

Aus dem Muskuloskeletalen UniversitätsZentrum München (MUM)
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Boris Holzapfel
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

Die Immunreaktion nach Polytrauma und kardiopulmonaler Reanimation

Eine Analyse ausgewählter Pathomechanismen



Kumulative Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia Legendi

für das Fach

Orthopädie und Unfallchirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität

von

Dr. med. Mareen Braunstein (geb. Brumann)

2024

Für Ida

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG UND STAND DER WISSENSCHAFT..... | 4 |
| 2. ZIELSETZUNG DES HABILITATIONSPROJEKTS..... | 11 |
| 3. STUDIENDESIGN UND PROBENGEWINNUNG | 13 |
| 4. LISTE DER PUBLIKATIONEN | 14 |
| 5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER EIGENEN PUBLIKATIONEN..... | 16 |
| 5.1. GEZIELTE mRNA-EXPRESSIONSPROFILE IN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN BEIM POLYTRAUMA | 16 |
| 5.2. INTRAZELLULÄRE mRNA-EXPRESSIONSMUSTER DES STAT/SOCS SIGNALWEGES IN GRANULOZYTEN BEIM POLYTRAUMA | 20 |
| 5.3. GEZIELTE SERUMANALYSE AUSGEWÄHLTER BIOMARKER NACH POLYTRAUMA | 26 |
| 5.4. SERUMANALYSE VON MMP-9 UND TIMP-1 IN ABHÄNGIGKEIT KLINISCHER PARAMETER NACH POLYTRAUMA | 29 |
| 5.5. ANALYSE DER mRNA-EXPRESSIONSPROFILE NACH KARDIOPULMONALER REANIMATION..... | 35 |
| 5.6. UNTERSUCHUNG DER SERUMKONZENTRATIONEN VON SELEN UND SELENOPROTEIN P NACH POLYTRAUMA..... | 39 |
| 5.7. GLYKOKALYXSHEDDING NACH KARDIOPULMONALER REANIMATION | 47 |
| 6. AUSSICHT | 53 |
| 6.1. FRÜHES GLYKOKALYXSHEDDING, MULTIORGANVERSAGEN UND OUTCOME NACH POLYTRAUMA | 53 |
| 6.2. SELEN UND SEINE COENZYME NACH KARDIOPULMONALER REANIMATION | 53 |
| 7. LITERATUR..... | 55 |

1. Einleitung und Stand der Wissenschaft

Sowohl das Polytrauma als auch die kardiopulmonale Reanimation führen im unmittelbaren posttraumatischen Verlauf bzw. nach Wiedererlangen eines Spontankreislaufs („return of spontaneous circulation“, ROSC) zu ausgeprägten systemischen Immunreaktionen. Hinsichtlich der zugrundeliegenden Pathologie weisen die *posttraumatische systemische Inflammationsreaktion* und das *Postreanimationssyndrom* deutliche Parallelen auf und werden im Folgenden kurz erläutert.

Ganz allgemein versteht man unter einem **Polytrauma** die gleichzeitig entstandene Verletzung mehrerer Körperregionen, von denen wenigstens eine Verletzung oder die Kombination mehrerer Verletzungen lebensbedrohlich ist. Durch den Unfall entsteht ein Primärschaden („first hit“), der ebenso wenig zu beeinflussen ist wie die Eingangsmorbidität des Verunfallten/der Verunfallten. Massive Blutungen und multiple direkte Organschädigungen führen zu einem traumatisch-hämorrhagischen Schock in unterschiedlicher Ausprägung, der eine zunächst notwendige und sinnvolle Stressreaktion des Körpers auslöst. Aufgrund der Überflutung des Körpers mit Entzündungsmediatoren kommt es dann aber zu einer **überschießenden Ganzkörperentzündungsreaktion** („systemic inflammatory response syndrome“, SIRS), die auch nicht unmittelbar verletzte Organe einbezieht (Rai et al., 2022). Diese regelhaften Sekundärschäden werden als „second hit“ bezeichnet. Das „Two-hit“-Modell unterscheidet neben dem Initialtrauma als „first hit“ verschiedene endogene und exogene Faktoren, die als repetitive sekundäre „hits“ betrachtet werden. Die sekundär schädigenden Ereignisse begünstigen zusätzlich den Übergang einer initial potenziell milden immunologischen Reaktion in eine schwere Verlaufsform mit der möglichen Entwicklung von Komplikationen (z. B. Multiorgandysfunktion/-versagen). Die wesentlichen endogenen Faktoren („antigenic load“) im Sinne eines „second hit“ sind respiratorische Dysfunktion (Hypoxie), kardiovaskuläre Dysfunktion, metabolische Dysfunktion (Azidose) und Infektionen.

Unter den exogenen Faktoren („interventional load“) werden therapeutischen Maßnahmen, insbesondere chirurgischen Interventionen, aber auch Transfusionen zusammengefasst.

Dem aktuellen pathophysiologischen Verständnis nach entwickeln PolytraumapatientInnen gleichzeitig zwei einander entgegengesetzte Immunreaktionen in unterschiedlich zeitlicher Ausprägung: eine überschießende proinflammatorische Inflammationsreaktion („systemic inflammatory response syndrome“, SIRS) sowie eine antiinflammatorische Immunantwort („severe systemic antiinflammatory response syndrome“, SARS) (Suaia et al., 2016). Beide Immunreaktionen sind sowohl durch das unspezifische als auch durch das spezifische Immunsystem gesteuert (Rai et al., 2022).

Charakteristisch für den „traumatischen Schock“ ist einerseits der Blutverlust und andererseits der mechanische Gewebeschaden. Ersterer resultiert in einer unzureichenden Gewebepfusion und einer zellulären Hypoxie. Letzterer setzt sofort große Mengen von RNA, DNA, zytosolischen Organellen, Matrix- und Membranfragmenten frei. Der traumatische Zellschaden führt dann über die Freisetzung von DAMPs („damage associated molecular patterns“) zu einer massiven proinflammatorischen Reaktion. Über die Bindung an transmembranöse Proteine („toll like receptors“) erfolgt die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z. B. NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)) und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Hildebrand et al., 2005). Die Aktivierung des unspezifischen Immunsystems ist die unmittelbare Folge des erlittenen Traumas und führt über die - durch traumatische Ischämie und Reperfusion - freigesetzten Sauerstoffradikale zu einer direkten Aktivierung der neutrophilen Granulozyten (PMNs) (Gebhard & Huber-Lang, 2008). Diese wandern über exprimierte Adhäsionsrezeptoren wie z.B. CD18 und ICAM-1 in die Gewebe der Organ-Endstrombahn ein. Hier sind sie über Degranulation und die Freisetzung von reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies direkt zytotoxisch und aggravieren die proinflammatorische Reaktion sowie Zytokinfreisetzung. Als Antwort des Organismus auf den Trauma-assoziierten Stress werden zeitgleich zahlreiche pro- (IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α ,

Interferon- γ) und antiinflammatorische Zytokine (IL-4, IL-10, IL-12 und IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1RA)) ausgeschüttet (Keel & Trentz, 2005). Die Dysbalance zwischen der proinflammatorischen (SIRS mit reversibler Organdysfunktion) und antiinflammatorischen (SARS) Immunantwort scheint maßgeblich zur posttraumatischen Zelldysfunktion beizutragen und im schlimmsten Fall der „Wegbereiter“ des Organversagens zu sein.

Die endotheliale Glykokalyx stellt eine weitere „Schlüsselstelle“ der posttraumatischen Inflamationsantwort dar. Sie ist eine den Endothelzellen anliegende Schicht, deren Hauptbestandteile membrangebundene Proteoglykanen (v.a. Syndecan-1), Glykosaminoglykane wie beispielsweise Hyaluronan und Glykoproteine sind (Steppan et al., 2011). Zusammen mit löslichen Plasmaproteinen bildet sie die physiologisch wirksame Oberflächenschicht, die „endothelial surface layer“ (ESL) (Jedlicka et al., 2020). Aufgrund ihrer Lage zwischen Intravasalraum und Endothelzelle erfüllt sie vielseitige Funktionen: so dient sie als vaskuläre Permeabilitätsbarriere und bildet in ihrer Gesamtheit eine antiadhäsive und antikoagulatorische Schicht, die die darunterliegenden Endothelzellen und Zellverbindungen schützt.

Der traumatisch-hämorrhagische Schock geht mit einer frühen Schädigung der endothelialen Glykokalyx einher. Hierbei kommt es zum sogenannten „Glykokalyxshedding“. So wird die Abspaltung einzelner Glykokalyxkomponenten von der Endothelmembran bezeichnet, die zu einem Verlust der Glykokalyxintegrität und so zu einer endothelialen Dysfunktion führt. Diese traumatische Schädigung der Glykokalyx wird als **„traumatische Endotheliopathie“** bezeichnet.

Pathophysiologisch führen zwei unterschiedliche Wegen zu einer Glykokalyxschädigung. Einerseits kommt es im Rahmen der posttraumatischen „Abwehrreaktion“ – getriggert durch die exzessive Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren – zu einer Sezernierung von unterschiedlichen Proteasen (wie z.B. Heparanasen, Matrixmetalloproteinasen und Hyaluronidasen) aus den Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten, die dann zu einem enzymatischen Abbau der

Glykokalyx führen (Wang et al., 2011). Andererseits führen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies sowie proinflammatorische Zytokine wie TNF- α zu einer direkten Schädigung der Glykokalyx (Golen et al., 2012). Der Verlust der endothelialen Abschirmung ermöglicht dann eine direkte Leukozyten-Endothel-Interaktion, die durch die Shedding-bedingte Freilegung von Oberflächenmarkern (z. B. „intercellular adhesion molecule (ICAM-1)“) ermöglicht wird.

Die dysregulierte Immunantwort nach Polytrauma führt außerdem zu einer inflammatorischen Aktivierung der Endothelzellen, die unter anderem über endothelial exprimierte Mustererkennungsrezeptoren (Pattern recognition receptors – PRRs) erfolgt und intrazellulär unter Beteiligung von MAP-Kinasen zu einer verstärkten Expression proinflammatorischer Gene führt. Abgespaltene Heparansulfate wirken zusätzlich chemotaktisch auf Leukozyten und erhöhen durch einen positiven Feedback-Mechanismus deren Präsenz am Inflammationsort (Jedlicka et al., 2020). So kommt es im posttraumatischen Verlauf durch die Degradation der Glykokalyx und die dadurch freigesetzten Komponenten zu einer anhaltenden Aktivierung des unspezifischen Immunsystems und in der Folge zu einer weiteren Verstärkung der systemischen posttraumatischen Inflammationsreaktion (White et al., 2017). Da die Bestandteile der zerstörten Glykokalyx ihre antikoagulatorischen, heparinähnlichen Eigenschaften behalten, geht das Shedding der endothelialen Glykokalyx mit einer aktiven Antikoagulation des Blutes einher („endogene Heparinisierung“) und ist so ebenfalls wesentlicher Treiber der **traumatischen Koagulopathie** (Lier et al., 2018).

Dieser geschilderte Prozess rund um die endotheliale Glykokalyx ist in seiner lokal begrenzten Form physiologisch sinnvoll, da er zu einer schnellen Rekrutierung von Leukozyten an die Stelle des inflammatorischen Geschehens führt. Die Systemisierung im Rahmen der posttraumatischen Inflammationsreaktion verkehrt diesen initial protektiven Effekt dann aber ins Negative und führt zu einer weiteren Belastung des Organismus (Chelazzi et al., 2015).

Nach Überstehen der Akutphase stört vor allem diese systematische überschießende Immundysregulation mit Beteiligung ursprünglich nicht verletzter Organsysteme häufig die Regenerationsabläufe und kann in schwerwiegenden Komplikationen wie dem Multiorganversagen oder der Sepsis münden (Guisasola et al., 2018). Solange diese Komplikationen nicht immer beherrscht werden können, wird sich die 30-Tage-Letalität (zwischen 8-12%, TraumaRegister der DGU, Jahresbericht 2022) nach Polytrauma nicht wesentlich weiter reduzieren lassen.

Nach einem **Herz-Kreislauf-Stillstand** mit anschließendem ROSC kommt es zu einem Ischämie-Reperfusionssyndrom des gesamten Körpers (Stoppe et al., 2012). Das daraus resultierende **Postreanimationssyndrom** ist ebenfalls durch eine generalisierte Aktivierung proinflammatorischer und prokoagulatorischer Signalwege unter Beteiligung des Endothels charakterisiert und führt ebenfalls zu einem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (Adams, 2006). Unmittelbar nach einem ROSC kommt es einerseits - ähnlich wie bei einem schweren Trauma - zu einer lokalisierten Gewebeschädigung, wobei die zerebrale Schädigung eine vornehmliche Rolle spielt. Andererseits imponieren systemische Folgen, die durch eine generalisierte Inflammationsreaktion, eine Endothelaktivierung und die Beeinflussung des Gerinnungssystems erklärt sind (Nolan et al., 2010). Damit gleicht das Krankheitsbild in zahlreichen Aspekten dem der Sepsis und wird vielfach auch als „sepsis-like syndrome“ bezeichnet (Adrie et al., 2004a). Im weiteren Verlauf nach ROSC verstärkt die systemische Inflammationsreaktion die Organschädigung durch eine gestörte Mikro- und Makrozirkulation, durch Stoffwechselfdysbalancen sowie eine direkte Leukozyten-vermittelte Gewebszerstörung. Geppert et al. konnten in ihrem Kollektiv bei fast 70% nach Herz-Kreislauf-Stillstand und ROSC die Kriterien eines „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) nachweisen (Geppert et al., 2000).

Schon in der Frühphase nach ROSC sind beispielsweise stark erhöhte Plasmakonzentrationen von u.a. IL-6, IL-8, IL-10 und des löslichen TNF-Rezeptors detektierbar. IL-6 wirkt über unterschiedliche Kaskaden - eine Syntheseaktivierung von Akute-Phase-Proteinen, über eine B- und T-Zell-Stimulation sowie eine Induktion von Selektinen - auf der Endotheloberfläche, welche in ihrer Gesamtheit zu einer vermehrten Leukozytenadhäsion führen (Nishimoto & Kishimoto, 2006). IL-8 vermittelt im Rahmen des Postreanimationssyndroms die Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Neben dieser proinflammatorischen Reaktion kommt es - ähnlich wie bei Polytrauma-PatientInnen - auch zu einer kompensatorischen antiinflammatorischen Immunreaktion. Diese wird u.a. über die Zytokine IL-4, IL-10, IL-11 und IL-1RA induziert und reduziert über eine Herunterregulation der monozytären MHC-II Expression deren Fähigkeit der Antigenpräsentation und in weiterer Folge damit auch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Adrie et al., 2002). PatientInnen, die nach initialem ROSC verstarben, zeigten beispielsweise signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von IL-10 (Adrie et al., 2002). Während des Postreanimationssyndroms kommt es zudem zu einer **dysfunktionalen Gerinnung**. Diese ist durch eine vermehrte Ausbildung von Thrombin-Antithrombin-Komplexen und Fibrinmonomere geprägt sowie von einer thrombozytären Aktivierung ohne gleichzeitig gesteigerte endogene Fibrinolyse.

Ähnlich wie in der posttraumatischen Inflammationsreaktion spielt die endotheliale Dysfunktion auch im Rahmen des Ischämie-Reperfusionssyndroms nach Reanimation eine entscheidende pathophysiologische Rolle. Synonym zur „traumatischen Endotheliopathie“ kann von der „**Endotheliitis**“ nach Reanimation gesprochen werden (Callaway, 2012). Eine der Hauptaufgaben der intakten Glykokalyx ist die Bildung einer Schutzschicht über der Endotheloberfläche, um die Endothelzellen von zirkulierenden Blutzellen abzuschirmen (Weinbaum et al., 2007). Das Freilegen des Gefäßendothels durch das Ischämie/Reperfusion-getriggerte endotheliale Glykokalyxshedding verstärkt die oben erläuterte systemische Inflammationsreaktion und führt u.a. zur Entstehung von

Thrombosen und einer Permeabilitätssteigerung in der Mikrozirkulation (Adrie et al., 2004b). Vorgegangene Arbeiten untersuchten diesen Zusammenhang zwischen der Glykokalyx- bzw. Endothelschädigung, der systemischen Inflammationsreaktion und der Schwere des Postreanimationssyndroms und konnten eine signifikante Korrelation von IL-6 als Inflammationsparameter und erhöhten Syndecan-1-Messwerte als Sheddingparameter zeigen (Bro-Jeppesen et al., 2016).

Trotz wesentlicher Fortschritte in der Akutversorgung von PatientInnen nach einem Herz-Kreislaufstillstand bleibt die Langzeitprognose dieses Patientenkollektivs weiterhin schlecht. Die EuReCa-TWO-Studie ergab eine Gesamtüberlebensrate von 8-13% nach OHCA („out of hospital cardiac arrest“) in Europa (Gräsner et al., 2020). Eine systematische Überprüfung und Metaanalyse, die 56 Studien aus Europa umfasste, ergab eine Überlebensrate von 11,7 % (95 %-CI 10,5–13,0 %) (Yan et al., 2020). Ursächlich für die anhaltend hohe Letalität scheint unter anderem auch die Ausprägung des Postreanimationssyndroms zu sein (Nolan et al., 2010).

Zusammenfassend soll diese Einleitung verdeutlichen, wie ähnlich die pathophysiologischen Prozesse nach Polytrauma und Reanimation verlaufen. Beide „Zustände“ führen zu einer gleichzeitigen Aktivierung und gegenseitigen Wechselwirkung dreier relevanter „Systeme“: **Inflammation, Endothel und Gerinnung**. Diese Systeme wurden in unterschiedlichen Studien dieses Habilitationsprojektes adressiert und werden im Folgenden detailliert dargestellt.

2. Zielsetzung des Habilitationsprojektes

Ziel der durchgeführten und geplanten Arbeiten des Habilitationsprojektes war es, einzelne Teilaspekte dieser komplexen immunologischen Vorgänge zu untersuchen und so einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Auswirkungen der unmittelbaren Immunreaktion auf „unterschiedlichen Ebenen“ - nach initial erfolgreicher Akutbehandlung von Polytrauma- und Reanimations-PatientInnen - zu leisten.

