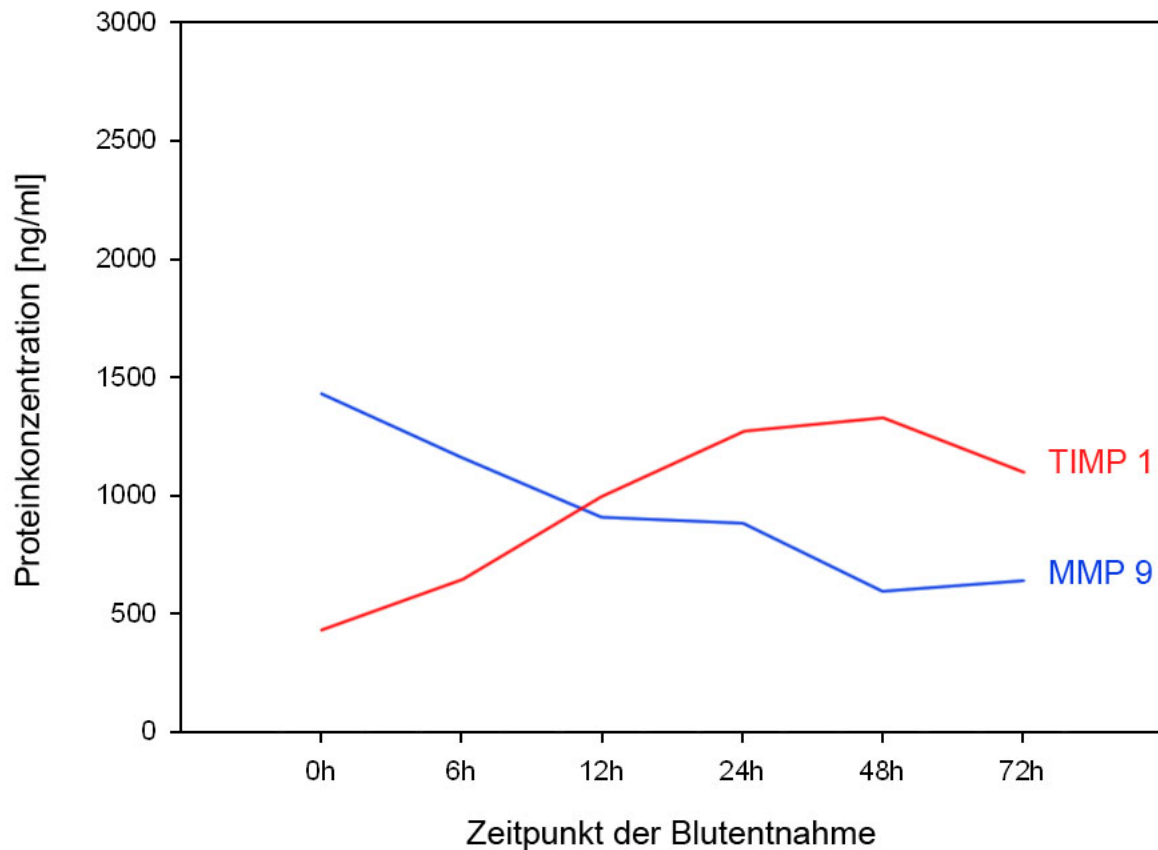


Abbildung 9: Antiproportionaler Verlauf der Proteine MMP-9 und TIMP-1 im Serum polytraumatisierter Patienten innerhalb der ersten 72 Stunden nach Trauma

Vergleicht man unsere Ergebnisse mit der vorhandenen Literatur, so wurden MMP-9- und TIMP-1-Serumkonzentrationen beispielsweise 2011 im Rahmen der Pathogenese der Sepsis untersucht. Hier zeigte eine finnische Studie, dass sowohl MMP-9 - als auch TIMP-1-Serumkonzentrationen bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht waren (124). Des Weiteren wurde das Verhältnis von MMP-9 und TIMP-1 in Zusammenhang mit der Schwere eines Asthma bronchiale untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls eine gleichsinnige Veränderung beider Proteine. Sowohl MMP-9 als auch sein Inhibitor TIMP-1 wiesen eine erhöhte Aktivität in Abhängigkeit von der Schwere einer asthmatischen Erkrankung auf. Die höchsten

Konzentrationen konnten bei Patienten gemessen werden, die einen Status asthmaticus aufwiesen (134). *Wygrecka et al* konnten bei Patienten mit akutem Lungenversagen - welches auch zu den schwerwiegenden Komplikation in der posttraumatischen Phase zählen kann (ARDS) - sowohl eine Erhöhung der MMP-9-Aktivität als auch eine erhöhte TIMP-1 Aktivität aufzeigen (135).

Im Rahmen einer Polytraumatisierung kommt es - hervorgerufen durch den hämorrhagisch-traumatischen Schock - zu einer verringerten Gewebepfusion und Mikrozirkulationsstörungen. Diese resultieren unter anderem in einer initialen Ischämie der gesamten Muskulatur mit konsekutiver Reperfusion. In diesem pathophysiologischen Zusammenhang konnten *Carmeli et al* zeigen, dass es im Rahmen der muskulären Ischämie und Regeneration zu einer erhöhten Expression von MMP-9 kommt. Der dahinter vermutete Mechanismus ist eine MMP-induzierte gesteigerte Proteolyse der Endothelzell-Basallaminae, wodurch wiederum die für die Regeneration notwendige Angiogenese sichergestellt wird (136). Auch bei anderen schweren Schädigungen der Muskulatur, beispielsweise im Rahmen der Rhabdomyolyse oder im Zusammenhang mit einer Reihe entzündlichen Muskelerkrankungen, konnten erhöhte Protein-Expressionsmuster sowie gleichsinnige Serumkonzentrationserhöhungen von MMPs und TIMPs bestimmt werden (137).

Analysiert man die Ergebnisse der von uns durchgeführten Studie, so manifestiert sich ein charakteristisches Konzentrationsmuster für MMP-9 und TIMP-1, welches sich als funktionelles Missverhältnis bzw. Ungleichgewicht bei Patienten nach schwerem Polytrauma präsentiert. Es zeigt sich - bei signifikant steigenden TIMP-1-Konzentrationen - ein signifikanter Konzentrationsabfall von MMP-9 im Serum aller Patienten; das bedeutet, es stellt sich eine antiproportionale Balance ein. Dieses Verhältnis beider Proteine steht in Kontrast zu den oben genannten Studienergebnissen und auch zu den Ergebnissen, welche in den Vorarbeiten unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden konnten. Diese zeichnen sich nämlich vor allem durch die gleichsinnige Veränderung von MMP-9 und TIMP-1 aus.

Aus pathophysiologischer Sicht bedeutet das unter Umständen, dass die jeweils zugrunde liegende Erkrankung in ihrer Entstehung mit einer pathologisch erhöhten Aktivität von MMP-9 einhergeht; und ihr endogener Inhibitor - möglicherweise zur Eingrenzung des Schadens - hochreguliert wird, um die erkrankungsspezifisch erhöhte Aktivität von MMP-9 zu inhibieren und so wieder ein ausbalanciertes Verhältnis beider Proteine herzustellen. Betrachtet man nämlich MMPs und ihre endogenen Inhibitoren unter physiologischen Bedingungen, so binden die Tissue Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen, die TIMPs, spezifisch die jeweiligen Proteinase in einem 1:1 stöchiometrischen Verhältnis. Unter pathologischen Bedingungen zeigt sich eine veränderte MMP-Aktivität; diese resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs, da jeder Veränderung der TIMP-Konzentration eine unmittelbar veränderte MMP-Aktivität folgt (138). So regulieren die TIMPs über die Inhibierung von Matrixproteinen die Gewebemöostase; durch Bindung an die Substratbindungseinheit entfalten sie ihre antagonistische Wirkung (139). Schon geringfügige Veränderungen der TIMP-Konzentrationen können so - relativ gesehen zu den MMPs - zu einer großen Auswirkung auf die MMP-Aktivität führen. Die Ursachen für diese unterschiedlichen Ergebnisse auf Genom- und Serumebene soll im Folgenden detailliert diskutiert werden. Ein möglicher Interpretationsansatz für das hier gefundene charakteristische antiproportionale Proteinkonzentrationsmuster wird am Ende der Diskussion dargestellt.

5.2.2. Korrelation der Serumkonzentrationen mit klinischen Parametern

Verletzungsschwere und Outcome

Weder hinsichtlich der Korrelation der Proteinkonzentrationen mit der Verletzungsschwere noch mit dem klinischen Outcome konnten unsere Ergebnisse signifikante Unterschiede in den gebildeten Untergruppen aufzeigen. Vergleicht man die Ergebnisse unserer Studie mit

denen der vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe auf *Genom- und Proteomebene*, so zeigt sich, dass sich die hochsignifikanten „Outcome-klassifizierenden“ Konzentrationsänderungen nicht auf die *Serumebene* reproduzieren ließen. In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich nicht - wie erwartet - eine erhöhte MMP-9- und TIMP-1-Aktivität bei Patienten, welche ein schweres Trauma erlitten oder gar verstarben, sondern - im Gegenteil - eine erniedrigte MMP-9 Konzentration und ein Anstieg der TIMP-1 Konzentration im Serum der Patienten mit einem ISS > 33.

Nun stellt sich die Frage, weshalb die positive Korrelation zwischen den untersuchten klinischen Parametern und der Genexpression auf mRNA-Ebene in Monozyten und neutrophilen Granulozyten nicht in ähnlicher Stärke in unserer Untersuchung auf der Serumebene sichtbar gemacht werden konnte, bzw. warum wir im Serum nicht - wie erwartet - eine erhöhte MMP-9- und TIMP-1-Konzentration finden konnten. Hierfür kommen unterschiedliche Ursachen in Betracht.

5.2.3. Mögliche Ursachen für die unterschiedliche Reproduzierbarkeit der vorhergehenden Ergebnisse auf Serumebene

Patientenkollektiv

Eine erste Limitation mag die Anzahl von 60 Patienten sein. Ein weiterer zu diskutierender Punkt ist die vorgenommene Einteilung des Patientenkollektivs anhand ihrer Verletzungsschwere in zwei Gruppen. Die Unterscheidung zwischen moderatem (ISS ≤ 33) und schwerem (ISS > 33) Polytrauma nahmen wir anhand des ermittelten Median aller ISS-Werte von 33 vor. Diese Unterteilung erfolgte aufgrund eines - unserem Kenntnisstand nach - fehlenden etablierten Grenzwert für den ISS. Dies stellt eine valide statistische Methode zur

Gruppenbildung innerhalb eines Kollektivs dar. Sie kann allerdings auch - aufgrund der fehlenden Trennschärfe zwischen den beiden gebildeten Gruppen - als Schwachstelle der Datenbewertung gesehen werden, weil eine solche Einteilung den individuellen Verletzungsmustern und damit der individuellen Prognose keine Rechnung tragen kann. Die Einteilung der Patientengruppe anhand des zweiten gewählten klinischen Parameters *Outcome* wurde in der hier vorliegenden Arbeit als Überleben innerhalb einer Follow-Up-Periode von 90 Tagen definiert. Das Ziel dieser klaren und eindeutigen Unterteilung nach Überleben und Versterben im posttraumatischen Intervall von 90 Tagen war die Identifizierung einer möglichen Risikogruppe innerhalb des Patientenkollektivs. Zudem zeigte sich in den vorangegangenen Arbeiten auf Genomebene in Monozyten und in neutrophilen Granulozyten eine signifikante Überexpression von MMP-9 und TIMP-1 bei den Patienten, welche das Trauma nicht überlebten, weshalb in dieser Arbeit dieselbe Gruppenbildung erfolgte. Ein naheliegender Nachteil dieser Form der Gruppenbildung liegt in der Vernachlässigung der individuellen Todesursachen einschließlich der ihr zugrunde liegenden Pathophysiologie. Weder das individuelle Verletzungsmuster noch das Alter der Patienten oder begleitende Komorbiditäten finden in dieser Auswertungsform Berücksichtigung. Zusammenfassend bedeutet das, dass zwar anhand des gewählten Kriteriums *Überleben vs. Versterben* eine eindeutige Gruppenunterscheidung gelingt, nicht aber zwei in sich homogene Gruppen gebildet werden konnten. Außerdem kam es innerhalb des hier untersuchten Kollektivs zu einer zahlenmäßig sehr unterschiedlichen Gruppenbildung, weil einer Gruppe von 54 Überlebenden eine Gruppe von 6 verstorbenen Patienten gegenübergestellt wurde; dies erschwert eine statistische Aussage. Ein letzter Punkt, welcher sich auf das Patientenkollektiv bezieht und möglicherweise einen Einfluss auf die durchgeführte Messung haben könnte, ist das variierende Alter innerhalb des untersuchten Kollektivs. 11 von 60 Patienten waren älter als 60 Jahre. Dieser epidemiologische Aspekt ist wichtig, da das Immunsystem im Laufe eines Lebens viele Veränderungen durchläuft und im

Alter anders auf eine Inflammationsreaktion reagiert. Bei alten Menschen kommt es zwar zu einer Erhöhung der reinen Neutrophilenanzahl, diese weisen allerdings eine gestörte Phagozytose, verminderte Chemotaxis sowie eine Erniedrigung der Degranulationsfähigkeit auf. Gleichzeitig kommt es im Alter zu einer verminderten Produktion der TH-1-vermittelten proinflammatorischen Zytokine $\text{INF-}\gamma$ und IL-2 und zu einer Überproduktion der antiinflammatorischen TH-2-Zytokine IL-4 und IL-10 (32). Dies könnte ein Erklärungsansatz für die fehlende Ausprägung der proinflammatorischen MMP-9-Immunantwort in unserem Kollektiv sein.

Korrelationsstärke proinflammatorischer Mediatoren mit klinischen Parametern

Versteht man Matrixmetalloproteinasen vor allem in ihrer Funktion als proinflammatorische Mediatoren sowie in Kenntnis der Ergebnisse aus den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, wäre mit einem Anstieg dieser beiden Proteine MMP-9 und TIMP-1 im Serum Polytraumatisierter in Abhängigkeit von den untersuchten klinischen Parametern zu rechnen gewesen. In einer Vielzahl unterschiedlicher Studien zu diesem Thema ließ sich bereits eine positive Korrelation zwischen Verletzungsschwere und dem Konzentrationsanstieg proinflammatorischer Mediatoren herstellen. *Gebhard et al* wiesen beispielsweise eine initial posttraumatisch deutlich erhöhte IL-6-Konzentration im Plasma polytraumatisierter Patienten nach, welche umso höher war, je schwerer das Verletzungsmuster der Patienten sich darstellte (140). Auch *Strecker et al* wiesen 2003 in ihrer Arbeit eine signifikante Korrelation zwischen der IL-6-Plasmakonzentration und dem Ausmaß des Thoraxtraumas und der Verletzungsschwere gemessen mittels PTS (Polytrauma Score) und ISS (Injury Severity Score) bei polytraumatisierten Patienten innerhalb einer Stunde nach erlittenem Trauma nach (141).