Für das Polytrauma konnten in der vorangegangenen Genom-umfassenden Microarray Screening Analyse der Arbeitsgruppe sowohl spezifische Genexpressionsprofile als auch biologisch-funktionelle Pathways (MAP-Kinase-Pathway) in Monozyten detektiert werden, die bei verstorbenen PatientInnen hochsignifikant unterschiedlich exprimiert waren. Unklar ist bislang jedoch, in welcher Form diese von uns auf transkriptionaler Ebene neu detektierten Genexpressionsprofile in Monozyten in einer weiteren hoch relevanten Zelllinie - den Granulozyten - exprimiert ist (ad 5.1.und 5.2.). Zudem ist unklar, ob diese Expression auch auf translationaler Ebene - also als umgeschriebenes Protein - zu finden ist und letztlich, inwieweit diese Proteine auch extrazellulär vorhanden und in die systemische Zirkulation sezerniert werden (ad 5.3. und 5.4.).

Ein weiteres Teilziel des Habilitationsprojektes war es zu untersuchen, ob es zu ähnlichen intrazellulären Expressionsveränderungen bei PatientInnen nach kardiopulmonaler Reanimation kommt (ad 5.5.).

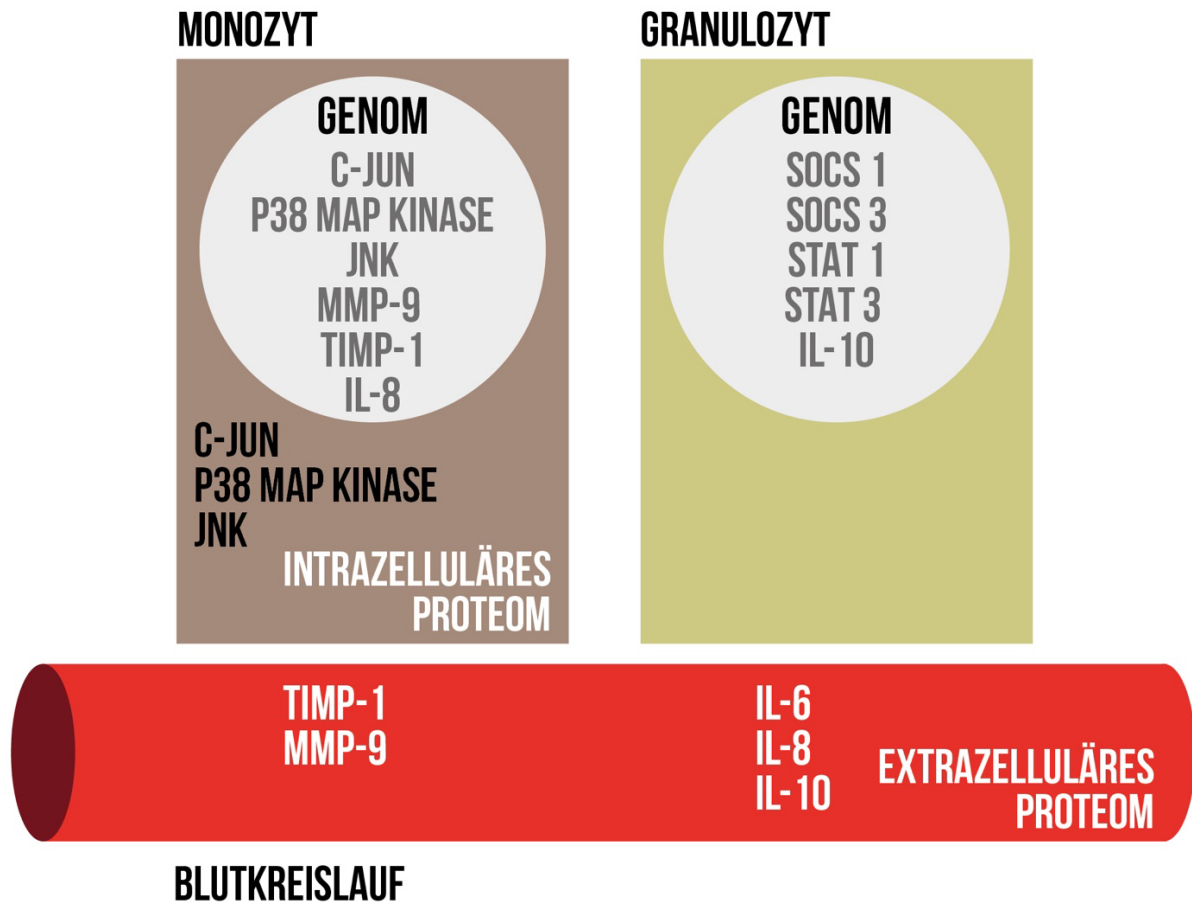


Abbildung 1: Darstellung der unterschiedlichen untersuchten Parameter und ihrer Wirkungsebene

In Kooperation mit zwei weiteren Arbeitsgruppen erfolgte zudem die Untersuchung von zwei relevanten Teilaspekten der Immundestabilisierung nach Polytrauma/Reanimation, die Konzentrationsveränderungen von Selen und selenabhängigen Coenzyme (ad 5.6.) sowie die Bedeutung der endothelialen Glykokalyx jeweils in den beiden Patientenkollektiven (ad 5.7.) (Becker et al., 2014a) (Fuchs et al., 2020).

3. Studiendesign und Probengewinnung für die klinischen Studien

Polytrauma (Teilprojekte 5.1./5.2./5.3./5.4./5.6./6.1.)

Polytraumatisierte PatientInnen, die in den Schockraum unseres Klinikums eingeliefert wurden und einen Injury Severity Score (ISS) von >16 Punkten aufwiesen, wurden prospektiv in die laufenden klinischen Studien der AG Polytrauma/Resuscitation eingeschlossen. Es erfolgten serielle, sequenziellen Blutentnahmen initial nach Einlieferung in den Schockraum (0h), sowie erneut nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma. Für jeden eingeschlossenen Patienten/eingeschlossene Patientin wurden die klinischen Daten (u.a. Geschlecht, Alter, Unfallmechanismus, Verletzungsmuster und -schwere anhand ISS, die Gabe von Blutprodukten, das Ausmaß des Multiorganversagens (MOF-Score), das 90-Tage-Überleben u.v.m.) in einer klinischen Datenbank erfasst.

Reanimation (Teilprojekte 5.5/5.7./6.2.)

In die laufenden klinischen Projekte der AG Polytrauma/Resuscitation wurden PatientInnen nach kardiopulmonaler Reanimation (CPR) und Wiedererlangen eines Spontankreislaufs eingeschlossen. In diesem Kollektiv erfolgte eine initiale Blutentnahme direkt nach Wiedererlangung der Kreislauffunktion (über den Notarzt/die Notärztin des NAW Mitte vor Ort) sowie zusätzlich nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach CPR. Alle relevanten klinische Daten (Geschlecht, Alter, Vorerkrankungen, Beginn der Reanimationsmaßnahmen, Dauer der CPR, Zeit bis ROSC, initialer Rhythmus, Medikation, u.v.m.) wurden in einer klinischen Datenbank erfasst.

Die molekularbiologischen Methoden zur Aufarbeitung und Analyse der Blutproben waren von der jeweiligen Fragestellung abhängig und sind in den assoziierten Publikationen ausführlich beschrieben.

4. Liste der zur kumulativen Habilitationsschrift beitragenden Publikationen

1. Bogner-Flatz V, **Braunstein M**, Bazarian JJ, Keil L, Richter PH, Kusmenkov T, Biberthaler P, Giese T. Neutrophil Gene Expression Patterns in Multiple Trauma Patients Indicate Distinct Clinical Outcomes. *J Surg Res* 2022 Sep; 277:100-109. doi: 10.1016/j.jss.2022.03.011. Epub 2022 Apr 25
2. **Brumann M**, Matz M, Kusmenkov T, Stegmaier J, Biberthaler, Kanz K-G, Mutschler W, Bogner V. Impact of STAT/SOCS mRNA Expression Levels after Major Injury; Mediators of Inflammation (*Mediat Inflamm*) 01/2014; 2014:749175.
3. **Brumann M**, Kusmenkov T, Ney L, Kanz K-G, Leidel BA, Biberthaler P, Mutschler W, Bogner V. Concentration kinetics of serum MMP-9 and TIMP-1 after blunt multiple injuries in the early posttraumatic period. *Mediators of Inflammation (Mediat Inflamm)*. 04/2012; 2012:435463.
4. **Braunstein M**, Kusmenkov T, Böcker W, Bogner-Flatz V. Influence of massive blood transfusion and traumatic brain injury on TIMP-1 and MMP-9 serum levels in polytraumatized patients, *Unfallchirurg*. 2019 Dec.
5. **Braunstein M**, Williamson M, Kusmenkov T, Landes J, Kanz KG, Biberthaler P, Böcker W, Bogner V. Significant mRNA cytokine changes immediately after initiation of cardiopulmonary resuscitation; *Mediators of Inflammation*; Dec 2017.

6. **Braunstein M**, Kusmenkov T, Zuck C, Angstwurm M, Becker NP, Böcker W, Schomburg L, Bogner-Flatz V. Selenium and Selenoprotein P Deficiency correlates with Complications and Adverse Outcome After Major Trauma; Shock, 2020 Jan.

7. **Braunstein M***, Bogner-Flatz* V, Kusmenkov T, Ocker LE, Böcker W, Ney L, Tschöpp J, Annecke T. On the scene hyaluraonan and syndecan-1 serum levels and outcome after cardiac arrest and resuscitation; Mediators of inflammation, May 2019.

5. Ergebnisse und Diskussion der eigenen Publikationen

5.1. Gezielte mRNA-Expressionsprofile in neutrophilen Granulozyten beim Polytrauma

Bogner-Flatz V, **Braunstein M**, Bazarian JJ, Keil L, Richter PH, Kusmenkov T, Biberthaler P, Giese T. Neutrophil Gene Expression Patterns in Multiple Trauma Patients Indicate Distinct Clinical Outcomes. J Surg Res 2022 Sep; 277:100-109. doi: 10.1016/j.jss.2022.03.011. Epub 2022 Apr 25.

Das anhand der vorausgegangenen genom-umfassenden mRNA-Analyse detektierte monozytäre Genexpressionsprofil enthält ein funktionelles Netzwerk an inflammatorischen Transkriptionsfaktoren, die in einer Aktivierung des MAP-Kinase-Pathways münden. Dieses Netzwerk gruppiert sich um den Transkriptionsfaktor c-Jun, welcher als Bestandteil des Transkriptionsfaktor-Komplexes AP-1 entscheidend an der transkriptionalen Regulation im Immunsystem beteiligt ist (Hasegawa et al., 2009). Die differentielle Regulation dieses Netzwerks scheint für die Kaskade der posttraumatischen Immunreaktion eine wichtige Rolle spielen. In Abhängigkeit verschiedener klinischer Ereignisse, zum Beispiel je nach Ausprägung eines Multiorgan dysfunktionssyndroms und schließlich in Abhängigkeit des klinischen Outcomes (90-Tage-Überleben) zeigten sich diese Parameter in Monozyten signifikant unterschiedlich reguliert.

Granulozyten spielen als wesentlicher Bestandteil des zellulären Immunsystems ebenfalls eine wichtige Rolle im Rahmen der posttraumatischen systemischen Inflammation. Daher erfolgte in diesem Teilprojekt die Untersuchung der in Monozyten detektierten Signalkaskade (c-Jun, c-Fos, BCL2A, MMP-9, TIMP-1, ETS-2) in **granulozytärer mRNA**.

Hier konnten wir zeigen, dass BCL2A, MMP-9, TIMP-1 und ETS-2 bei PatientInnen, die im posttraumatischen Verlauf verstarben (90-Tage-Überleben), signifikant höher exprimiert waren als bei Überlebenden (siehe Abbildung 1 (5.1)). PatientInnen mit hämorrhagischem Schock und konsekutiver Massentransfusion (>10EKs/24h) wiesen ein signifikant erhöhtes BCL2A und MMP-

9-Expressionsprofil sowie eine signifikante Herunterregulation von IL-1 β und MIP-1 β auf (siehe Abbildung 2 (5.1)). Die granulozytäre mRNA-Expression von TIMP-1 war bei PatientInnen mit SHT zu jedem Messzeitpunkt signifikant erhöht (siehe Abbildung 3 (5.1)).

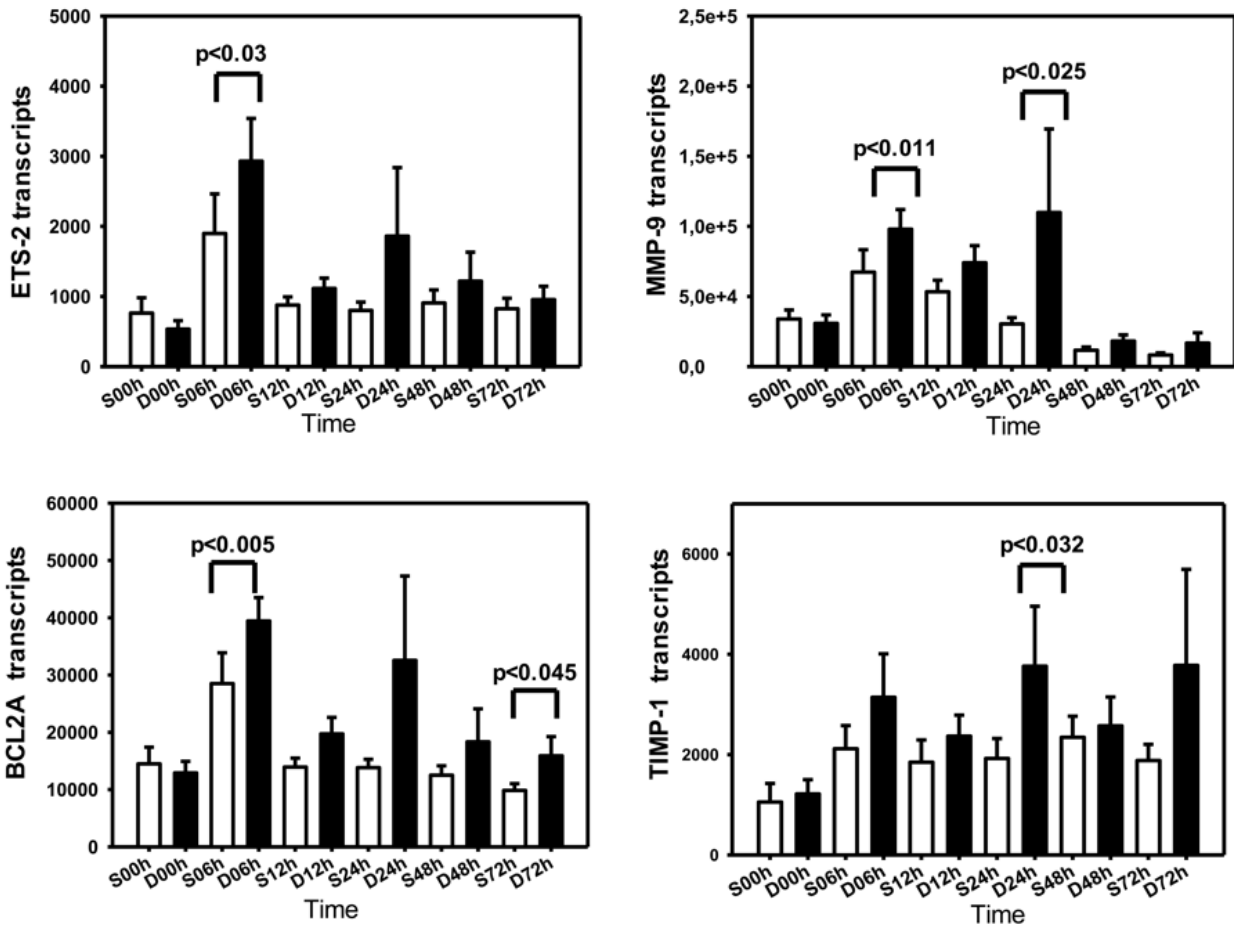


Abbildung 1 (5.1): ETS-2 (6h: $p > 0.03$), MMP-9 (6h: $p < 0.011$ und 24h: $p < 0.025$), BCL2A (6h: $p < 0.005$ und 72h: $p < 0.045$) und TIMP-1 (24h: $p < 0.032$) waren bei PatientInnen, die im posttraumatischen Verlauf verstarben, signifikant höher exprimiert als bei Überlebenden (Death/Survival D/S; 90-Tage-Überleben).