Auf der anderen Seite konnte in einer Vielzahl anderer Studien keine signifikante Korrelation

zwischen der Schwere eines vorangegangenen Traumas und der Freisetzung von Zytokinen oder Signalmolekülen aufgezeigt werden. *Grad et al* wiesen in ihrer klinisch-experimentellen Studie zwar stark erhöhte Serumkonzentrationen des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) bei Patienten, die eine Polytrauma oder eine Verbrennung erlitten haben, nach. Allerdings gelang ihnen keine Korrelation zwischen einer erhöhten Serum-VEGF-Konzentration und der Schwere der Verletzung respektive Verbrennung (142). Eine weitere Arbeit um die Arbeitsgruppe von *Stiletto et al* untersuchte Procalcitonin und Interleukin-6 in der Bronchoalveolar Lavage (BAL) polytraumatisierter Patienten mit schwerem Thoraxtrauma. Auch hier gelang es nicht einen signifikanten Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern und der Schwere des Thoraxtraumas herzustellen (143).

Zellfraktionen

MMP-9 wird von neutrophilen Granulozyten synthetisiert und gespeichert und kann so innerhalb von kürzester Zeit nach Triggerung durch das Neutrophilen-Chemokin IL-8 durch Degranulation in den Blutkreislauf sezerniert werden. Neutrophile Granulozyten können nur deshalb als biologische Speicher von MMP-9 dienen, weil sie - im Gegensatz zu Monozyten - nicht die Fähigkeit besitzen, TIMP-1 zu produzieren und es so nicht zu der Bildung eines konsekutiven inaktiven MMP-9 / TIMP-1 Komplexes kommen kann (41). Monozyten hingegen müssen MMP-9 *de novo* synthetisieren, so dass eine Freisetzung ins periphere Blut ungefähr zehnmal so lange dauert (41). Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse auf Genom- und Serumebene könnten möglicherweise darin begründet liegen, dass Monozyten für ähnlich hochsignifikante Messergebnisse wie auf mRNA-Ebene zu den untersuchten Abnahmezeiten noch nicht ausreichend *de novo-MMP-9* synthetisiert haben. Außerdem wäre es denkbar, dass die Synthese von MMP-9 und TIMP-1 zwar bereits intrazellulär erfolgt ist, die Proteine allerdings noch nicht nach extrazellulär in den Blutkreislauf gelangt sind und so

für uns unter Umständen nur *noch* nicht messbar waren. Ein weiterer denkbarer Grund für geringere MMP-9 Serumkonzentration könnte die Tatsache sein, dass Monozyten, mit etwa 3-8% der Leukozyten-Population im peripheren Blut nur eine kleine Zellfraktion repräsentieren und so unter Umständen aus diesem Grund keine ähnlich starke Proteinsignatur wie auf Genomebene gezeigt werden konnte.

Signaturverlust auf dem Weg von der mRNA zum Protein

Die wahrscheinlichste Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse auf Genom- und Serumebene könnte allerdings darin begründet sein, dass es auf dem komplex regulierten Weg von der Genomebene (mRNA) bis hin zur Körperebene (aktives Protein), zu einem Verlust der starken Signatur kommt. Die Genexpression wird über die unterschiedliche Abfolge komplexer Mechanismen gesteuert. Diese kann in *zwei Phasen* unterteilt werden: Die *erste Phase* beinhaltet die *Transkription* im Zellkern. Dabei wird die DNA zunächst in eine instabile prä-mRNA transkribiert, nach dem Prozess des Spleißens kommt es zur Entstehung der endgültigen reifen mRNA, welche durch die Kernporen des Zellkerns auswandert und die Matrize für die Proteinsynthese im endoplasmatischen Retikulum bildet. Diese Phase konnte bereits für eine Vielzahl an Genen gut charakterisiert werden (144). Die *zweite entscheidende Phase* beinhaltet die *Translation* in das aktive Protein. Der komplexe Weg bis zur Entstehung des bioaktiven Substrats, dem Protein, umfasst eine Vielzahl an aufeinander folgenden Schritten wie (1) das Falten der Polypeptidkette bis zum funktionsfähigen Protein, (2) den Transport zum Wirkungsortes des entstehenden Proteins über spezialisierte Signalproteine sowie (3) eine Menge an möglichen posttranslationalen Modifikationen. Beide Phasen der Umwandlung des Genprodukts in das aktive Protein unterliegen einzigartigen Regulationsmechanismen; dieser lange Weg ist daher an vielen Stellen störanfällig (144).

Eine zuverlässige Vorhersage, inwieweit die Menge der produzierten mRNA mit der Menge des im Körper aktiven Proteins übereinstimmt, ist daher von großem Interesse (144). Es gibt Hinweise, dass die Abbildung von mRNA-Expressionsmustern absolut notwendig ist, aber - für sich allein genommen - „unzureichend, für eine quantitative Charakterisierung eines biologischen Systems“ (145). Diese Annahme gründet auf den oben bereits aufgeführten unterschiedlichen Stationen der posttranskriptionalen Phase; so wird das letztendlich biologisch aktive Proteinprodukt über die Proteintranslationsrate, über die Halbwertszeit der entsprechenden Proteine und die ihrer mRNA sowie über die variierenden intrazellulären Lokalisationen maßgeblich beeinflusst (145).

Folgt man *Anderson et al* so gibt es überraschend wenig Arbeiten, welche die Korrelation der mRNA-Expression und daraus resultierende Proteinbiosynthese untersucht haben. *Kawamoto et al* verglichen in diesem Zusammenhang mRNA-Expressionsmuster für bestimmte Plasmaproteine mit der Menge der tatsächlich zirkulierenden Plasmaproteine und konnten durchaus eine positive Korrelation zwischen mRNA- und Proteinmenge aufzeigen (146).

Für unsere Arbeit bedeutet das, dass die Absicht, das hochsignifikante mRNA-Expressionsmuster auch auf der biologisch aktiven „Körperebene“ zu suchen, durchaus vielversprechend und folgerichtig war. Allerdings konnte die hochsignifikante Gensignatur unserer vorgehenden Studien nicht auf der „Körperebene“ reproduziert werden. Gründe hierfür können in den oben detailliert aufgeführten komplexen posttranskriptionalen Prozessen liegen, welche die Abbildung der signifikanten Überexpression von MMP-9 und TIMP-1 auf Genomebene in der Proteinebene nicht ermöglichten. Zu bedenken ist an dieser Stelle außerdem, dass die in der Arbeitsgruppe um *Kawamoto* untersuchten Genprodukte möglicherweise kein repräsentatives Bild abzeichnen, da es sich bei den untersuchten Proteinen um Plasmaproteine handelt, die sehr rasch im Anschluss an die intrazelluläre Synthese nach extrazellulär synthetisiert werden und dadurch möglicherweise den komplexen

und störanfälligen Regulationsmechanismen der Protein-Biosynthese entgehen konnten (145). Die bereits zitierte Arbeitsgruppe um *Anderson et al* untersuchte daher die mRNA-Level und die entsprechenden Protein-Level von humanen Leberproteinen. Sie konnte - ähnlich wie wir - keine positive Korrelation zwischen der mRNA-Menge und der resultierenden Proteinmenge finden, so dass sie schlussfolgerten, dass „die posttranskriptionale Regulation der Genexpression offenbar ein weitverbreitetes Phänomen in den höheren Organismen darstellt“ (145).

5.2.4. *Interpretationsansatz*

Ein möglicher anderer Interpretationsansatz der beobachteten Proteinveränderungen auf Serumebene lautet wie folgt:

Versteht man MMPs nicht nur als Effektorproteine im Rahmen der Immunalteration nach Polytrauma, sondern betrachtet ihre anderen vielseitigen Funktion, so könnte das funktionelle Ungleichgewicht der Proteinkonzentrationen von MMP-9 und TIMP-1 auch als ein Versuch des Organismus gewertet werden, durch eine generelle Reduktion der Matrixprotein-Aktivität das damit einhergehende Remodeling-Potential der MMPs auf ein Minimum zu reduzieren, da der Körper durch das erlittene Trauma bereits massiv geschwächt ist. Dieses Ziel könnte der polytraumatisierte Körper durch eine maximale Konzentrationssteigerung des spezifischen Inhibitors TIMP-1 erreichen. Dies ist von besonderer Bedeutung, wenn man das „tissue remodeling“ als *„erneutes Modellieren oder Rekonstruieren“* versteht. Dies gelingt über den Abbau der Extrazellulärmatrix und den Abbau der Basalmembran sowie durch die für den Neuaufbau notwendige Angiogenese; gleichzeitig ist es die Schlüsselrolle der TIMPs die essentielle Balance zwischen Aufbau und Abbau eben dieser Komponenten zu gewährleisten. Nur so kann im Zuge der Heilung das funktionelle Gewebegefüge wiederhergestellt werden.