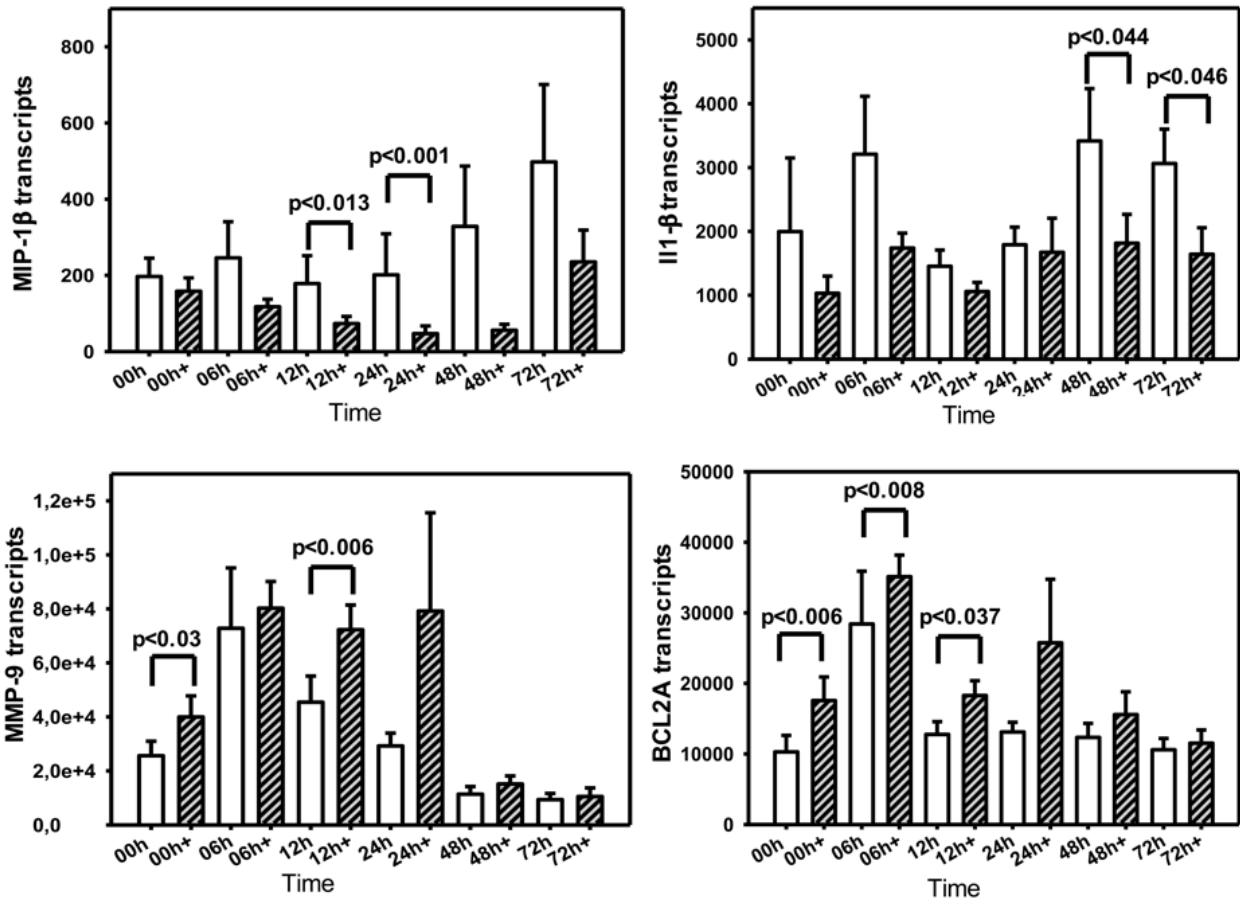


Abbildung 2 (5.1): PatientInnen mit hämorrhagischem Schock und konsekutiver Massentransfusion (>10EKs/24h) wiesen eine signifikante Herunterregulation von IL-1 β und MIP-1 β auf. Die MMP-9- und BCL2A Expression war signifikant erhöht.

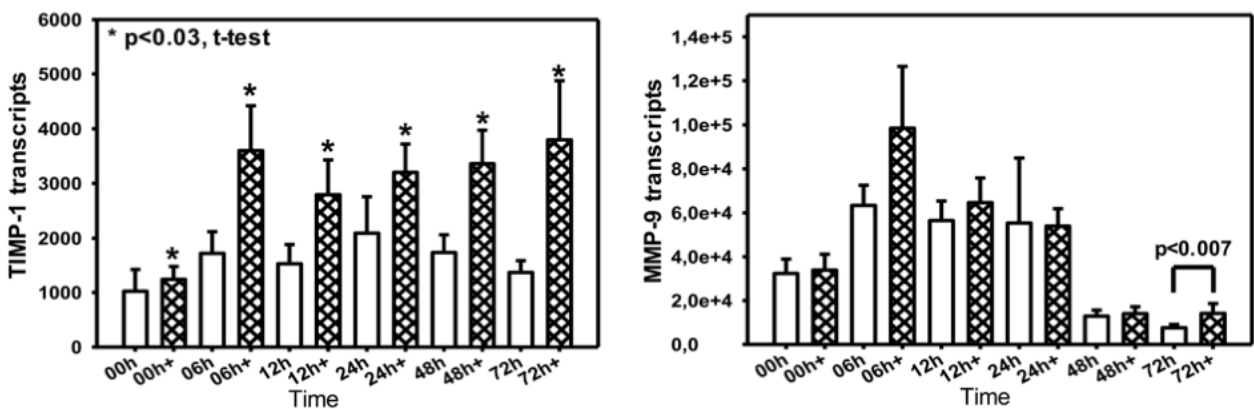


Abbildung 3 (5.1): Die mRNA-Expression von TIMP-1 und MMP-9 war bei PatientInnen mit SHT signifikant erhöht.

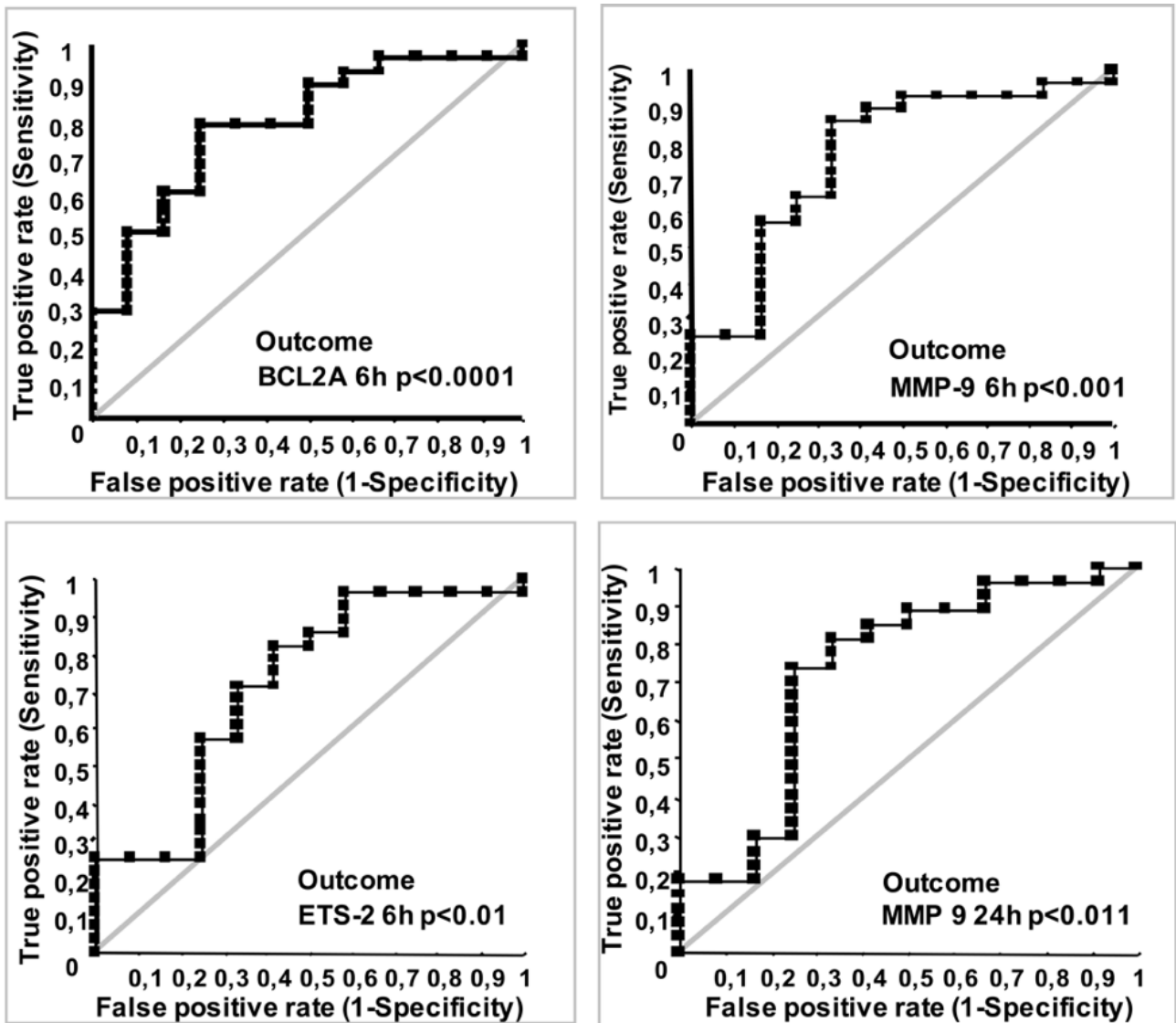


Abbildung 4 (5.1): Diese Graphik zeigt das Potenzial der Outcome-Vorhersage anhand der granulozytären Expressionsmuster von BCL2A, ETS-2 and MMP-9 im initialen posttraumatischen Zeitintervall von 0-24h nach Trauma anhand von ROC-Analysen.

Zudem konnten wir zeigen, dass sich BCL2A ($p < 0.0001$), ETS-2 ($p < 0.01$) und MMP-9 ($p < 0.001$) bereits zum 6h-Zeitpunkt nach Trauma eignen, um eine Outcome-Vorhersage für polytraumatisierte PatientInnen zu treffen (siehe Abbildung 4 (5.1)). Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass das in Monozyten herausgearbeitete Expressionsprofil gleichermaßen in Granulozyten detektierbar ist und ebenfalls signifikant mit den definierten klinischen Outcome-Parametern korreliert war.

5.2. Intrazelluläre mRNA-Expressionsmuster des STAT/SOCS Signalweges in Granulozyten beim Polytrauma

Brumann M, Matz M, Kusmenkov T, Stegmaier J, Biberthaler P, Kanz K-G, Mutschler W, Bogner V. Impact of STAT/SOCS mRNA Expression Levels after Major Injury; Mediators of Inflammation (Mediat Inflamm) 01/2014; 2014:749175.

Der STAT/SOCS Signalweg ist regulativ mit dem MAP-Kinase-Signalweg verbunden. Eine Schlüsselrolle in der Produktion und Regulation inflammatorischer Zytokine wird den sogenannten STAT/SOCS-Proteinen zugeschrieben. Durch sie wird das zelluläre Signalling von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen vermittelt und gesteuert. Bei den sogenannten *Signal Transducer and Activator of Transcription (STATs)* handelt es sich um Transkriptionsfaktoren inflammatorischer Zytokine. Zudem initiieren sie die Expression der sogenannten *Supressors of Cytokine Signalling (SOCSs)*. Die SOCS-Proteine wirken als negative Regulatoren des Zytokin-Signallings durch Hemmung der STAT-Proteine. Ein hochpotentes antiinflammatorisches Interleukin in der posttraumatischen Entzündungsreaktion ist Interleukin-10; hier konnten vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits einen Zusammenhang von IL-10 mit der Verletzungsschwere und dem Überleben nach Polytrauma aufzeigen (Bogner, Keil, et al., 2009).

Wir haben daher in dieser Arbeit die Expression des **STAT/SOCS Signalwegs in Granulozyten** Polytraumatisierter auf transkriptionaler Ebene mittels RT-PCR untersucht. Um die Funktion dieses pathophysiologisch bedeutenden Mechanismus nach schwerem Polytrauma zu evaluieren, untersuchten wir die mRNA-Expression von IL-10, STAT 3, SOCS 1 und SOCS 3 mittels quantitativer RT-PCR in Granulozyten polytraumatisierter PatientInnen.

Hier konnte unsere Arbeit zunächst zeigen, dass die IL-10 mRNA-Expression unmittelbar posttraumatisch bei allen PatientInnen signifikant anstieg. Die Einteilung der PatientInnen nach

Verletzungsschwere (NISS) ergab bei den schwerer verletzten PatientInnen eine höhere IL-10 mRNA-Expression. Diese Ergebnisse waren zum initialen Zeitpunkt (0h), 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma signifikant.

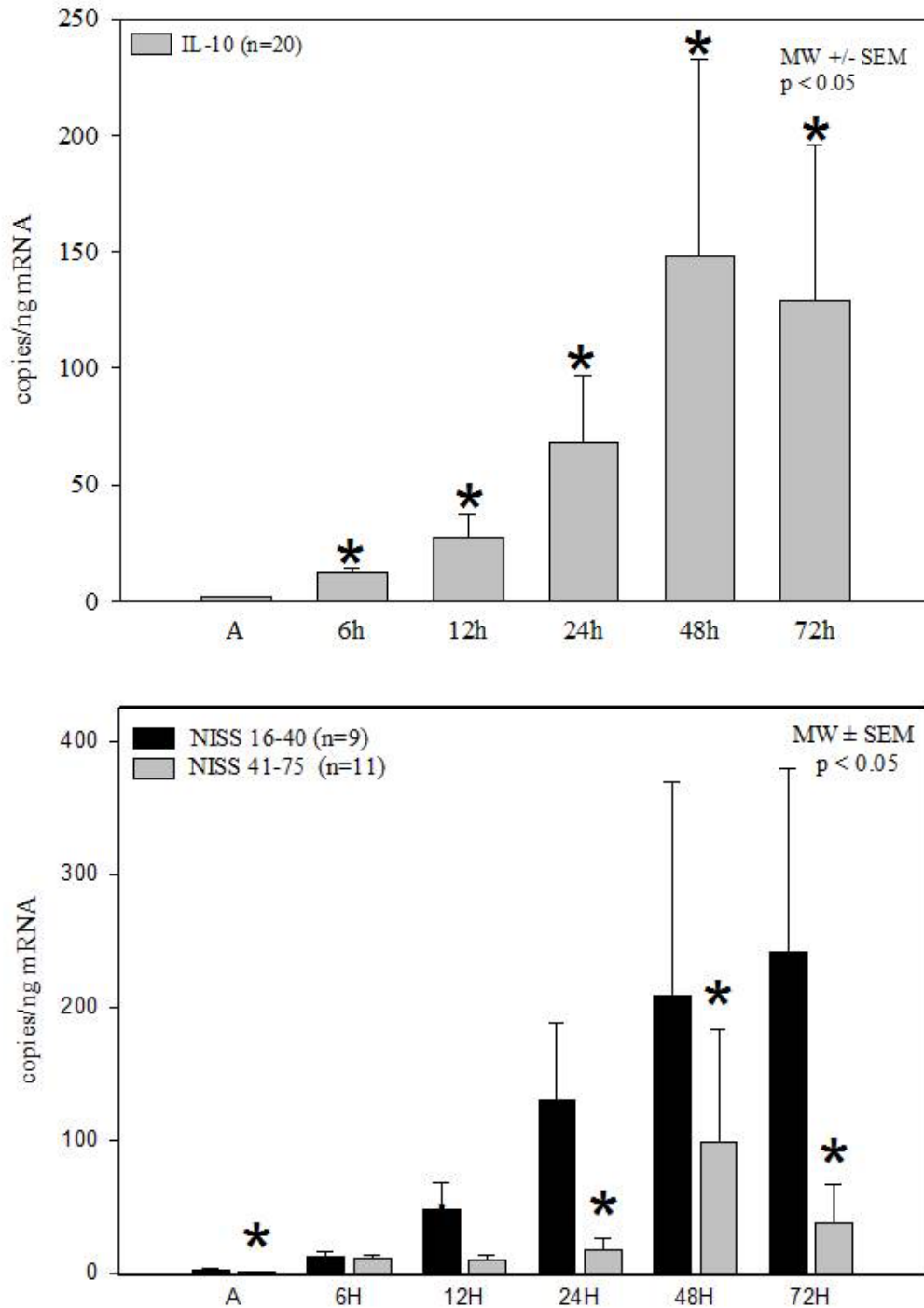


Abbildung 1a-b (5.2): Posttraumatische IL-10 mRNA-Expression a) Konzentrationsverlauf sowie b) in Abhängigkeit der Verletzungsschwere; * $p < 0.05$ (SNK-Test).

Die STAT 3 mRNA-Expression zeigte einen signifikanten Peak 6 h nach Trauma, während die SOCS 1 Expressionslevel im Zeitraum von 6 –72 h nach Trauma signifikant erniedrigt waren. PatientInnen, die das Trauma nicht überlebten, zeigten eine signifikant höhere SOCS 3 Expression als PatientInnen, die das Trauma überlebten.

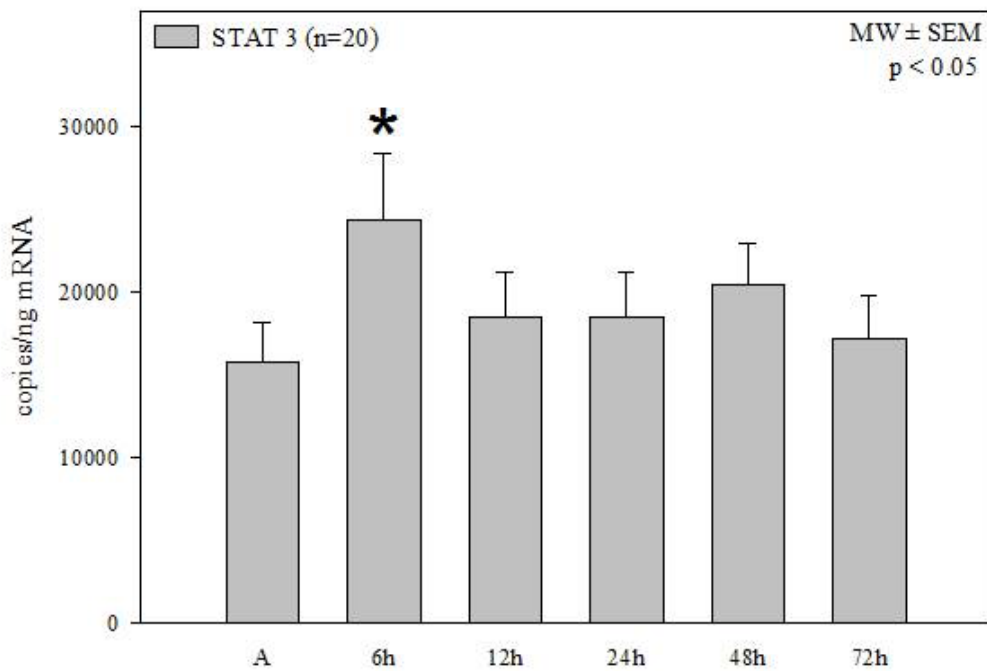


Abbildung 2 (5.2): Posttraumatische STAT 3 mRNA-Expression. Die STAT 3 mRNA-Expressionslevel zeigten einen signifikanten Anstieg im zeitlichen Verlauf mit einem Maximum bei 6h verglichen zum Aufnahmewert (0h); * $p < 0.05$ (SNK-Test).

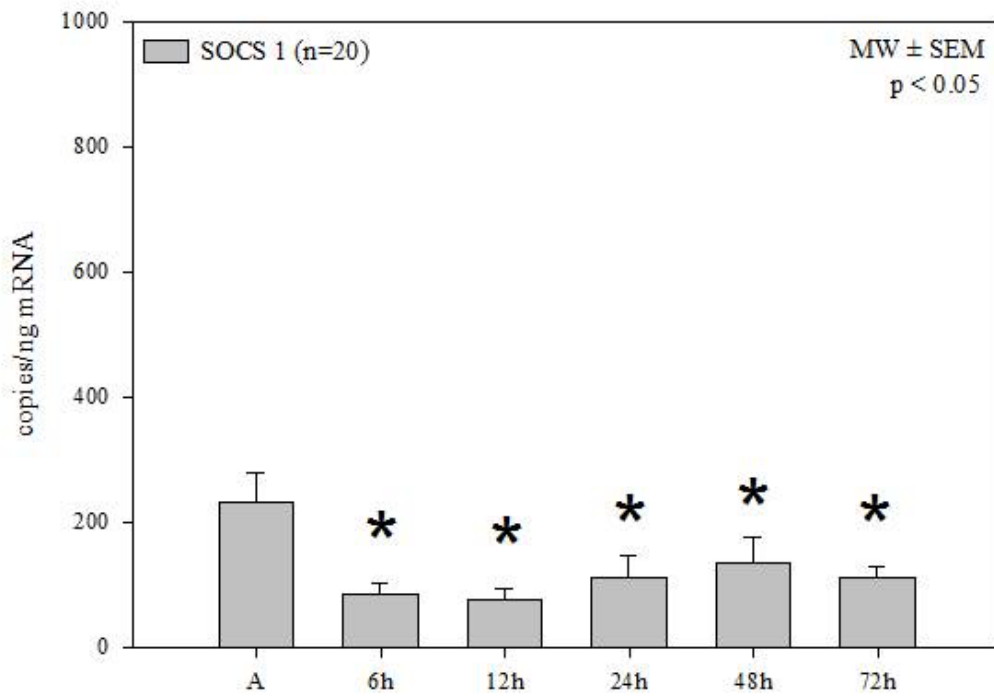


Abbildung 3 (5.2): Posttraumatische SOCS 1 mRNA-Expression; signifikanter Abfall der SOCS 1 Konzentration verglichen mit der 0h-Konzentration; * $p < 0.05$ (SNK-Test).

Die SOCS3-mRNA-Expression war initial etwa gleich, 6 Stunden nach Trauma in der Gruppe der Verstorbenen signifikant und zu den übrigen Messzeitpunkten deutlich höher als bei den Überlebenden ($p=0.042$).

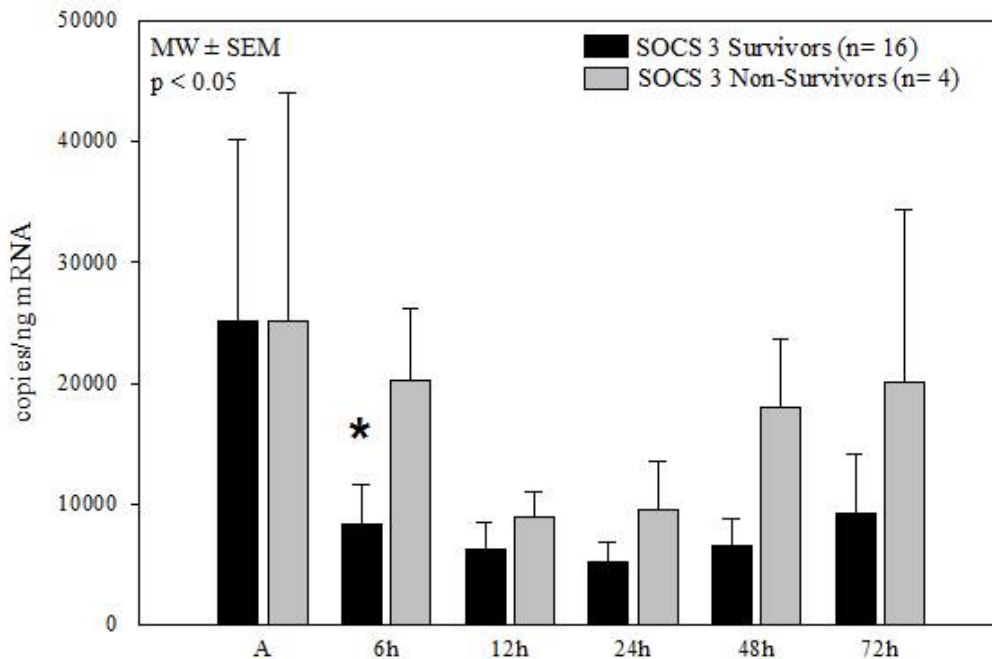


Abbildung 4 (5.2): Posttraumatische SOCS 3 mRNA-Konzentration; verstorbene PatientInnen zeigten einen signifikanten SOC3 Anstieg 6 h posttraumatisch; * $p < 0.05$ (SNK-Test).

Die Daten dieser Arbeit stellen die erstmalige Analyse der mRNA-Expression von IL-10, STAT3, SOCS1 und SOCS3 in Zellen des unspezifischen Immunsystems polytraumatisierter PatientInnen dar. Sie leisten einen wesentlichen Beitrag zum besseren Verständnis der STAT/SOCS-Feedbackregulierung des Zytokin-Signallings im Rahmen der posttraumatischen Immundefunktionsstörungen. Die posttraumatische Induktion der IL-10-mRNA sowie die des zugehörigen Transkriptionsfaktors STAT3 und die verminderte Expression der mRNA der Effektorproteine SOCS1 und SOCS3 im Gesamtkollektiv weisen deutlich auf eine überschießende posttraumatische Inflamationsreaktion hin. Die verringerte STAT3-Expression bei gleichzeitig erhöhter IL-10-mRNA-Expression im Kollektiv der schwerstverletzten PatientInnen - scheinbar induziert durch posttraumatische Veränderungen des JAK/STAT Signaltransduktionsweges - spiegelt diese Dysbalance der immunologischen Antwort wider. Die vermehrte Expression von SOCS1- und SOCS3-mRNA bei verstorbenen PatientInnen kann einen Hinweis auf eine posttraumatische Dysregulation des Immunsystems mit vermehrter Aktivierung der Feedbackhemmung des

Signallings inflammatorischer Zytokine geben. Um die biologische Relevanz dieser Ergebnisse zu überprüfen und eine mögliche Schlüsselrolle in der posttraumatischen Entzündungsregulation nachzuweisen, sind aus unserer Sicht weitere Forschungen auf Proteinebene nötig.

5.3. Gezielte Serumanalyse ausgewählter Biomarker nach Polytrauma

Brumann M, Kusmenkov T, Ney L, Kanz K-G, Leidel BA, Biberthaler P, Mutschler W, Bogner V. Concentration kinetics of serum MMP-9 and TIMP-1 after blunt multiple injuries in the early posttraumatic period. *Mediators of Inflammation (Mediat Inflamm)*. 04/2012; 2012:435463.

Im Rahmen der Microarray Voruntersuchungen war die mRNA-Expression der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) sowie dessen Inhibitor, TIMP-1 in Monozyten polytraumatisierter PatientInnen in Abhängigkeit des Outcomes hoch signifikant unterschiedlich. Matrixmetalloproteinasen greifen auf unterschiedliche Weise in die Regulierung der Inflammationsantwort ein, indem sie beispielsweise die transepitheliale Migration und Akkumulation von Leukozyten ermöglichen sowie Einfluss auf die Aktivierung und Kompartimentierung von Chemokinen nehmen. MMP-9 ist eine Typ-VI-Kollagenase, wird in den tertiären Granulomen der polymorphnukleären Zellen (PMN) gespeichert und von einer Vielzahl von Zellen wie beispielsweise Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Eosinophilen und Makrophagen sezerniert. Betrachtet man die Gesamtheit aller MMP, so scheint MMP-9 hinsichtlich der Fähigkeit, die Chemokinsignalwege im Rahmen der Inflammation zu beeinflussen, der wichtigste Vertreter seiner Familie zu sein. Das Wirkungsspektrum reicht hierbei von der Induktion der Zytokinaktivität bis hin zu einer kompletten Zytokindegradation (Gill & Parks, 2008). TIMP-1 ist der natürliche Inhibitor von MMP-9. Hauptaufgabe der TIMP besteht in der Regulation der MMP 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 (Parks et al., 2004). Zur Untersuchung, ob diese Information auf Genomebene auch in aktives Protein umgesetzt und im Anschluss in den Blutkreislauf des Patienten/der Patientin sezerniert wird, wurden **beide Proteine** mittels ELISA im **Serum** bestimmt.

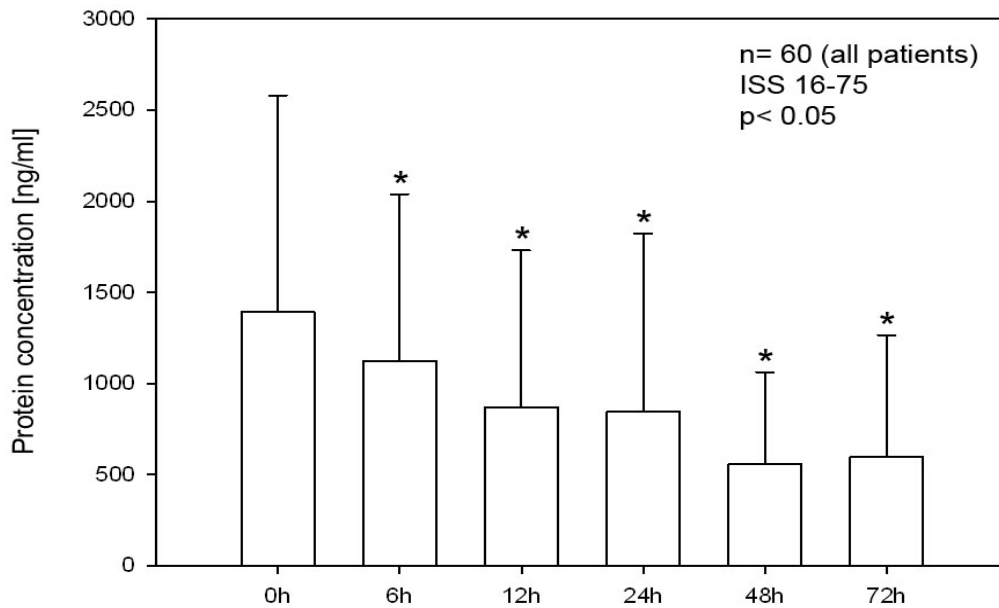


Abbildung 1 (5.3): Im posttraumatischen Verlauf kommt es bei allen PatientInnen zu einem signifikanten MMP-9 Abfall verglichen mit dem Aufnahmezeitpunkt.

Hierbei konnten wir zeigen, dass eine relevante Umsetzung des in Monozyten feststellbaren mRNA-Signals in aktives Protein erfolgt und im Serum als „charakteristische Dynamik“ nachweisbar ist.

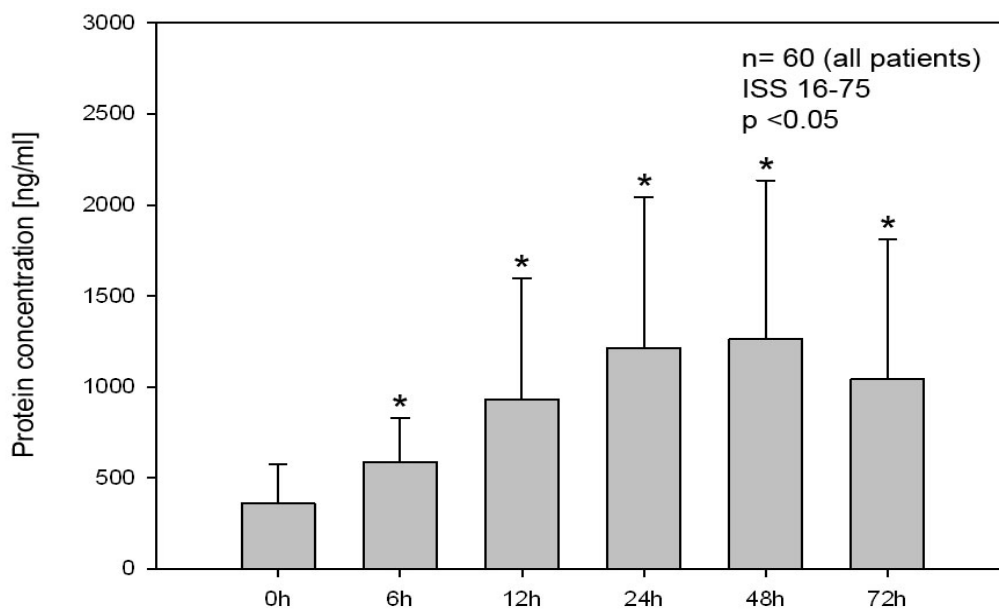


Abbildung 2 (5.3): Verglichen mit den 0h-Zeitpunkt kommt es bei allen PatientInnen zu einem signifikanten TIMP-1 Anstieg.

Es zeigte sich ein gegensätzliches Konzentrationsmuster der beiden Proteine, welches durch eine signifikante Abnahme der MMP-9-Konzentration und gleichzeitige signifikante Zunahme des Inhibitors TIMP-1 im frühen posttraumatischen Verlauf gekennzeichnet ist.

5.4. Serumanalyse von MMP-9 und TIMP-1 in Abhängigkeit klinischer Parameter nach Polytrauma

Braunstein M, Kusmenkov T, Böcker W, Bogner-Flatz V. Influence of massive blood transfusion and traumatic brain injury on TIMP-1 and MMP-9 serum levels in polytraumatized patients, Unfallchirurg. 2019 Dec.

In Zusammenschau der Ergebnisse unserer Vorarbeiten und mit dem Wissen um die Bedeutung von MMP-9 und TIMP-1 im Rahmen der Inflammation war die Untersuchung dieser beiden ausgewählten Parameter in Abhängigkeit zuvor identifizierter klinischer Parameter aus unserer Sicht der konsequente Folgeschritt.

In dieser Folgearbeit führten wir daher eine Analyse der Serumproteinmarker **MMP-9 und TIMP-1** in Abhängigkeit des Outcomes, der Verletzungsschwere, der Entwicklung eines Multiorganversagens, einer durchgeführten Massentransfusion (MT) sowie eines Schädel-Hirn-Traumas (SHT) durch. Unsere Ergebnisse konnte zeigen, dass eine Massentransfusion (>10EKs/24h) mit einer signifikant höheren TIMP-1 **Serumkonzentration** einherging. Die von uns vorgestellten Ergebnisse weisen erstmals einen signifikanten Zusammenhang zwischen der TIMP-1-Serumkonzentration polytraumatisierter PatientInnen und einem posttraumatisch erlittenen hämorrhagischen Schock mit konsekutiver Massentransfusion auf. Dies scheint Ausdruck einer massiv überschießenden Inflammationsreaktion zu sein und stellt so einen wesentlichen Faktor bei der Pathogenese der schweren posttraumatischen Immundysfunktion dieses Kollektivs dar. Dies ist insbesondere deshalb beachtenswert, da eine Erhöhung der TIMP-1-Konzentration bei vergleichbaren Krankheitsbildern mit einer schlechteren Prognose einherging. So ist ein signifikanter Anstieg der TIMP-1-Konzentration bei septischen Patienten oder bei schwerer systemischer Inflammationsreaktion im Rahmen einer Verbrennung mit einer erhöhten Mortalität assoziiert

(Hästbacka et al., 2014; Lorente et al., 2009). Da die genannten Krankheitsbilder hinsichtlich ihrer pathophysiologischen Hyperinflammation eng mit dem Polytrauma verwandt sind, können wir davon ausgehen, dass die erhöhte Konzentration von TIMP-1 im Serum massentransfundierter PatientInnen ebenfalls als Hinweis einer deutlich schwereren Inflammationsreaktion gedeutet werden kann. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Sepsisstudie von Lorente et al. zeigt auch unsere Arbeit eine signifikant erhöhte TIMP-1-Konzentration bei gleichzeitig erniedrigter MMP-9-Konzentration. Ein Erklärungsansatz für die Ergebnisse der Sepsisstudie sowie unserer Arbeit könnte in den Konzentrationsänderungen von IL-10 liegen. Das antiinflammatorische Zytokin ist fundamental in die Pathogenese der schweren Inflammationsreaktion involviert und induziert gleichzeitig die Expression von TIMP-1, während es die MMP-Expression in Monozyten reduziert (Mtairag et al., 2001). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte auch unsere Arbeitsgruppe in einer vorangegangenen Studie bereits nachweisen, dass die IL-10-Serum-Konzentrationen bei Polytraumatisierten mit hämorrhagischem Schock und konsekutiver MT signifikant erhöht waren (Bogner, Baker, et al., 2009). Limitierend ist anzumerken, dass eine Differenzierung zwischen dem vorausgehenden hämorrhagischen Schock und der Massivtransfusion als Trigger der posttraumatischen Immunantwort in diesem Setting nicht sicher gelingen kann.