Berücksichtigt man diese erläuterten physiologischen Heilungs-Mechanismen, so könnten die von uns generierten Ergebnisse möglicherweise in folgender Weise verstanden werden:

Der signifikante Verlust der MMP-9-Aktivität in der frühen posttraumatischen Phase, welche von einer gleichzeitigen signifikanten Überproduktion seines spezifischen Inhibitors TIMP-1 begleitet wird, könnte die Reaktion des Organismus auf den massiven Gewebeschaden und die ausgeprägte Immunreaktion nach erlittenem Polytrauma reflektieren. Die MMP-9 Aktivität muss durch den geschädigten Körper signifikant reduziert und herunterreguliert werden, damit dieser mit dem posttraumatischen Schaden zurechtkommen kann. In nächster Konsequenz bedeutet das möglicherweise, dass der empfindlich verletzte Organismus den Wiederherstellungsvorgang über die Produktion von TIMP-1 bzw. Herunterregulation der MMP-9 Aktivitäten verzögern oder verhindern will. Aufgrund des oben bereits erläuterten speziellen Bindungsverhältnisses zwischen TIMPs und MMPs führt bereits eine geringfügige Erhöhung der TIMP-Konzentration im Serum zu einem deutlichen Einfluss auf die MMP-Aktivität. TIMP-1 im Speziellen bindet an die Hemopexid-ähnliche Domäne von Pro-MMP-9 und führt so wahrscheinlich zu einer Stabilisierung von Pro-MMP-9 in seiner *nicht-aktiven* Form (147). Dies kann in diesem Zusammenhang als „*Rescue-Versuch*“ des geschwächten Körpers auf das Ausmaß des Traumas und die damit verbundenen massive Immunalteration gewertet werden, indem er die „Selbsteilungskräfte“ verzögert.

Die Herunterregulierung von MMP-9 und gleichzeitige Heraufregulierung von TIMP-1, wie sie in unseren Studienergebnissen sichtbar wird, konnte auch in anderen Zusammenhängen beobachtet werden. So konnte eine Studie an Patienten mit einem Links-Herz-Ersatz-System die gleiche antiproportionale Balance der beiden Proteine zeigen; dies wurde hier als Versuch gewertet, durch die reduzierte MMP-Aktivität den Matrixschaden des Myokards nach Ischämie zu minimieren. Durch die Herunterregulierung der Aktivität der

Matrixmetalloproteinasen und die gleichzeitig Erhöhung der TIMP-1-Aktivität unter Einsatz des Links-Herz-Ersatz-Systems (LVAD) kommt es nach Meinung der Autoren zu einer funktionalen Erholung der Plastizität des Myokards des linken Ventrikels (148).

Eine weitere Studie untersuchte die Serumkonzentrationen von MMP-9 und TIMP-1 im Zusammenhang mit entzündlichen Myositiden und die Veränderungen der Proteinkonzentrationen unter Immunglobulin-Therapie (149). Hier zeigte sich - nach initiiertes Therapie - ein ähnliches MMP-9/TIMP-1 Verhältnis wie in unsere Studie. Initial wiesen die Patienten, welche an einer entzündlichen Myopathie erkrankt waren, als Ausdruck ihrer entzündlichen Muskelerkrankung eine sowohl erhöhte MMP-9 als auch erhöhte TIMP-1 Aktivität auf. Nach begonnener Therapie mit intravenösem Immunglobulin G (ivIg) zeigte sich eine Veränderung der Proteinkonzentrationen. Es kam zu einem Abfall der Proteinkonzentration von MMP-9 sowie zu einem gleichzeitigen Anstieg der TIMP-1-Konzentrationen im Serum aller Patienten. Die unter der Immunglobulin-Therapie beobachtete Abnahme der MMP-9-Serumkonzentrationen und gleichzeitige Zunahme der TIMP-1-Konzentrationen, welche mit einer klinischen Symptombesserung der behandelten Patienten einherging, werteten die Autoren als eine positive Beeinflussung des erkrankungsspezifischen Missverhältnisses zwischen MMP-9/TIMP-1 und damit als Therapieerfolg durch die Immuntherapie (149).

Ein ähnlicher körpereigener Mechanismus könnte unseren Ergebnissen zugrunde liegen. Aufgrund des ausgeprägten Gewebetraumas im Rahmen einer schweren Mehrfachverletzung kommt es initial zu einer Erniedrigung der MMP-9-Aktivität und gesteigerten TIMP-1-Aktivität. Dies könnte so den Versuch des traumatisierten Organismus darstellen, den durch das Trauma erlittenen Matrixschaden durch verminderte Remodeling-Aktivität zunächst zu verzögern und zu minimieren, bis der durch das Trauma gestörte Organismus die kritische posttraumatische Phase überstanden hat.

6. Zusammenfassung

Polytraumatisierte Patienten sind in der initialen posttraumatischen Phase durch die Entwicklung einer generalisierten systemischen Immunreaktion (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS) bedroht, dessen Schwere den weiteren Verlauf dieser Patienten entscheidend beeinflusst. Die Grundlage zu dieser Annahme beruht auf einer Vielzahl an Untersuchungsergebnissen der letzten Jahrzehnte, welche die Ursache dieses posttraumatischen Krankheitsverlaufs unter anderem in der Dysbalance der pro- und antiinflammatorischen Immunmediatoren sehen. In den dieser Dissertation zugrunde liegenden Vorarbeiten konnten *Biberthaler et al* in einer *Oligonukleotid-Microarray-Studie* erstmals hochspezifische mRNA-Expressionsprofile polytraumatisierter Patienten ermitteln, welche schon in der frühen posttraumatischen Phase hochsignifikante Korrelation mit unterschiedlichen klinischen Parametern aufwiesen. Anhand dieser mRNA-Microarrayanalyse konnte so ein funktionelles Netzwerk von Genen identifiziert werden, welches bei überlebenden Patienten im Vergleich zu verstorbenen Patienten signifikant unterschiedlich exprimiert war (86). Die transkribierte RNA allerdings muss nicht zwangsläufig in das entsprechende Protein umgesetzt werden. Für die biologische Aktivität sind die durch die mRNA kodierten Proteine maßgeblich verantwortlich, so dass es in einem nächsten Schritt unerlässlich war, dieses hochsignifikante Expressionsmuster auf *Genomebene* zunächst in der nächsten Ebenen - *der intrazellulären Proteomebene* - zu untersuchen. Konsequenterweise schließt sich diesen beiden genannten Ebenen eine dritte Ebene an: *die Serumebene oder Körperebene*.

Wir untersuchten folglich, ob sich die zuvor identifizierten „Kandidatengene“ auch extrazellulär im Serum polytraumatisierter Patienten wiederfinden und ob sich das

differentielle „Outcome-klassifizierende“ Expressionsmuster auch im Serum darstellt. Dazu wählten wir zwei vielversprechende Proteine aus:

Die Matrixmetalloproteinase MMP-9 und ihren endogenen Inhibitor TIMP-1.