Gleichzeitig wiesen PatientInnen, die im Rahmen des Polytraumas eine intrakranielle Traumafolge erlitten, einen signifikanten MMP-9-Anstieg auf. Dies spiegelt die zentrale Rolle der Matrixmetalloproteinase in der Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas beim Polytrauma wider. Durch proinflammatorische Zytokine kommt es im posttraumatischen Verlauf zu einer Induktion von MMP-9 in Astrozyten und gleichzeitig zu einer traumaassoziierten Aktivierung der Mikroglia, die zu einer vermehrten Freisetzung von MMP-9 führt. In einer aktuellen Arbeit zu diesem Thema konnten Simon et al. MMP-9 - unabhängig von extrazerebralen Verletzungen - als Outcome-klassifizierenden plasmatischen Biomarker nach schwerem SHT (GCS 3–8 Punkte) identifizieren (Simon et al., 2017). Auch unsere Daten spiegeln eine Schlüsselrolle von MMP-9 in der frühen posttraumatischen Phase

bei Polytraumatisierten mit begleitendem SHT wider. Unsere Daten zeigen sowohl auf mRNA-Ebene in Granulozyten als auch auf Serumebene eine erhöhte MMP-9-Konzentration bei Patienten mit SHT.

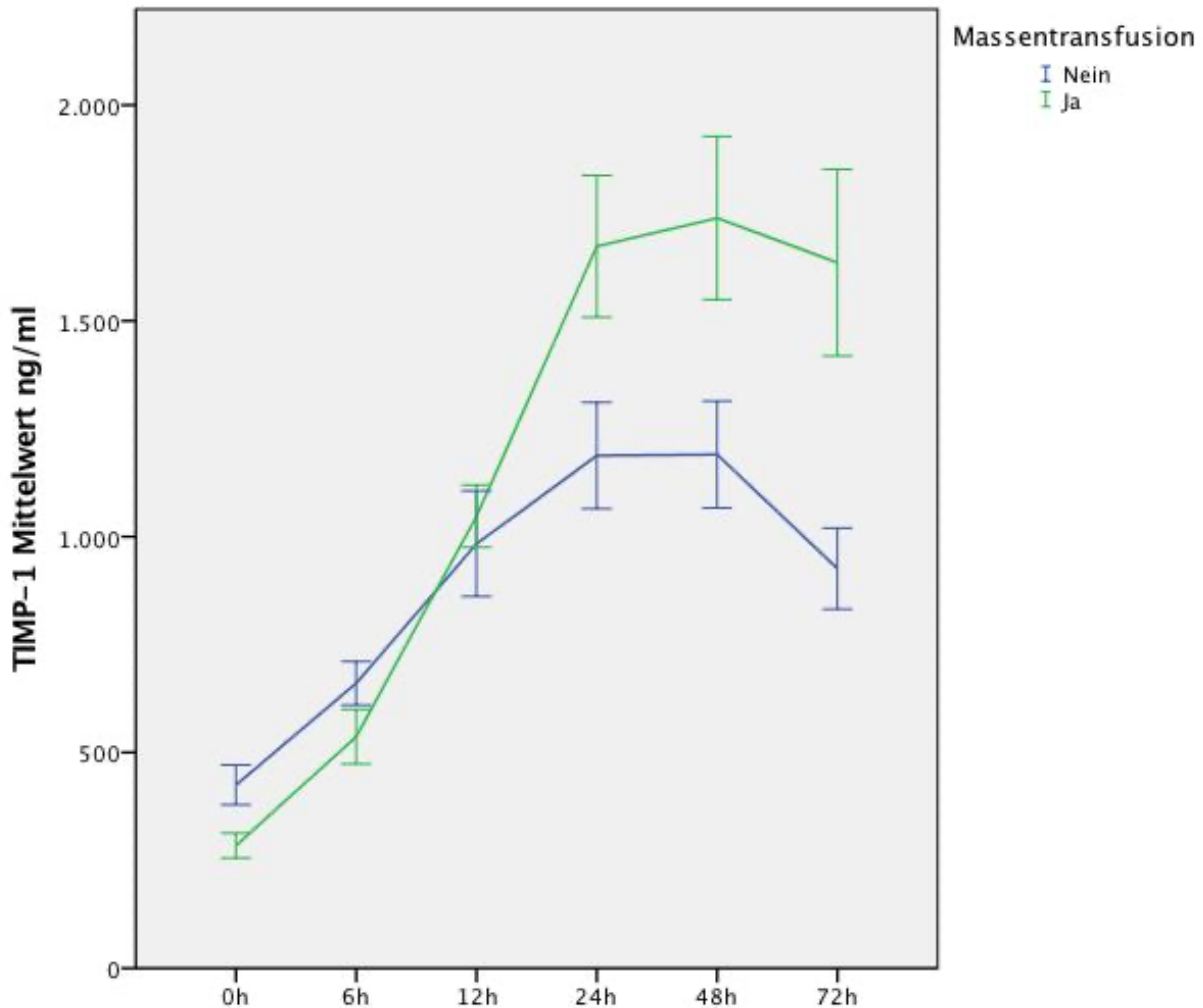


Abbildung 1 (5.4): Verlauf der TIMP-1 Serumkonzentrationen in Abhängigkeit des klinischen Parameters "Massentransfusion"; Hochsignifikanter posttraumatische TIMP-1 Konzentrations-Dynamik innerhalb der ersten 72h nach Trauma ($p < 0,001$) in beiden Gruppen. Die Multivariate-Analyse zeigte einen signifikanten Zusammenhang der TIMP-1-Konzentrationsverläufe und den unabhängigen Variablen "Zeit" und "MT" (MT: $n=21$; ØMT: $n=38$; MANOVA; $p=0,003$). Die Post-hoc Testung der einzelnen Zeitpunkte mittels Mann-Whitney-U-Test zeigte signifikante höhere TIMP-1 Werte in der MT-Gruppe für 12h ($p=0,015$), 24h ($p=0,007$), 48h ($p=0,036$) sowie 72h nach Trauma ($p=0,001$).

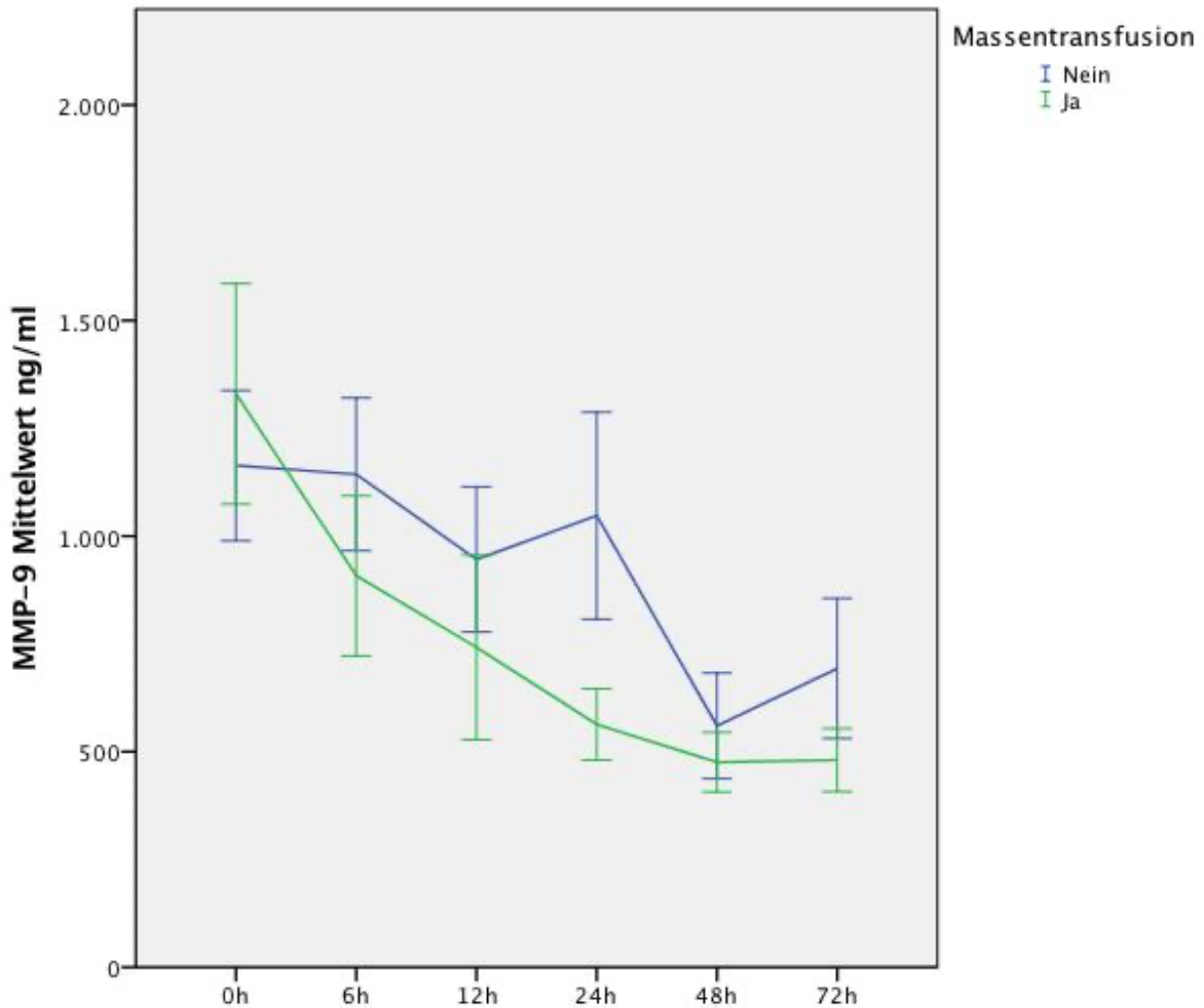


Abbildung 2 (5.4): Verlauf der MMP-9 Serumkonzentrationen in Abhängigkeit des klinischen Parameters "Massentransfusion"; Hochsignifikante posttraumatische MMP-9 Konzentrations-Dynamik innerhalb der ersten 72h nach Trauma ($p < 0.001$) in beiden Gruppen. Die Multivariate-Analyse zeigte keinen signifikanten Zusammenhang der MMP-9 Konzentrationsverläufe und den unabhängigen Variablen "Zeit" und "MT" (MT: $n=21$; ØMT: $n=38$; MANOVA; $p=0.551$).

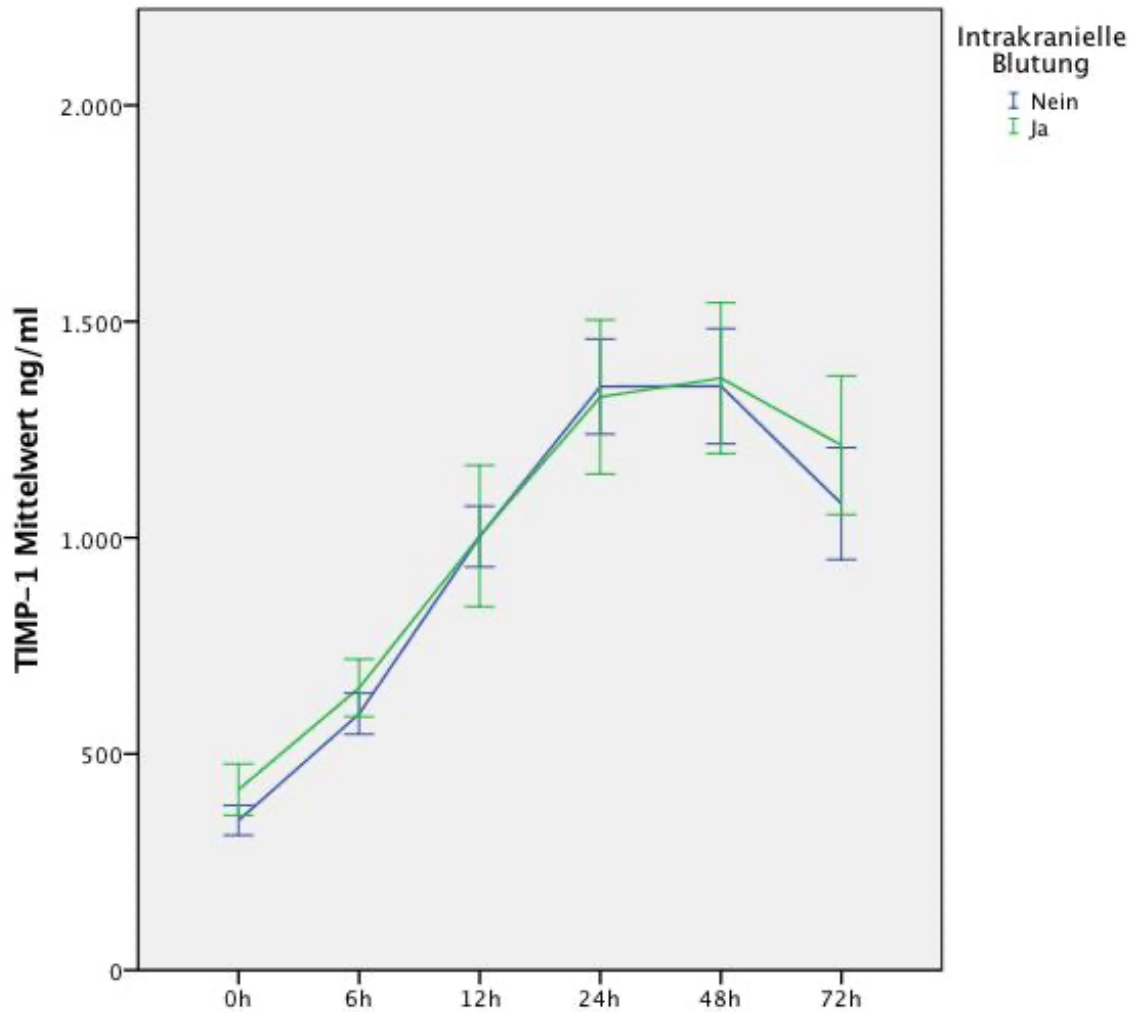


Abbildung 3 (5.4): Verlauf der TIMP-1 Serumkonzentrationen in Abhängigkeit des klinischen Parameters "SHT"; Hochsignifikante posttraumatische TIMP-1 Konzentrations-Dynamik innerhalb der ersten 72h nach Trauma (p -Wert < 0.001). Die Multivariate-Analyse der unabhängigen Variablen "Zeit" und "Schädel-Hirn-Trauma" zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patientengruppen (SHT: $n=28$; \emptyset SHT: $n=32$; MANOVA: $p=0.976$).

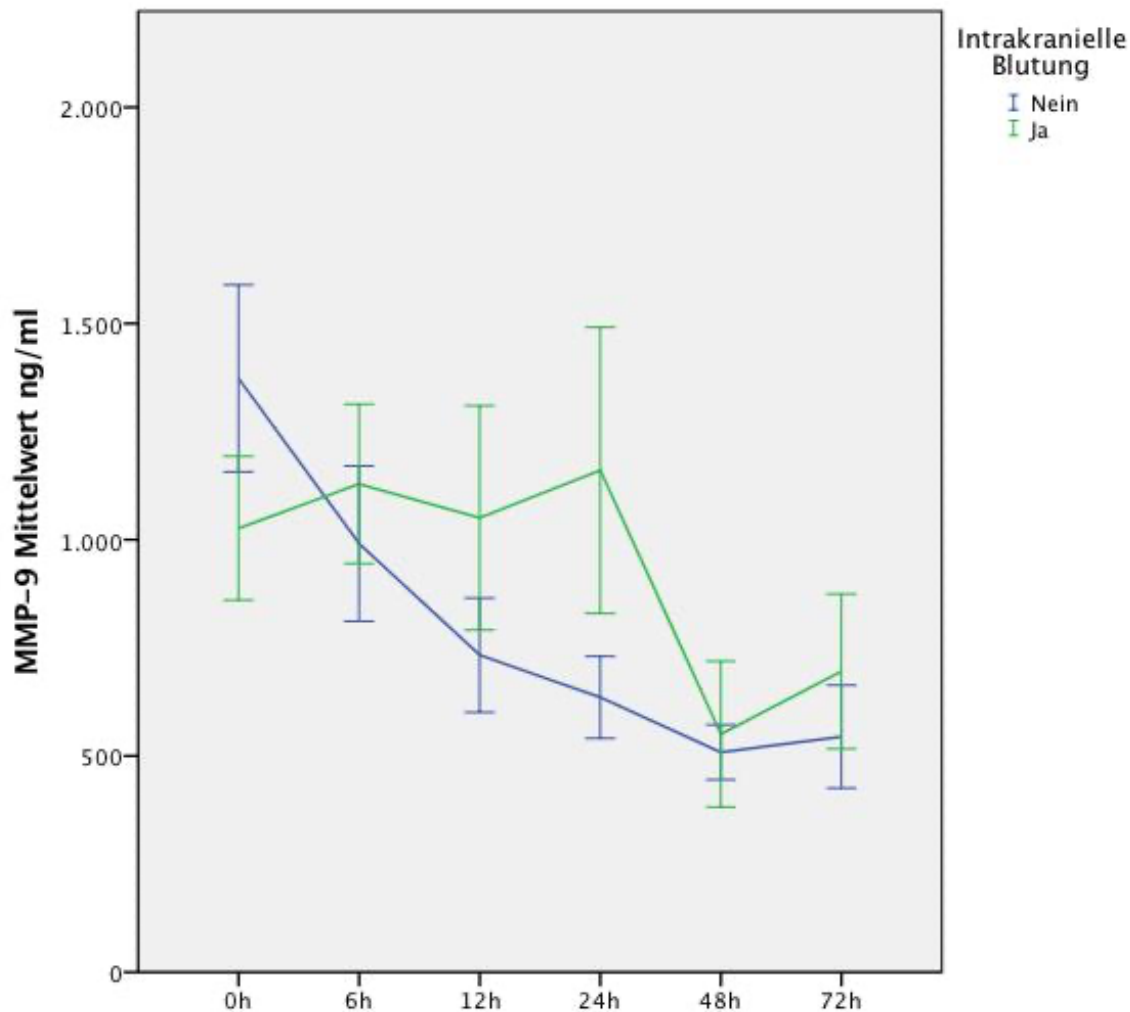


Abbildung 4 (5.4): Verlauf der MMP-9 Serumkonzentrationen in Abhängigkeit des klinischen Parameters „SHT“; Hochsignifikante posttraumatische MMP-9 Konzentrations-Dynamik innerhalb der ersten 72h nach Trauma (p -Wert <0.001). Das lineare Regressionsmodell mit quadratischer Funktion zeigt einen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen (SHT: $n=28$; \emptyset SHT: $n=32$; MANOVA: $p=0.049$).