MMP-9 ist eine Typ VI Kollagenase, wird in den tertiären Granulomen der polymorphonukleären Zellen (PMNs) gespeichert und von einer Vielzahl von Zellen wie beispielsweise Monozyten, Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen sezerniert (64). Matrixmetalloproteinasen greifen auf unterschiedliche Weise in die Regulierung der Inflammationsantwort ein, indem sie beispielsweise die transepitheliale Migration von Leukozyten ermöglichen und die Aktivierung und Kompartimentierung von Chemokinen wesentlich beeinflussen [(47); (58)]. Matrixmetalloproteinasen werden durch ihre endogenen Inhibitoren, die TIMPs, spezifisch gehemmt. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Regulation der inflammatorischen Antwort durch die Kontrolle der Zytokinaktivierung einerseits und durch die Prozessierung der Zelladhäsionsrezeptoren der Entzündungszellen andererseits (63).

Ziel dieser Studie war die Bestimmung der Serumkonzentration beider Proteine und der Bezug zu den klinischen Parametern *Verletzungsschwere* und *Outcome*. Vor allem wurde Wert auf die Ermittlung des zeitlichen Verlaufs der Proteinkonzentration sowie auf die Balance zwischen MMP-9 und TIMP-1 in der frühen posttraumatischen Phase gelegt.

Dazu wurden 60 polytraumatisierte Patienten (ISS > 16) in die Studie eingeschlossen. Serumproben wurden jeweils bei Eintreffen in den Schockraum (innerhalb von 90 min) und erneut 6h, 12h, 24h, 48h und 72h nach Trauma entnommen. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Untersuchte klinische Parameter waren die Verletzungsschwere bewertet mittels ISS sowie das Outcome, erfasst als 90-Tage Überleben. Die resultierenden Daten wurden mithilfe des Mann-Whitney Rank Sum Tests statistisch ausgewertet.

Bei allen Patienten zeigt sich in der frühen posttraumatischen Phase ein signifikanter Konzentrationsabfall von MMP-9 nach Trauma. Genau gegensätzlich dazu steigt die Serumkonzentration seines Inhibitors im zeitlichen Verlauf signifikant an. Es zeigt sich somit eine antiproportionale charakteristische Konzentrationskinetik im Serum aller Patienten. Eine signifikante Korrelation mit der Verletzungsschwere und mit dem klinischen Outcome ergab sich nicht. Die hochsignifikante Gensignatur unserer vorhergehenden Studien konnte in dieser Arbeit also auf der „Körperebene“ nicht reproduziert werden. Gründe hierfür können in den geschilderten komplexen posttranskriptionalen Prozessen liegen, welche möglicherweise zu einem Signaturverlust von der Genomebene bis hin zur Serumebene führten.

Eine denkbare Interpretationsmöglichkeit für das charakteristische antiproportionale Verlaufsmuster der Proteine könnte die Reaktion des Organismus auf den massiven Gewebeschaden und die ausgeprägte Immunreaktion nach erlittenem Polytrauma sein. Setzt man die MMP-Aktivität mit dem “Remodeling-Potential” der Matrixmetalloproteinasen gleich, muss diese durch den geschädigten Körper signifikant reduziert werden, damit er den posttraumatischen Schaden bewältigen kann. In nächster Konsequenz bedeutet das, dass der empfindlich verletzte Organismus den Wiederherstellungsvorgang über die Überproduktion von TIMP-1 bzw. Herunterregulation der MMP-9 Aktivitäten verzögern will. Dies könnte als “Rescue-Versuch” des Körpers auf das Ausmaß des Traumas und die damit verbundene massive Immunalteration gewertet werden.

7. Literaturnachweis

1. Tscherne H, Regel G, Sturm JA, Friedl HP. [Degree of severity and priorities in multiple injuries]. *Chirurg*. 1987 Oct;58(10):631-40.
2. Pape HC. Classification of patients with multiple injuries--is the polytrauma patient defined adequately in 2012? *Injury*. [Editorial]. 2012 Feb;43(2):127-8.
3. Tamim H, Al Hazzouri AZ, Mahfoud Z, Atoui M, El-Chemaly S. The injury severity score or the new injury severity score for predicting mortality, intensive care unit admission and length of hospital stay: experience from a university hospital in a developing country. *Injury*. [Evaluation Studies]. 2008 Jan;39(1):115-20.
4. Harwood PJ, Giannoudis PV, Probst C, Van Griensven M, Krettek C, Pape HC. Which AIS based scoring system is the best predictor of outcome in orthopaedic blunt trauma patients? *J Trauma*. 2006 Feb;60(2):334-40.
5. Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D. [Epidemiology of the severely injured patient. A prospective assessment of preclinical and clinical management. AG Polytrauma of DGU]. *Unfallchirurg*. 2000 May;103(5):355-63.
6. Trunkey DD. Trauma. Accidental and intentional injuries account for more years of life lost in the U.S. than cancer and heart disease. Among the prescribed remedies are improved preventive efforts, speedier surgery and further research. *Sci Am*. 1983 Aug;249(2):28-35.
7. Bogner V, Mutschler W, Biberthaler P. [The "time" factor. Its impact in pathophysiology and therapy of multiple trauma]. *Unfallchirurg*. [Review]. 2009 Oct;112(10):838-45.
8. Munzberg M, Mahlke L, Bouillon B, Paffrath T, Matthes G, Wolf CG. [Six years of Advanced Trauma Life Support (ATLS) in Germany: the 100th provider course in Hamburg]. *Unfallchirurg*. 2010 Jul;113(7):561-6.
9. Ciesla DJ, Moore EE, Johnson JL, Burch JM, Cothren CC, Sauaia A. A 12-year prospective study of postinjury multiple organ failure: has anything changed? *Arch Surg*. 2005 May;140(5):432-8; discussion 8-40.
10. Hietbrink F, Koenderman L, Rijkers G, Leenen L. Trauma: the role of the innate immune system. *World J Emerg Surg*. 2006;1:15.
11. Cobb JP, O'Keefe GE. Injury research in the genomic era. *Lancet*. 2004 Jun 19;363(9426):2076-83.
12. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury*. [Review]. 2005 Jun;36(6):691-709.

13. Hildebrand F, Giannoudis P, Krettek C, Pape HC. Damage control: extremities. *Injury*. [Review]. 2004 Jul;35(7):678-89.
14. 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 Apr;40(4):624-30; discussion 30-1.
15. Tschoeke SK, Hellmuth M, Hostmann A, Ertel W, Oberholzer A. The early second hit in trauma management augments the proinflammatory immune response to multiple injuries. *J Trauma*. 2007 Jun;62(6):1396-403; discussion 403-4.
16. Nast-Kolb D, Ruchholtz S, Waydhas C, Schmidt B, Taeger G. [Damage control orthopedics]. *Unfallchirurg*. [Review]. 2005 Oct;108(10):804, 6-11.
17. Mann V, Mann S, Szalay G, Hirschburger M, Rohrig R, Dictus C, et al. [Treatment of polytrauma in the intensive care unit]. *Anaesthesist*. [Review]. 2010 Aug;59(8):739-61; quiz 62-3.
18. Eiseman B, Beart R, Norton L. Multiple organ failure. *Surg Gynecol Obstet*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1977 Mar;144(3):323-6.
19. 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*. [Review]. 1998 Aug;10(2):79-89.
20. Nast-Kolb D, Aufmkolk M, Ruchholtz S, Obertacke U, Waydhas C. Multiple organ failure still a major cause of morbidity but not mortality in blunt multiple trauma. *J Trauma*. 2001 Nov;51(5):835-41; discussion 41-2.
21. 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 Jul;101(7):520-6.
22. Dewar D, Moore FA, Moore EE, Balogh Z. Postinjury multiple organ failure. *Injury*. [Review]. 2009 Sep;40(9):912-8.
23. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest*. [Biography Classical Article Historical Article]. 2009 Nov;136(5 Suppl):e28.
24. Nathens AB, Marshall JC. Sepsis, SIRS, and MODS: what's in a name? *World J Surg*. [Review]. 1996 May;20(4):386-91.
25. Gebhard F, Huber-Lang M. Polytrauma--pathophysiology and management principles. *Langenbecks Arch Surg*. [Review]. 2008 Nov;393(6):825-31.

26. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. *Injury*. [Review]. 2007 Dec;38(12):1336-45.
27. Sherry RM, Cue JI, Goddard JK, Parramore JB, DiPiro JT. Interleukin-10 is associated with the development of sepsis in trauma patients. *J Trauma*. 1996 Apr;40(4):613-6; discussion 6-7.
28. Svoboda P, Kantorova I, Ochmann J. Dynamics of interleukin 1, 2, and 6 and tumor necrosis factor alpha in multiple trauma patients. *J Trauma*. 1994 Mar;36(3):336-40.
29. Roumen RM, Hendriks T, van der Ven-Jongekrijg J, Nieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW, van der Meer JW, et al. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann Surg*. 1993 Dec;218(6):769-76.
30. Hoch RC, Rodriguez R, Manning T, Bishop M, Mead P, Shoemaker WC, et al. Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. *Crit Care Med*. 1993 Jun;21(6):839-45.
31. Kumpf O, Schumann RR. Genetic variation in innate immunity pathways and their potential contribution to the SIRS/CARS debate: evidence from human studies and animal models. *J Innate Immun*. [Review]. 2010;2(5):381-94.
32. Ibs KH, Rink L. [The immune system in aging]. *Z Gerontol Geriatr*. [Review]. 2001 Dec;34(6):480-5.
33. Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg*. 2001 Sep;193(3):237-44.
34. Flohe SB, Flohe S, Schade FU. Invited review: deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms. *Innate Immun*. 2008 Dec;14(6):333-44.
35. Menger MD, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch Surg*. [Review]. 2004 Nov;389(6):475-84.
36. Novotny AR, Reim D, Assfalg V, Altmayr F, Friess HM, Emmanuel K, et al. Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. *Immunobiology*. 2012 Jun;217(6):616-21.
37. Tschoeke SK, Ertel W. Immunoparalysis after multiple trauma. *Injury*. [Review]. 2007 Dec;38(12):1346-57.
38. Angele MK, Faist E. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care*. [Review]. 2002 Aug;6(4):298-305.
39. Faist E, Wichmann MW. [Immunology in the severely injured]. *Chirurg*. [Review]. 1997 Nov;68(11):1066-70.

40. Rensing H, Bauer M. [Multiple organ failure. Mechanisms, clinical manifestations and treatment strategies]. *Anaesthesist*. [Review]. 2001 Nov;50(11):819-41.
41. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol*. 2001 Jun;69(6):851-9.
42. Kieseier BC, Seifert T, Giovannoni G, Hartung HP. Matrix metalloproteinases in inflammatory demyelination: targets for treatment. *Neurology*. [Review]. 1999 Jul 13;53(1):20-5.
43. Biberthaler P, Bogner V, Baker HV, López MC, Neth P, Kanz K, et al. Genome-wide monocytic mRNA expression in polytrauma patients for identification of clinical outcome. *Shock*. 2005 July 2005;24(1):11 - 9.
44. Foletta VC, Segal DH, Cohen DR. Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *Journal of Leukocyte Biology*. 1998;63(2):139-52.
45. Hasegawa H, Senga T, Ito S, Iwamoto T, Hamaguchi M. A role for AP-1 in matrix metalloproteinase production and invadopodia formation of v-Crk-transformed cells. *Exp Cell Res*. 2009 May 1;315(8):1384-92.
46. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(2):197-250.
47. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. [Review]. 2004 Aug;4(8):617-29.
48. Roeb E, Matern S. [Matrix metalloproteinases: Promoters of tumor invasion and metastasis - A review with focus on gastrointestinal tumors]. *Z Gastroenterol*. [Review]. 2001 Sep;39(9):807-13.
49. Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell*. 1998 Oct 30;95(3):365-77.
50. Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol*. 1997 Oct;6(5):199-213.
51. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21491-4.
52. Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE, Jr. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Faseb J*. [Review]. 1993 Dec;7(15):1434-41.
53. Harris ED, Jr. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med*. [Review]. 1990 May 3;322(18):1277-89.

54. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol.* 1993 May;64(5 Suppl):474-84.
55. Nasatzky E, Rubinstein Y, Goultschin J, Schwartz Z. [The role of Matrix Metalloproteinases in the progression of periodontitis, and the use of specific inhibitors to these enzymes in the treatment of the periodontal disease]. *Refuat Hapeh Vehashinayim.* 2003 Apr;20(2):38-45, 81.
56. Chang YC, Yang SF, Lai CC, Liu JY, Hsieh YS. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodontal Res.* 2002 Jun;37(3):196-203.
57. Woessner JF, Jr. The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Sep 6;732:11-21.
58. Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Dec;6(12):931-44.
59. Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Oct;16(5):558-64.
60. Schonbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol.* 1998 Oct 1;161(7):3340-6.
61. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(6-7):1362-78.
62. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002 Mar;2(3):161-74.
63. Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(6-7):1334-47.
64. Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, Laihio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med.* 2006;38(5):306-21.
65. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 1997 Feb 20;385(6618):729-33.
66. Black RA, White JM. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol.* [Review]. 1998 Oct;10(5):654-9.
67. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol.* [Review]. 2004 Mar;49(3):187-98.

68. Corbel M, Caulet-Maugendre S, Germain N, Molet S, Lagente V, Boichot E. Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat. *J Pathol.* 2001 Apr;193(4):538-45.
69. Boulday G, Fitau J, Coupel S, Soullillou JP, Charreau B. Exogenous tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes endothelial cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1030:28-36.
70. Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1995 Jun;376(6):345-55.
71. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463-516.
72. Sivak JM, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res.* 2002 Jan;21(1):1-14.
73. Emonard H, Grimaud JA. Matrix metalloproteinases. A review. *Cell Mol Biol.* [Review]. 1990;36(2):131-53.
74. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Libby P. Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Jan 17;748:501-7.
75. Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res.* 2000 Jun 23;86(12):1259-65.
76. Feinberg MW, Jain MK, Werner F, Sibinga NE, Wiesel P, Wang H, et al. Transforming growth factor-beta 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. *J Biol Chem.* 2000 Aug 18;275(33):25766-73.
77. Uzui H, Harpf A, Liu M, Doherty TM, Shukla A, Chai NN, et al. Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation.* 2002 Dec 10;106(24):3024-30.
78. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res.* 2001 Aug 3;89(3):201-10.
79. Shapiro SD, Kobayashi DK, Pentland AP, Welgus HG. Induction of macrophage metalloproteinases by extracellular matrix. Evidence for enzyme- and substrate-specific responses involving prostaglandin-dependent mechanisms. *J Biol Chem.* 1993 Apr 15;268(11):8170-5.
80. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res.* [Review]. 2003 Oct 1;59(4):812-23.