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen, die potenzielle Biomarker sowohl auf transkriptionaler Ebene (mRNA) und im weiteren Verlauf auch auf Serumebene Outcome-assoziiert darstellen konnten, sind vielversprechend, um in weiterer Zukunft über ein „Serummonitoring“ besonders gefährdete PatientInnen frühzeitig zu erkennen und so über entsprechende Interventionen die Folgen eines schweren Verlaufs abzumildern. Die tatsächliche alltägliche klinische Relevanz und Umsetzbarkeit müssen Folgearbeiten im großen Kollektiv zeigen.

5.5. Analyse der mRNA-Expressionsprofile nach kardiopulmonaler Reanimation

Braunstein M, Williamson M, Kusmenkov T, Landes J, Kanz KG, Biberthaler P, Böcker W, Bogner V. Significant mRNA cytokine changes immediately after initiation of cardiopulmonary resuscitation; Mediators of Inflammation; Dec 2017.

Zur Analyse der initialen intrazellulären Steuerungsmechanismen im Rahmen des Postreanimationssyndroms erfolgte in der durchgeführten Arbeit die Untersuchung der **Vollblut-Paxgene mRNA-Expressionsmuster** definierter Zytokine (TNF-alpha, IL-8, IL-10 und IL-1RA) in der unmittelbaren „Postreanimationsphase“. Mit dieser Arbeit konnte in einem ersten Schritt gezeigt werden, dass eine Quantifizierung der mRNA- Expression für immunologisch relevante Zytokine mit dem PAXgene® Blood RNA System aus Vollblut zum einen möglich ist und zum anderen auch unter schwierigen präklinischen Blutentnahmebedingungen zuverlässig funktioniert. In einem zweiten Schritt konnten durch die quantitative Analyse der mRNA-Expressionsmuster von definierten pro- und antiinflammatorischen Zytokinen neue Erkenntnisse über die initialen Aktivierungsvorgänge nach Ischämie und Reperfusion gewonnen werden. Anhand der Daten aus der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass spezifische pro- und antiinflammatorische Parameter bereits frühzeitig nach Wiedererlangen eines Spontankreislaufes signifikant verändert sind. Durch eine serielle Untersuchung der mRNA-Expressionsmuster konnte es uns gelingen, den zeitlichen Verlauf der relevanten Zytokine TNF-alpha, IL-8, IL-10 und IL-1RA in der frühen Phase nach erfolgreicher Reanimation auf Genomebene darzustellen. Selbstverständlich handelt es sich hierbei nur um einen sehr kleinen Ausschnitt sehr komplexer und bisher nicht vollständig verstandener pathophysiologischer Vorgänge im Rahmen des Post-Resuscitation-Syndroms. Allerdings kann die hier dargestellte Expressionsaktivität definierter Zytokine möglicherweise einen Beitrag zum Verständnis dieser komplizierten immunologischen Prozesse liefern.

Im Detail konnten wir zeigen, dass es im kurzfristigen Verlauf zu einem signifikanten Abfall der proinflammatorischen Zytokine (TNF-alpha (24h), IL-8 (12-72h)) kommt. Zeitgleich dazu kommt es zu einem signifikanten Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins IL-1RA (6h, 12h, 48h). PatientInnen, die im weiteren Verlauf verstarben, zeigten signifikant höhere IL-8 mRNA-Konzentrationen bei 0h und signifikante IL-10-Konzentrationen nach 48h und 72h.

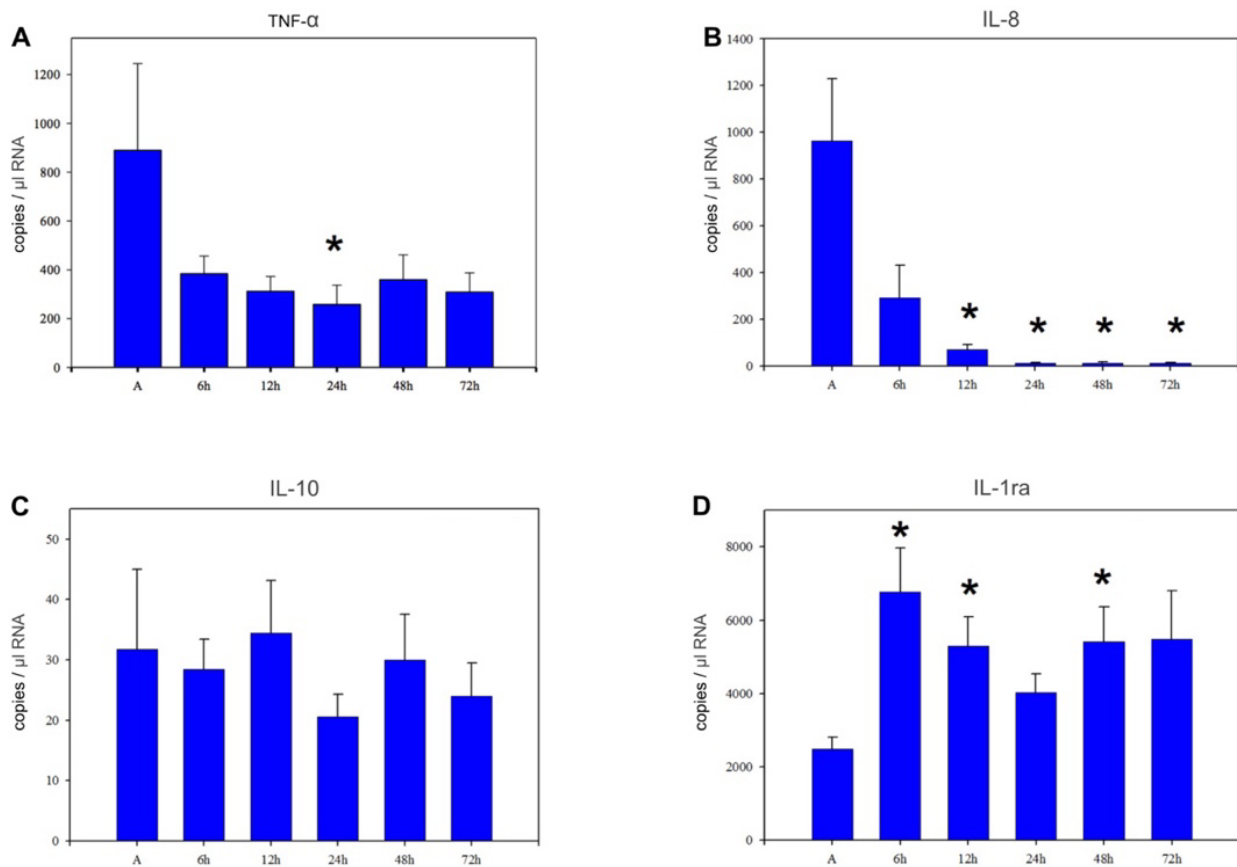


Abbildung 1 (5.5): Vollblut-RNA Expression von TNF- α , IL-8 IL-10 und IL-1RA im zeitlichen Verlauf vs. Abnahmezeitpunkt nach ROSC. Kruskal-Wallis-Test * $p < 0.05$ (MW \pm SEM).

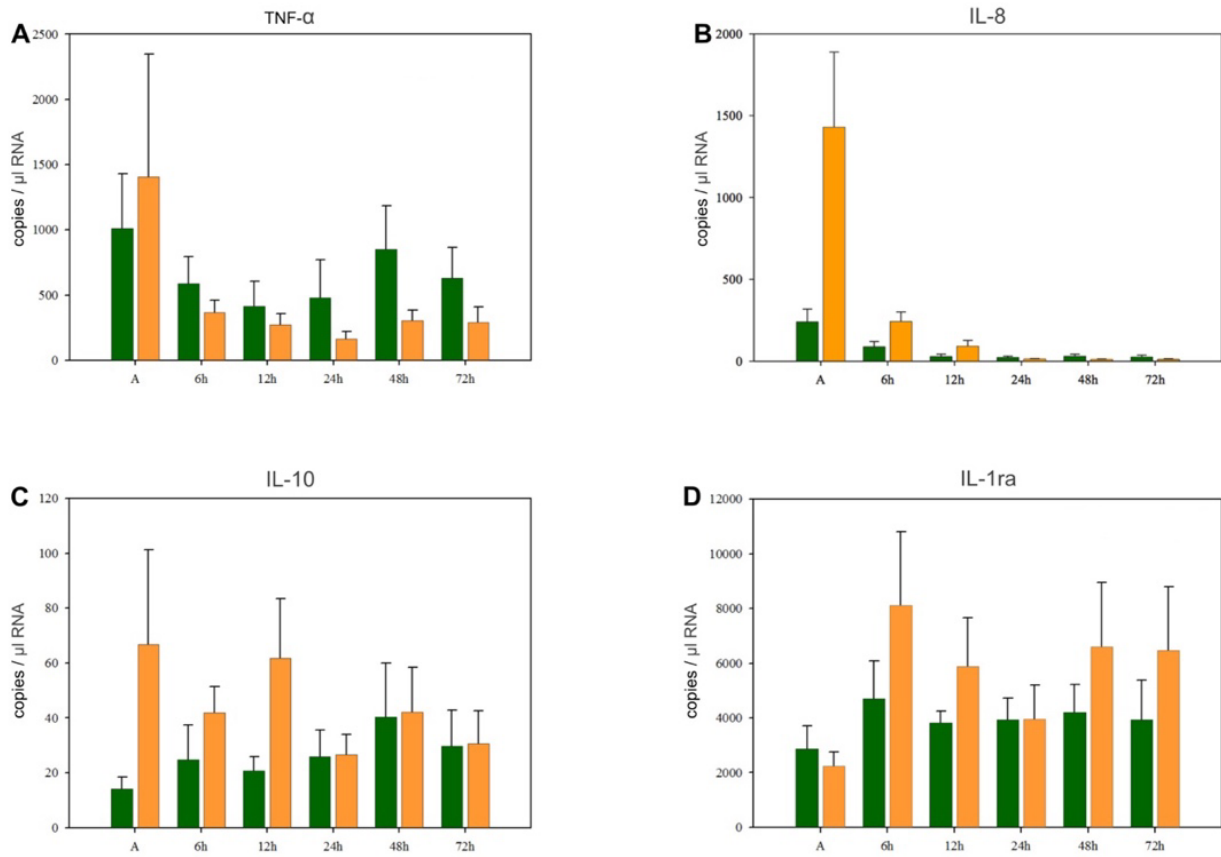


Abbildung 2 (5.5): Vollblut-RNA Expression von TNF- α , IL-8, IL-10 und IL-1RA. Vergleich der Gruppen MOF < 4 vs. MOF \geq 4; Kruskal-Wallis-Test * $p < 0.05$ (MW \pm SEM).

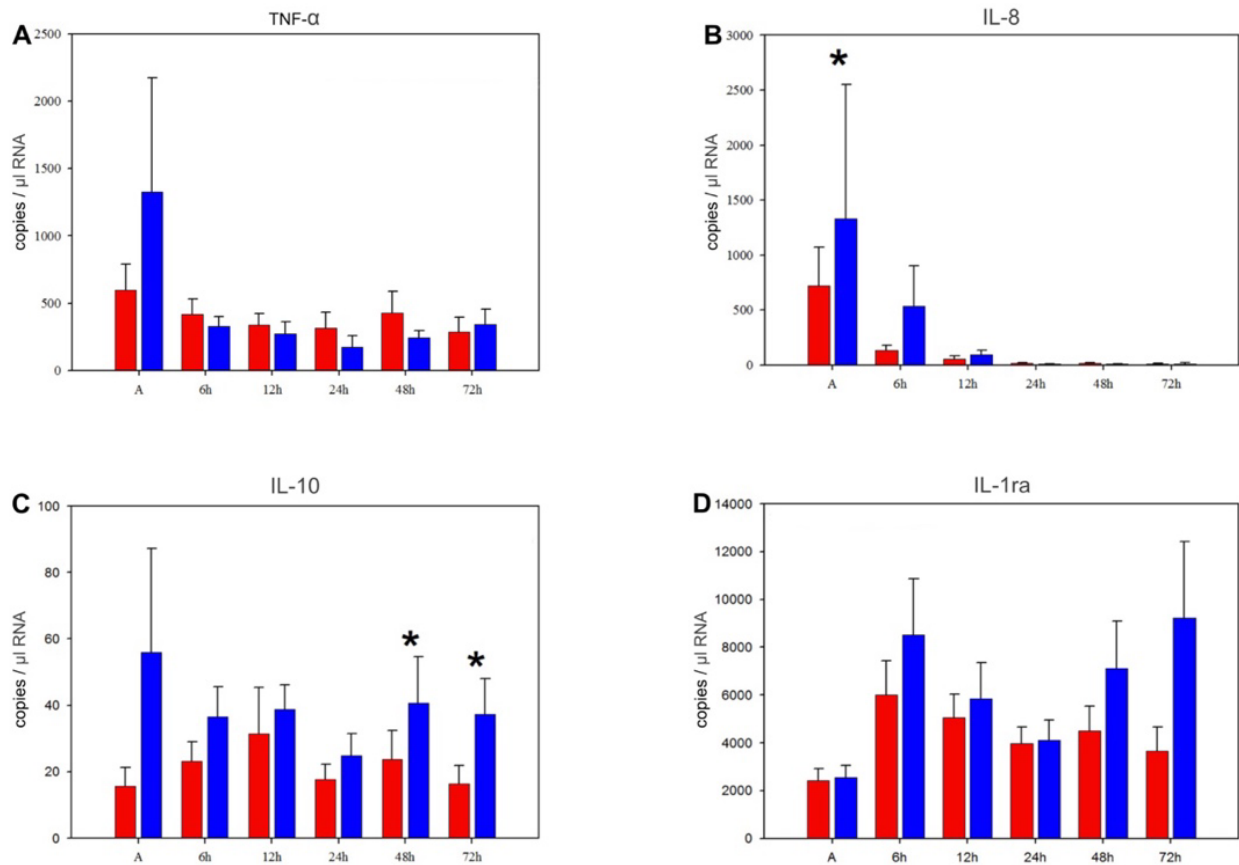


Abbildung 3 (5.5): Vollblut-RNA Expression von TNF- α , IL-8, IL-10 und IL-1RA von überlebenden vs. verstorbenen Patienten; Kruskal-Wallis-Test * $p < 0.05$ (MW \pm SEM).

Zusammenfassend bieten unsere Daten - insbesondere durch die präklinische 0h-Abnahme - die Möglichkeit, die initialen Veränderungen auf mRNA-Expressionsebenen nach kardiopulmonaler Reanimation sichtbar zu machen und so zu zeigen, wie schnell sich die Expressionsmuster auf Genomebenen bereits signifikant ändern und auch schon Unterschiede hinsichtlich des klinischen Verlaufs sichtbar machen können.

5.6. Untersuchung der Serumkonzentrationen von Selen und Selenoprotein P nach Polytrauma

Braunstein M, Kusmenkov T, Zuck C, Angstwurm M, Becker NP, Böcker W, Schomburg L, Bogner-Flatz V. Selenium and Selenoprotein P Deficiency correlates with Complications and Adverse Outcome After Major Trauma; Shock, 2020 Jan.

Vorarbeiten verschiedener Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass PatientInnen, die ein SIRS oder eine Sepsis entwickelten, einen Abfall des Selenspiegels sowie der Aktivität der abhängigen Glutathionperoxidase (GSH-Px) im Plasma vorweisen und von einer adjuvanten hochdosierten Selensubstitution profitieren (Castro, 2007). Selenabhängige Enzyme sowie Selenoprotein P spielen eine bedeutende Rolle in immunologischen und endothelialen Regulationsprozessen der Zellfunktion. Hierbei scheint vor allem die Aktivität selenabhängiger Enzyme von entscheidender Bedeutung zu sein (Angstwurm & Gaertner, 2006). Auf molekularer Ebene wirkt Selen beispielsweise aktivierend auf den redoxsensitiven Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator-Protein-1), welcher - wie oben bereits aufgeführt - ein zentraler Regulator der posttraumatischen inflammatorischen Immunantwort ist. Überwiegt die AP-1-Aktivität in mononukleären Zellen die Aktivierung seines Gegenspielers NF- κ B, so führt dies zu einer Abmilderung der überschießenden proinflammatorischen Reaktion nach Trauma.

Entscheidend war es aus unserer Sicht nun zu untersuchen, ob polytraumatisierte PatientInnen in der frühen posttraumatischen Phase bereits einen Abfall des **Selenspiegels und der abhängigen Enzyme im Serum** zeigen und ob sich dieser mit den erhobenen klinischen Parametern (MOF-Score, APACHE II Score (Acute Physiology and Chronic Health Disease Classification System II) und 90-Tage-Überleben) korrelieren lässt. Hier konnten wir zunächst zeigen, dass sowohl das Serumselen als auch die Serumkonzentrationen von Selenoprotein P polytraumatisierter PatientInnen signifikant niedriger war als im gesunden europäischen Vergleichskollektiv. Dieses Selen/Selenoprotein P

Defizit konnte in unserem Kollektiv bereits unmittelbar nach Trauma bei der initialen Messung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 1 (5.6)).