81. Murphy G, Hembry RM. Proteinases in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl.* 1992 Jan;32:61-4.
82. Overall CM. Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Sep 6;732:51-64.
83. Ganser GL, Stricklin GP, Matrisian LM. EGF and TGF alpha influence in vitro lung development by the induction of matrix-degrading metalloproteinases. *Int J Dev Biol.* 1991 Dec;35(4):453-61.
84. Guerne PA, Lotz M. Interleukin-6 and transforming growth factor-beta synergistically stimulate chondrosarcoma cell proliferation. *J Cell Physiol.* 1991 Oct;149(1):117-24.
85. Ito A, Sato T, Iga T, Mori Y. Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts. *FEBS Lett. [In Vitro].* 1990 Aug 20;269(1):93-5.
86. Biberthaler P, Bogner V, Baker HV, Lopez MC, Neth P, Kanz KG, et al. Genome-wide monocytic mRNA expression in polytrauma patients for identification of clinical outcome. *Shock.* 2005 Jul;24(1):11-9.
87. Bogner V, Stoecklein V, Richter P, Suren C, Teupser D, Kanz KG, et al. Increased activation of the transcription factor c-Jun by MAP kinases in monocytes of multiple trauma patients is associated with adverse outcome and mass transfusion. *J Surg Res.* 2012 Nov;178(1):385-9.
88. 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 Mar;14(3):187-96.
89. Hu J, Van den Steen PE, Sang QX, Opdenakker G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Jun;6(6):480-98.
90. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb. [Review].* 2003;10(5):275-82.
91. Liener UC, Rapp U, Lampl L, Helm M, Richter G, Gaus M, et al. [Incidence of severe injuries. Results of a population-based analysis]. *Unfallchirurg.* 2004 Jun;107(6):483-90.
92. Aldrian S, Koenig F, Weninger P, Vecsei V, Nau T. Characteristics of polytrauma patients between 1992 and 2002: what is changing? *Injury.* 2007 Sep;38(9):1059-64.
93. Soreide K, Kruger AJ, Vardal AL, Ellingsen CL, Soreide E, Lossius HM. Epidemiology and contemporary patterns of trauma deaths: changing place, similar pace, older face. *World J Surg.* 2007 Nov;31(11):2092-103.
94. Pfeifer R, Tarkin IS, Rocos B, Pape HC. Patterns of mortality and causes of death in polytrauma patients--has anything changed? *Injury. [Review].* 2009 Sep;40(9):907-11.

95. Chawda MN, Hildebrand F, Pape HC, Giannoudis PV. Predicting outcome after multiple trauma: which scoring system? *Injury*. [Review]. 2004 Apr;35(4):347-58.
96. Lavoie A, Moore L, LeSage N, Liberman M, Sampalis JS. The Injury Severity Score or the New Injury Severity Score for predicting intensive care unit admission and hospital length of stay? *Injury*. 2005 Apr;36(4):477-83.
97. Butcher N, Balogh ZJ. AIS>2 in at least two body regions: A potential new anatomical definition of polytrauma. *Injury*. 2011 Jul 8.
98. Butcher N, Balogh ZJ. The definition of polytrauma: the need for international consensus. *Injury*. [Review]. 2009 Nov;40 Suppl 4:S12-22.
99. Ciesla DJ, Moore EE, Johnson JL, Cothren CC, Banerjee A, Burch JM, et al. Decreased progression of postinjury lung dysfunction to the acute respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Surgery*. 2006 Oct;140(4):640-7; discussion 7-8.
100. Faist E, Schinkel C, Zimmer S. Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World J Surg*. [Review]. 1996 May;20(4):454-9.
101. 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*. [Review]. 1996 Oct 15;125(8):680-7.
102. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Kim FJ, Banerjee A, Peterson VM. Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window. *Surgery*. 1995 Aug;118(2):358-64; discussion 64-5.
103. Ertel W, Keel M, Bonaccio M, Steckholzer U, Gallati H, Kenney JS, et al. Release of anti-inflammatory mediators after mechanical trauma correlates with severity of injury and clinical outcome. *J Trauma*. 1995 Nov;39(5):879-85; discussion 85-7.
104. Faist E, Schinkel C, Zimmer S, Kremer JP, Von Donnersmarck GH, Schildberg FW. Inadequate interleukin-2 synthesis and interleukin-2 messenger expression following thermal and mechanical trauma in humans is caused by defective transmembrane signalling. *J Trauma*. 1993 Jun;34(6):846-53; discussion 53-4.
105. Schinkel C, Sendtner R, Zimmer S, Faist E. Functional analysis of monocyte subsets in surgical sepsis. *J Trauma*. 1998 May;44(5):743-8; discussion 8-9.
106. Liener UC, Bruckner UB, Knoferl MW, Steinbach G, Kinzl L, Gebhard F. Chemokine activation within 24 hours after blunt accident trauma. *Shock*. 2002 Mar;17(3):169-72.
107. Seekamp A, Jochum M, Ziegler M, van Griensven M, Martin M, Regel G. Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion. *J Trauma*. 1998 May;44(5):874-82.

108. Martin C, Boisson C, Haccoun M, Thomachot L, Mege JL. Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma. *Crit Care Med*. 1997 Nov;25(11):1813-9.
109. Kieseier BC, Seifert T, Hartung HP. [Matrix metalloproteinases. Potential targets for new treatments in inflammatory demyelinating diseases of the nervous system]. *Nervenarzt*. 1999 Jun;70(6):509-16.
110. Johansson S, Smedsrod B. Identification of a plasma gelatinase in preparations of fibronectin. *J Biol Chem*. 1986 Apr 5;261(10):4363-6.
111. Vartio T, Baumann M. Human gelatinase/type IV procollagenase is a regular plasma component. *FEBS Lett*. 1989 Sep 25;255(2):285-9.
112. Moutsiakis D, Mancuso P, Krutzsch H, Stetler-Stevenson W, Zucker S. Characterization of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human plasma. *Connect Tissue Res*. 1992;28(3):213-30.
113. Zucker S, Hymowitz M, Conner C, Zarrabi HM, Hurewitz AN, Matrisian L, et al. Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 30;878:212-27.
114. Thrailkill K, Cockrell G, Simpson P, Moreau C, Fowlkes J, Bunn RC. Physiological matrix metalloproteinase (MMP) concentrations: comparison of serum and plasma specimens. *Clin Chem Lab Med*. [Letter]. 2006;44(4):503-4.
115. Avolio C, Filippi M, Tortorella C, Rocca MA, Ruggieri M, Agosta F, et al. Serum MMP-9/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 ratios in multiple sclerosis: relationships with different magnetic resonance imaging measures of disease activity during IFN-beta-1a treatment. *Mult Scler*. 2005 Aug;11(4):441-6.
116. Kanesaka T, Mori M, Hattori T, Oki T, Kuwabara S. Serum matrix metalloproteinase-3 levels correlate with disease activity in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006 Feb;77(2):185-8.
117. Manginas A, Bei E, Chaidaroglou A, Degiannis D, Koniavitou K, Voudris V, et al. Peripheral levels of matrix metalloproteinase-9, interleukin-6, and C-reactive protein are elevated in patients with acute coronary syndromes: correlations with serum troponin I. *Clin Cardiol*. [Comparative Study]. 2005 Apr;28(4):182-6.
118. Kato R, Momiyama Y, Ohmori R, Taniguchi H, Nakamura H, Ohsuzu F. Levels of matrix metalloproteinase-1 in patients with and without coronary artery disease and relation to complex and noncomplex coronary plaques. *Am J Cardiol*. [Comparative Study]. 2005 Jan 1;95(1):90-2.
119. Samnegard A, Silveira A, Lundman P, Boquist S, Odeberg J, Hulthe J, et al. Serum matrix metalloproteinase-3 concentration is influenced by MMP-3 -1612 5A/6A promoter genotype and associated with myocardial infarction. *J Intern Med*. 2005 Nov;258(5):411-9.

120. Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo MS, Kellokumpu-Lehtinen P, Kahari VM, Pyrhonen S. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2005 Jul 15;11(14):5158-66.
121. Sfiridaki A, Miyakis S, Tsirakis G, Alegakis A, Passam AM, Kandidaki E, et al. Systemic levels of interleukin-6 and matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple myeloma may be useful as prognostic indexes of bone disease. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(9):934-8.
122. Kamiguti AS, Lee ES, Till KJ, Harris RJ, Glenn MA, Lin K, et al. The role of matrix metalloproteinase 9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2004 Apr;125(2):128-40.
123. Molica S, Vitelli G, Levato D, Giannarelli D, Vacca A, Cuneo A, et al. Increased serum levels of matrix metalloproteinase-9 predict clinical outcome of patients with early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol*. 2003 Jun;70(6):373-8.
124. Lauhio A, Hastbacka J, Pettila V, Tervahartiala T, Karlsson S, Varpula T, et al. Serum MMP-8, -9 and TIMP-1 in sepsis: High serum levels of MMP-8 and TIMP-1 are associated with fatal outcome in a multicentre, prospective cohort study: Hypothetical impact of tetracyclines. *Pharmacol Res*. 2011 Jul 1.
125. Piesiak P, Brzecka A, Kosacka M, Passowicz-Muszynska E, Dyla T, Jankowska R. [Concentrations of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Pol Merkur Lekarski*. 2011 Nov;31(185):270-3.
126. Kalogeropoulos AS, Tsiodras S, Rigopoulos AG, Sakadakis EA, Triantafyllis A, Kremastinos DT, et al. Novel association patterns of cardiac remodeling markers in patients with essential hypertension and atrial fibrillation. *BMC Cardiovasc Disord*. 2011;11:77.
127. Lewandowski KC, Banach E, Bienkiewicz M, Lewinski A. Matrix metalloproteinases in type 2 diabetes and non-diabetic controls: effects of short-term and chronic hyperglycaemia. *Arch Med Sci*. 2011 Apr;7(2):294-303.
128. Kodama S, Iwata K, Iwata H, Yamashita K, Hayakawa T. Rapid one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases. An application for rheumatoid arthritis serum and plasma. *J Immunol Methods*. 1990 Feb 20;127(1):103-8.
129. Jung K. Matrix metalloproteinase-8 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in serum do not reflect the analytes circulating in blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Mar;28(3):e15-6; author reply e7.
130. Mannello F. Serum or plasma samples? The "Cinderella" role of blood collection procedures: preanalytical methodological issues influence the release and activity of circulating matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors, hampering diagnostic trueness and leading to misinterpretation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Apr;28(4):611-4.

131. Mannello F, Tonti GA. Gelatinase concentrations and zymographic profiles in human breast cancer: matrix metalloproteinases circulating in plasma are better markers for the subclassification and early prediction of cancer: the coagulation/fibrinolysis pathways alter the release, activation and recovery of different gelatinases in serum. *Int J Cancer*. 2007 Jul 1;121(1):216-8; author reply 9-23.
132. Gerlach RF, Demacq C, Jung K, Tanus-Santos JE. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem*. 2007 Jan;40(1-2):119-23.
133. Zucker S, Doshi K, Cao J. Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in blood and urine: potential clinical applications. *Adv Clin Chem*. 2004;38:37-85.
134. Yao PM, Lemjabbar H, D'Ortho MP, Maitre B, Gossett P, Wallaert B, et al. Balance between MMP-9 and TIMP-1 expressed by human bronchial epithelial cells: relevance to asthma. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 30;878:512-4.
135. Wygrecka M, Wilhelm J, Jablonska E, Zakrzewicz D, Preissner KT, Seeger W, et al. Shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Aug 15;184(4):438-48.
136. Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve*. 2004 Feb;29(2):191-7.
137. Schoser BG, Blottner D, Stuerenburg HJ. Matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies: enhanced immunoreactivity near atrophic myofibers. *Acta Neurol Scand*. 2002 Apr;105(4):309-13.
138. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003 May 2;92(8):827-39.
139. Herouy Y, Vanscheidt W, Schopf E, Norgauer J. [Gene and protein family of matrix metalloproteinases. Structure, function and expression in the skin]. *Hautarzt*. [Review]. 1999 Nov;50(11):825-36; quiz 36.
140. Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, Strecker W, Kinzl L, Bruckner UB. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? *Arch Surg*. 2000 Mar;135(3):291-5.
141. Strecker W, Gebhard F, Perl M, Rager J, Buttenschon K, Kinzl L, et al. Biochemical characterization of individual injury pattern and injury severity. *Injury*. [Comparative Study]. 2003 Dec;34(12):879-87.
142. Grad S, Ertel W, Keel M, Infanger M, Vonderschmitt DJ, Maly FE. Strongly enhanced serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) after polytrauma and burn. *Clin Chem Lab Med*. 1998 Jun;36(6):379-83.

143. Stiletto RJ, Baacke M, Gotzen L, Lefering R, Renz H. Procalcitonin versus interleukin-6 levels in bronchoalveolar lavage fluids of trauma victims with severe lung contusion. *Crit Care Med*. 2001 Sep;29(9):1690-3.
144. Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*. [Comparative Study]. 1997 Mar-Apr;18(3-4):533-7.
145. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):1720-30.
146. Kawamoto S, Matsumoto Y, Mizuno K, Okubo K, Matsubara K. Expression profiles of active genes in human and mouse livers. *Gene*. 1996 Sep 26;174(1):151-8.
147. Goldberg GI, Collier IE, Eisen AZ, Grant GA, Marmer BL, Wilhelm SM. Mosaic structure of the secreted ECM metalloproteases and interaction of the type IV collagenases with inhibitors. *Matrix Suppl*. 1992;1:25-30.
148. Li YY, Feng Y, McTiernan CF, Pei W, Moravec CS, Wang P, et al. Downregulation of matrix metalloproteinases and reduction in collagen damage in the failing human heart after support with left ventricular assist devices. *Circulation*. 2001 Sep 4;104(10):1147-52.
149. Hurnaus S, Mueller-Felber W, Pongratz D, Schoser BG. Serum levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their tissue inhibitors in inflammatory neuromuscular disorders. *Eur Neurol*. 2006;55(4):204-8.

8. Danksagung

An erster Stelle gebührt mein ausdrücklicher und ganz besonderer Dank dem Direktor der Klinik für Allgemeine, Unfall-, Hand- und Plastische Chirurgie der LMU, Herrn Prof. Dr. med. Wolf E. Mutschler, für seine allzeit wohlwollende und jederzeit unendlich konstruktive wissenschaftliche und klinische Unterstützung. Ich weiß diese besondere Hilfestellung für meinen beruflichen und persönlichen Werdegang von Herzen zu schätzen.

Meiner mittlerweile sehr liebgewonnenen Freundin und natürlich wissenschaftlichen und klinischen Mentorin, Frau Dr. med. Viktoria Bogner, gilt mein ganz besonderer Dank. Sie hat mir mit unschätzbare Geduld und all ihrem Engagement gezeigt, wie man wissenschaftlich arbeitet und mir gleichzeitig seit Beginn meiner klinischen Tätigkeit mit ihren Fähigkeiten und stets dem richtigen Rat zur Seite gestanden.

Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. med. Peter Biberthaler für die wissenschaftliche und fachliche Betreuung meiner Promotion sowie für die Überlassung meines Dissertationsthemas.

Besonders möchte ich mich bei den Mitarbeitern der chirurgischen Notfallaufnahme, des Instituts für Anästhesiologie und der Intensivstation der Chirurgischen Klinik bedanken. Allen voran danke ich Herrn Prof. Dr. med. K.-G. Kanz, OA Dr. med. L. Ney und Frau OÄ Dr. med. Theresia Hummel für Ihre Unterstützung bei der Durchführung unserer Arbeit.

Ein ganz ausdrücklicher Dank gilt meinem lieben Co-Doktoranden Thomas Kusmenkov, ohne den die unzähligen nächtlichen Blutentnahmen und die regelmäßig wiederkehrenden

Laborstunden wohl kaum so bereichernd und kurzweilig gewesen wären und ohne dessen Unterstützung und Freundschaft diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Mein abschließender und größter Dank gilt meinen Eltern, Birgit und Thomas Brumann, meinen Geschwistern Mona, Daniela und Christian und dem Mann an meiner Seite, Volker Braunstein, für ihre andauernde und liebevolle Unterstützung meines Studiums und schließlich dieser Arbeit. Ich bin mir sehr bewusst, dass weder das Eine noch das Andere ohne den starken familiären Rückhalt und den fortwährenden Ansporn jemals möglich gewesen wäre. Für ihre Geduld mit mir kann ich nicht oft genug Danke sagen.