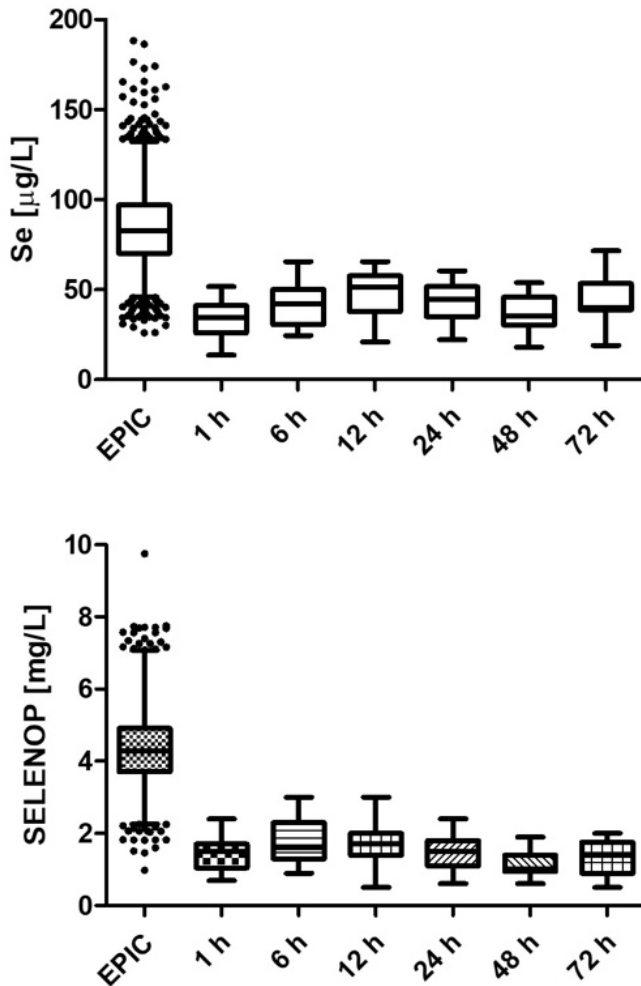


Abbildung 1 (5.6): Normalverteilung von Selen und Selenoprotein P im Vergleichskollektiv sowie zeitlicher Verlauf der Serum-Selenkonzentrationen and Selenoprotein P Konzentration polytraumatisierter PatientInnen in der frühen posttraumatischen Phase.

Die lineare Regressionsanalyse von Selen und Selenoprotein P zeigt zu allen Abnahmezeitpunkten eine enge Korrelation der beiden Parameter. Diese enge Korrelation besteht nur bei einem relevanten Selen-Defizit, welches wir in unserem Kollektiv nach Polytrauma zu allen Zeitpunkten nachweisen konnten – mit einer besonders engen Korrelation zum 6h-Zeitpunkt (siehe Abbildung 2 (5.6)).

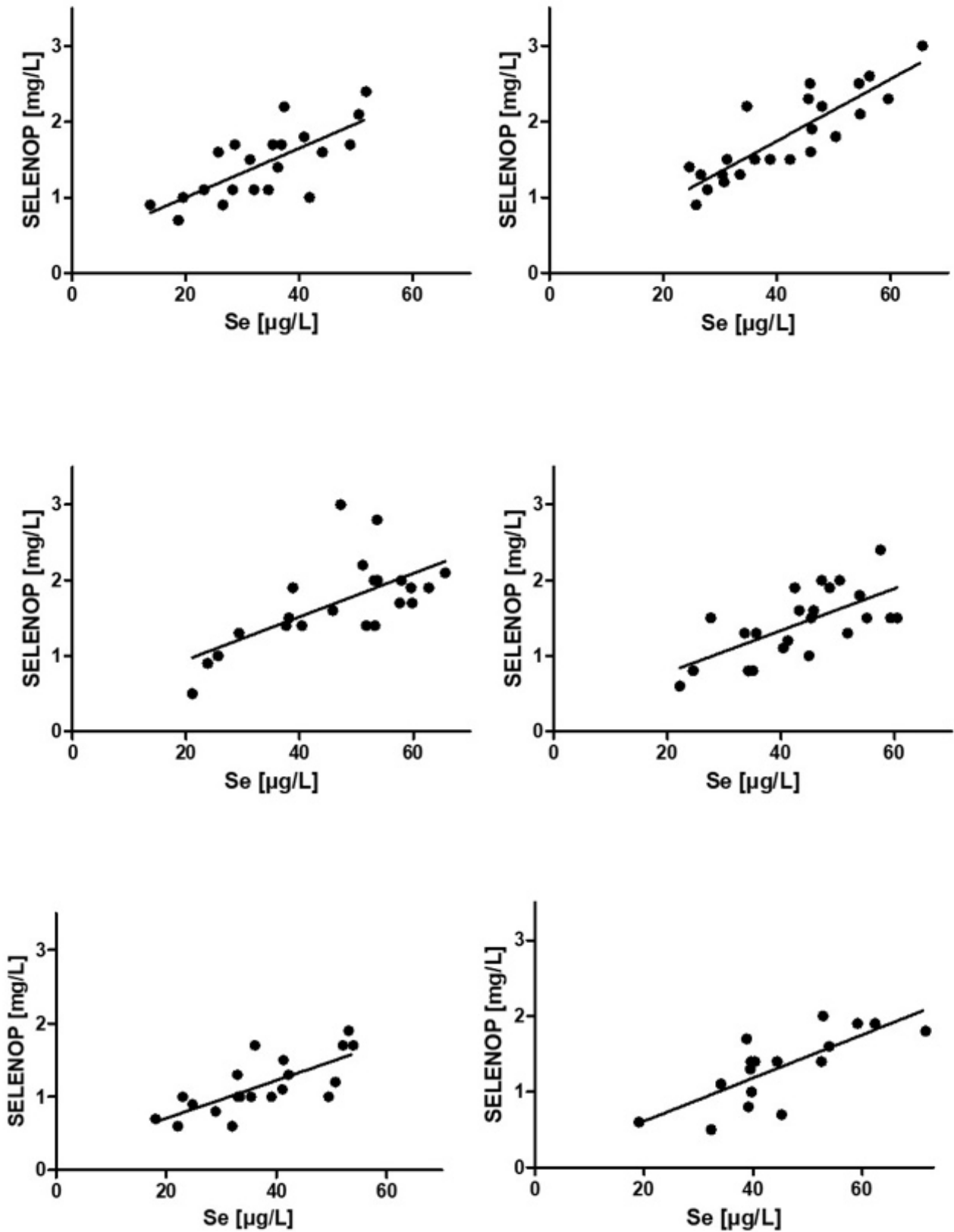


Abbildung 2 (5.6): Lineare Regression von Selen und Selenoprotein P: (A) 0h, B) 6h, C) 12h, D) 24h, E) 48h, F) 72h.

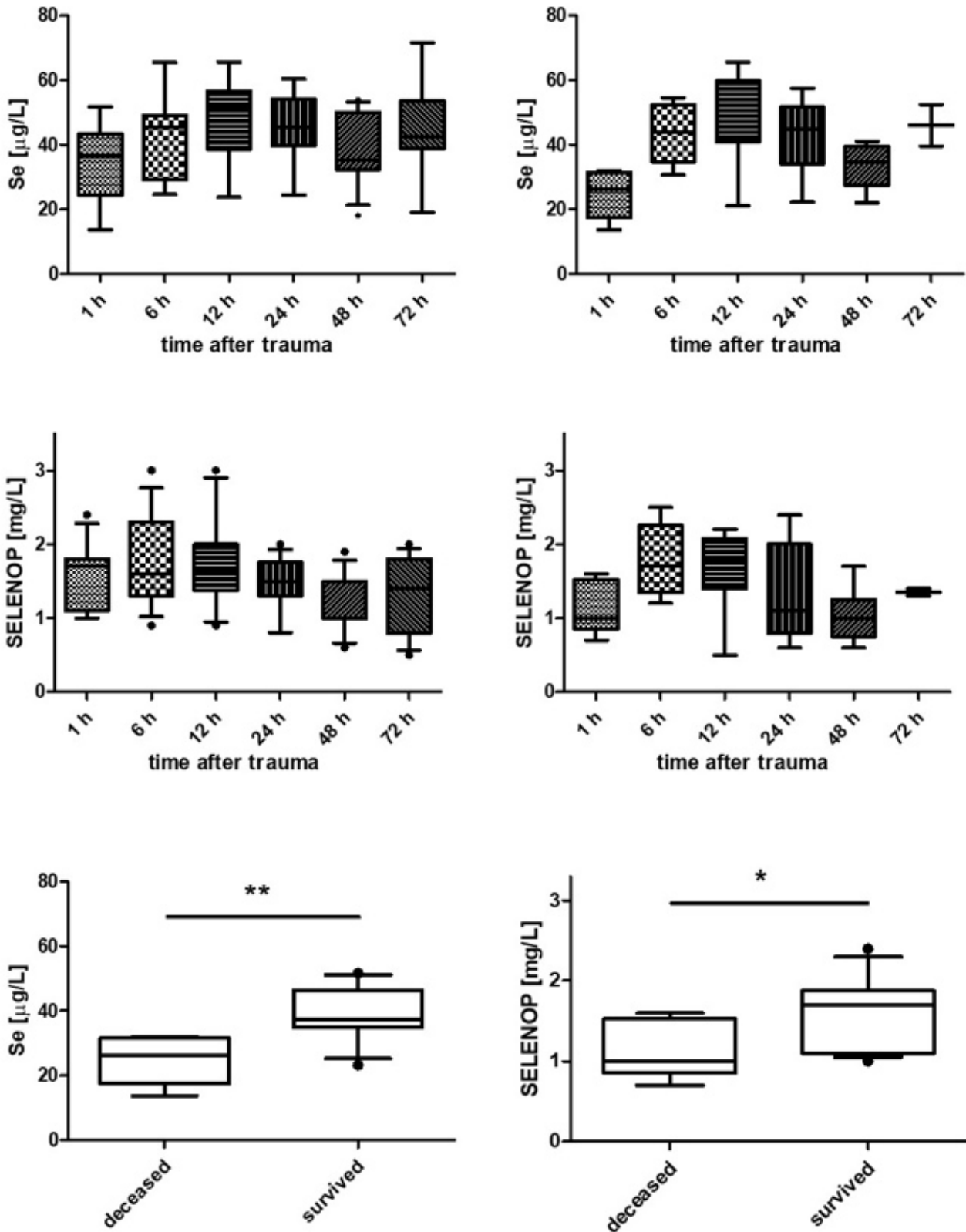


Abbildung 3 (5.6): 90-Tage Überleben, Mann-Whitney-Rank Sum Test: Selen zu allen Zeitpunkten: A) Überleben, B) Versterben; Selenoprotein P zu allen Zeitpunkten: C) Überleben, D) Versterben; Initiale Selen (E) und Selenoprotein P (F) Konzentrationen zum 0h-Zeitpunkt

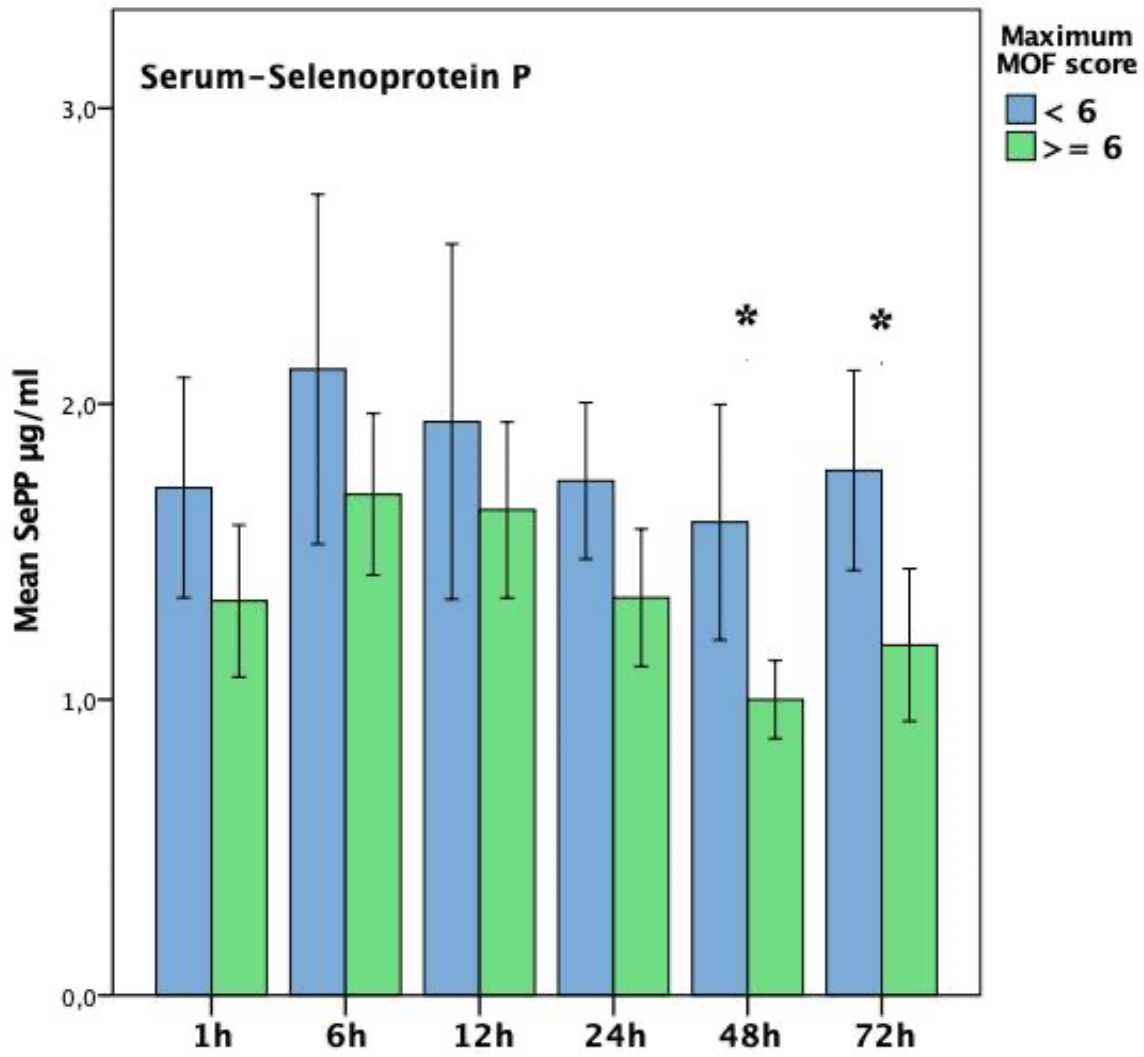


Abbildung 4 (5.6): MANOVA Analyse and T-Test für Selenoprotein P abhängig von der Entwicklung eines Multiorganversagens (MOF-Score).

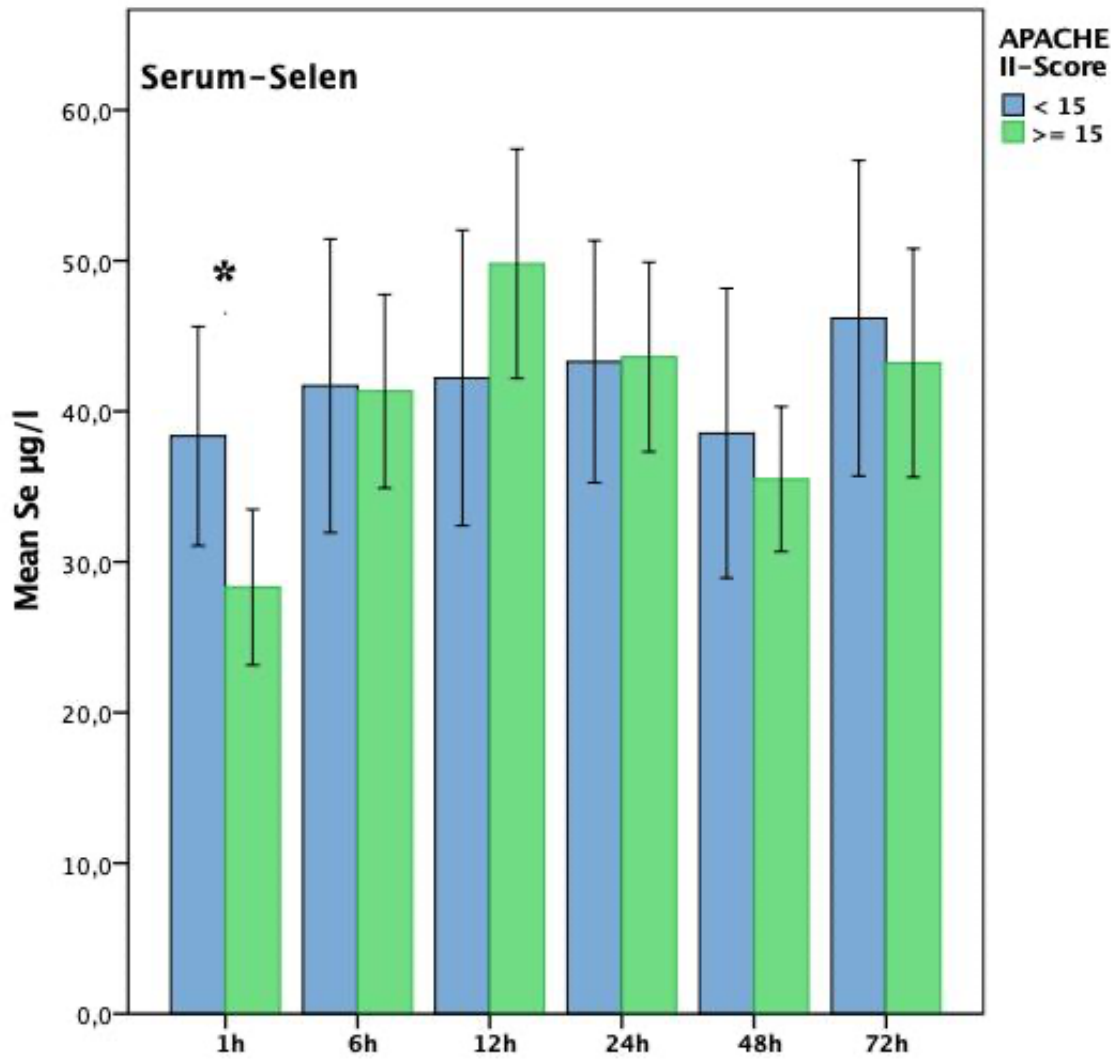


Abbildung 5 (5.6): MANOVA Analyse and T-Test für Selen abhängig vom APACHE II score.

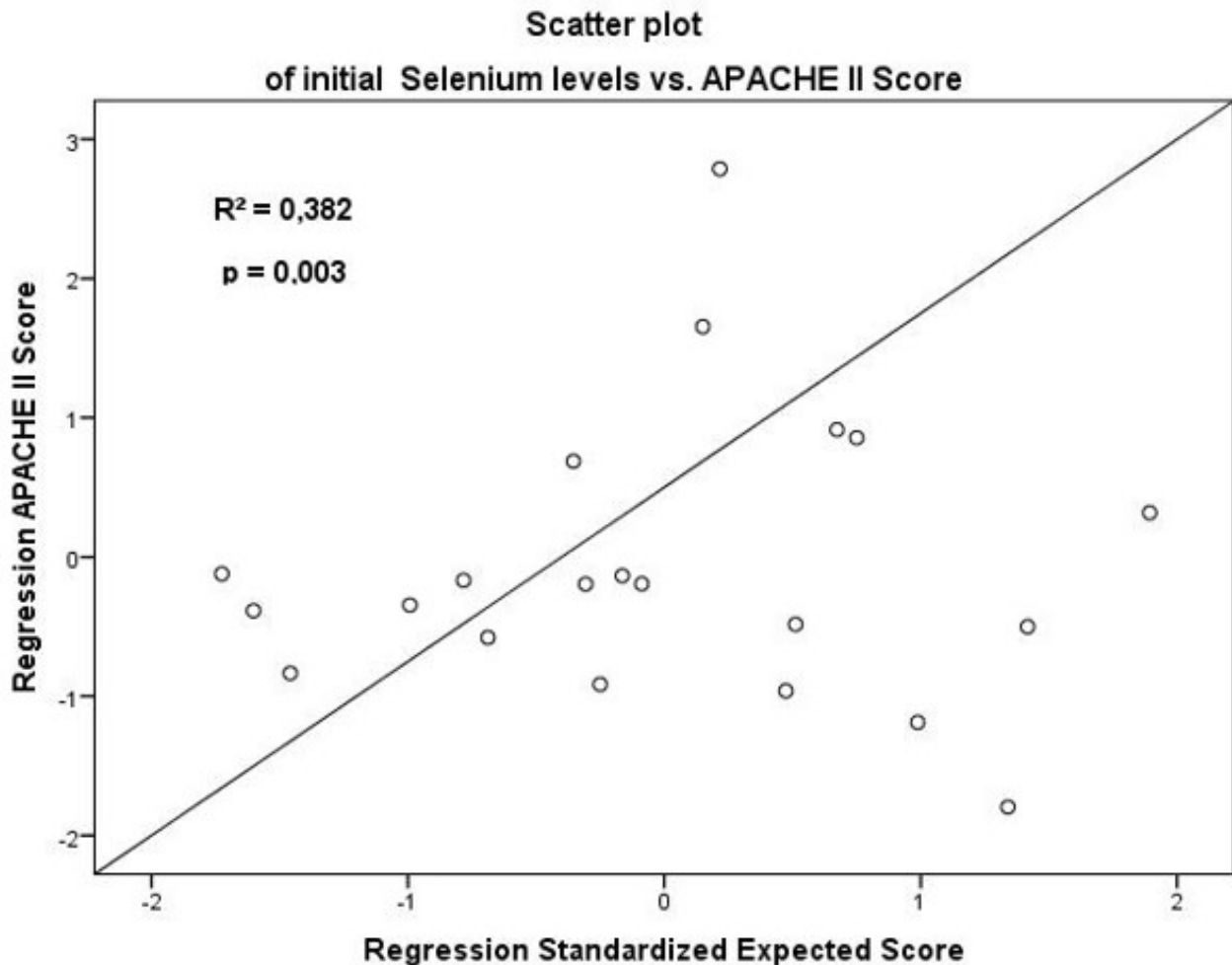


Abbildung 6 (5.6): Die Multiple Regressionsanalyse zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem initialen Serum-Selenspiegel und dem APACHE II Score ($R^2 = 0.382$; $p = 0.003$).

Betrachtet man die Serumselenkonzentration sowie die Konzentration von Selenoprotein P in Abhängigkeit des klinischen Outcomes so zeigt sich anhand unserer Ergebnisse, dass es bereits unmittelbar nach Polytrauma zu einem signifikanten Selen-/Selenoprotein P-Defizit kommt. Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass das Selen-/Selenoprotein P-Defizit mit einem komplizierten posttraumatischen Verlauf assoziiert war. So ergab sich in der Regressionsanalyse bezüglich der 0h-Selenkonzentration und dem APACHE II-Score ein hoch signifikanter Zusammenhang ($p = 0.003$). Da der APACHE II-Score als anerkannter Prognosefaktor gilt, scheint eine initial niedrige Selenkonzentration einen Risikofaktor für einen schwereren klinischen Verlauf beim Polytrauma

darzustellen. Signifikante Unterschiede konnten mittels T-Test für die 6h ($p=0.046$) und 72 h Abnahme ($p=0.03$) gezeigt werden. PatientInnen, die im posttraumatischen Verlauf verstarben, wiesen ebenfalls bereits in der 0h-Abnahme einen signifikanten Selen- ($p=0.002$) und Selenoprotein P-Mangel ($p=0.033$) auf.

Zusammenfassend können diese Erkenntnisse nach unserer Auffassung eine unmittelbare adjuvante Substitution von Selen bereits in der frühen posttraumatischen Phase unterstützen.

5.7. Glykokalyxshedding nach kardiopulmonaler Reanimation

Braunstein M*, Bogner-Flatz* V, Kusmenkov T, Ocker LE, Böcker W, Ney L, Tschöpp J, Annecke T. On the scene hyaluraonan and syndecan-1 serum levels and outcome after cardiac arrest and resuscitation; Mediators of inflammation, May 2019.

Einen Schlüsselschritt in der Entwicklung der systemischen, Endothel-vermittelten Inflammationsreaktion im Rahmen des Postreanimationssyndroms stellt die Schädigung der endothelialen Glykokalyx dar. Aufgrund ihrer Lage zwischen dem Gefäßendothel und dem Intravasalraum hat die endotheliale Glykokalyx einen wichtigen Einfluss auf viele molekulare und zelluläre Interaktionen und spielt somit eine große Rolle in verschiedensten pathophysiologischen Abläufen (Grundmann et al., 2012). Grundlegende Vorarbeiten der vorliegenden Studie konnten nach 20-minütiger Hypoxie/Ischämie mit anschließender Reperfusion an isolierten Meerschweinchenherzen eine vermehrte Freisetzung verschiedener Glykokalyxbestandteile im Sinne eines Sheddings nachweisen. Untersuchungen des koronarvenösen Effluats zeigten nach Reoxygenierung oder Reperfusion eine signifikante Erhöhung der Glykokalyxbestandteile Syndecan-1 und Heparansulfat im Blut (Annecke et al., 2011). Um das Phänomen des Sheddings nach Ischämie und Reperfusion nach kardiopulmonaler Reanimation besser zu verstehen, war es das Ziel dieser Arbeit, die Glykokalyxschädigung im Rahmen der Ganzkörperischämie und -reperfusion nach Herz-Kreislauf-Stillstand und Wiedererlangen eines Spontankreislaufs zu untersuchen. Zur Quantifizierung des Ausmaßes des Glykokalyxschadens erfolgte - auf Basis der Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Annecke et al.) - die Messung der abgespaltenen **Glykokalyxbestandteile Hyaluronan und Syndecan-1 im Serum** der PatientInnen. Da für die Entwicklung des Postreanimationssyndroms die frühe Phase einen bedeutenden Zeitraum darstellt, wurden die ersten 48 Stunden nach Reanimation untersucht. Ein besonderer Fokus dieser Arbeit wurde auf den ersten

Serummesswert, den Nullstundenwert (0h), gelegt. Dieser „native“ Wert ist von besonderem Interesse, da sich so bereits initiale Veränderungen der Glykokalyx untersuchen lassen, die nicht durch eine eingeleitete Therapie beeinflusst wurden.

Wir konnten in unserer Arbeit erstmals zeigen, dass PatientInnen, die im weiteren Verlauf verstarben, bereits unmittelbar nach ROSC (0h-Abnahme) signifikant höhere Hyaluronanwerte aufwiesen. Sowohl Hyaluronan- als auch Syndecan-1-Konzentrationen waren in Abhängigkeit der Entwicklung eines Multiorganversagens signifikant erhöht.

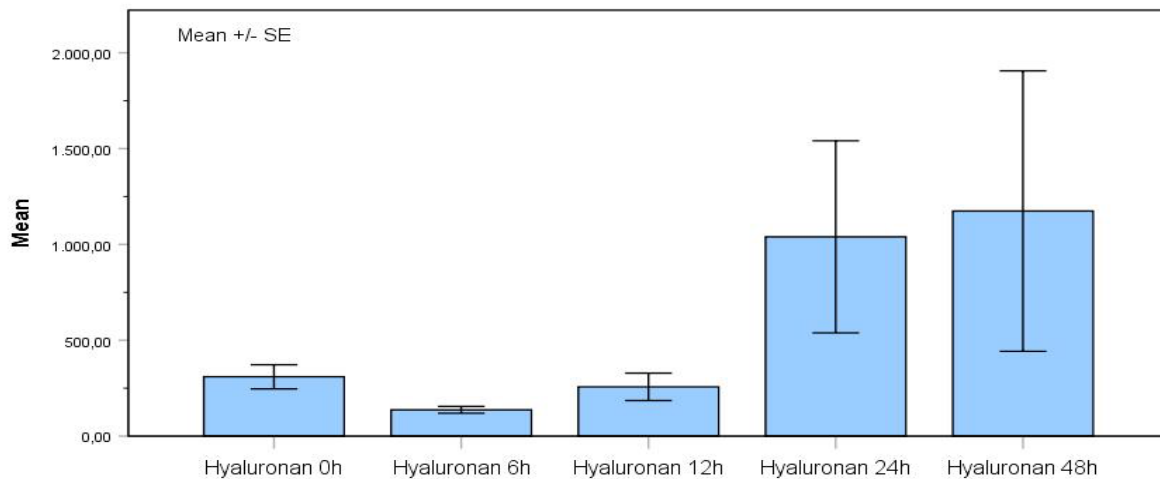


Abbildung 1 (5.7): Serumkonzentration von Hyaluronan innerhalb von 48h nach OHCA. Signifikanter Anstieg der Hyaluronan Level; MW +/- 1SE. MANOVA Analyse; $p=0.043$.

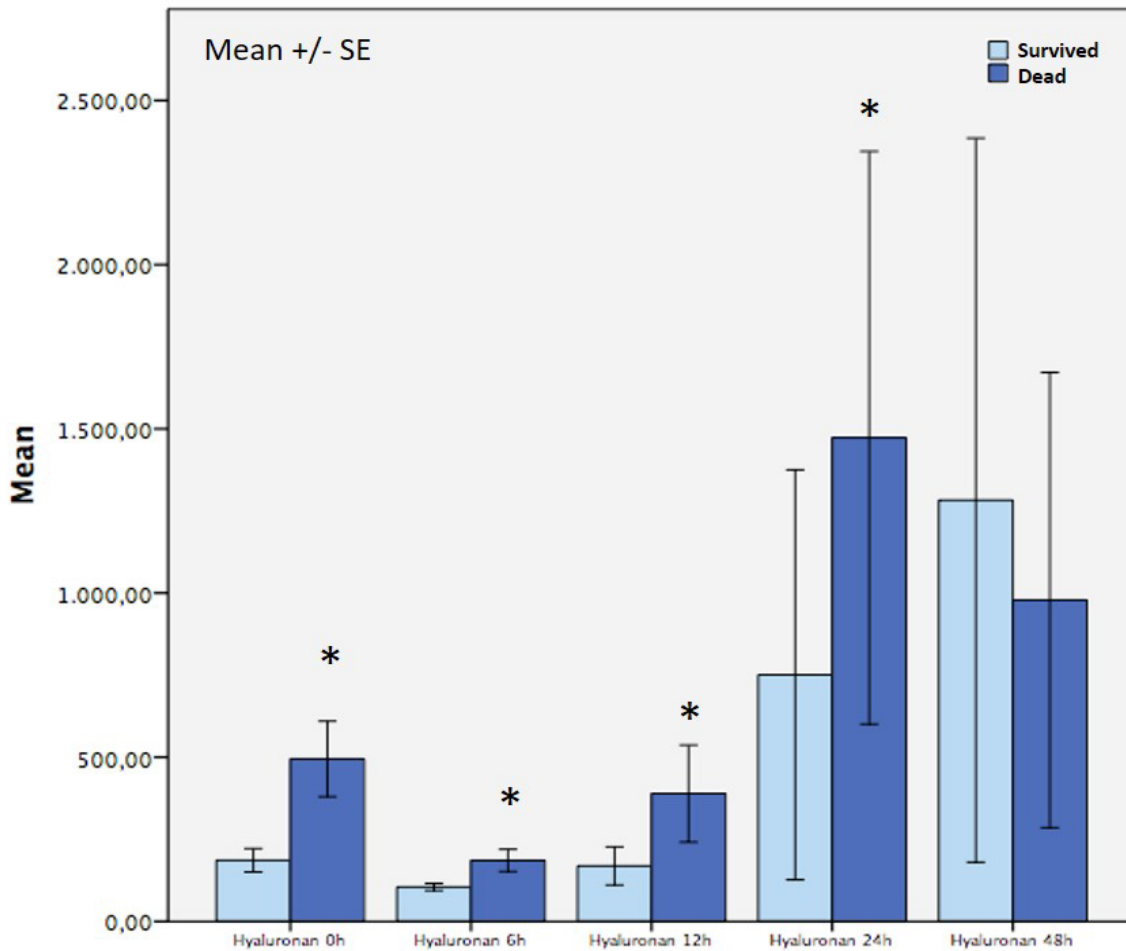


Abbildung 2 (5.7): Korrelation von Hyaluronan-Konzentrationen und dem 30-Tage Überleben 0h-48h nach OHCA. Signifikante Korrelation 0h-24h nach ROSC; MW +/- ISE; MANOVA Analyse und post-hoc * Mann-Whitney-U-Test; $p \leq 0.05$; Überlebende $n=9$, Verstorbene $n=6$

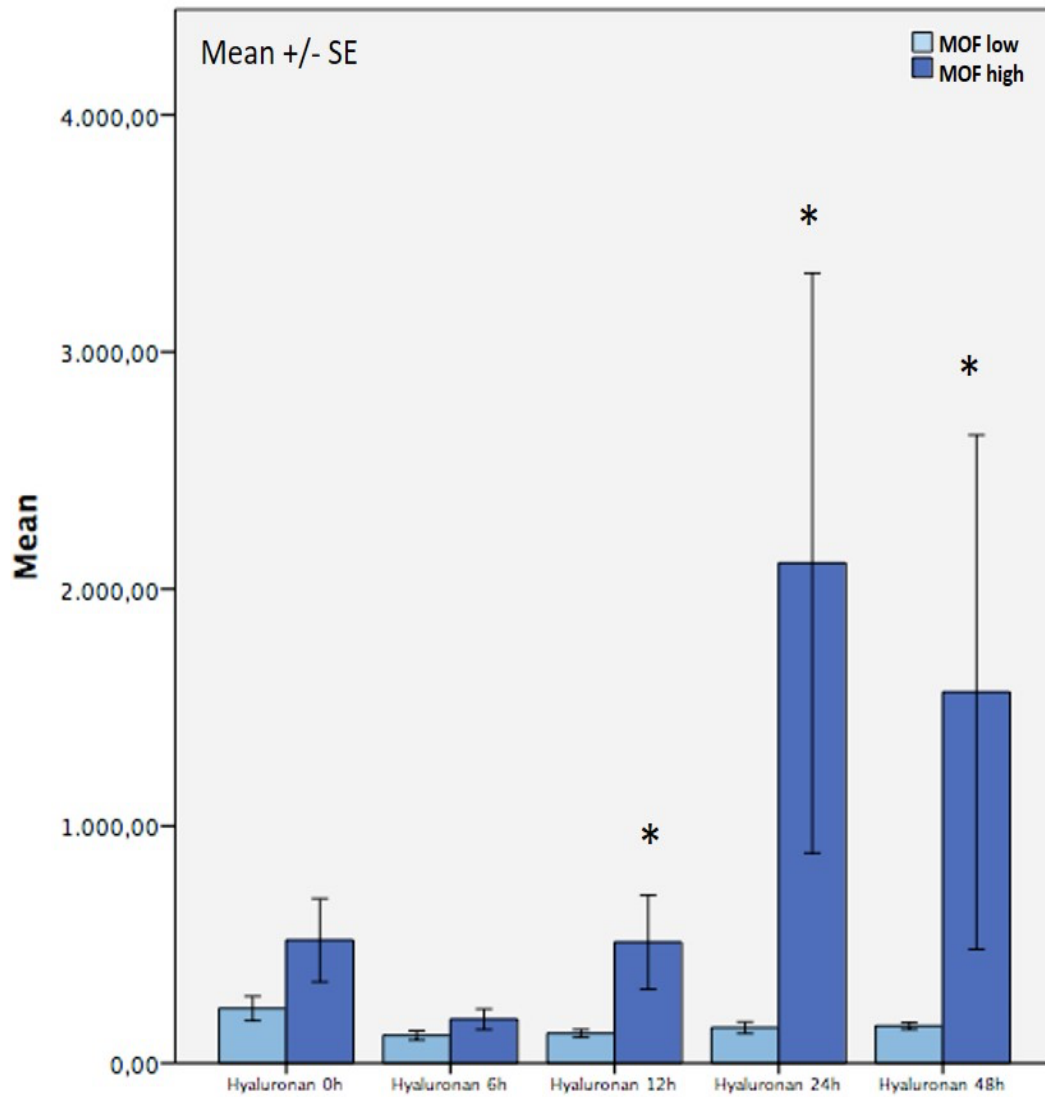


Abbildung 3 (5.7): Korrelation von Hyaluronan-Konzentrationen und der Entwicklung eines Multiorganversagens 0h-48h nach OHCA. Signifikante Korrelation 0h-48h nach ROSC; MW +/- ISE; MANOVA Analyse und post-hoc * Mann-Whitney-U-Test; $p \leq 0.05$; MOF ≤ 6 : $n=9$, MOF > 6 : $n=4$).

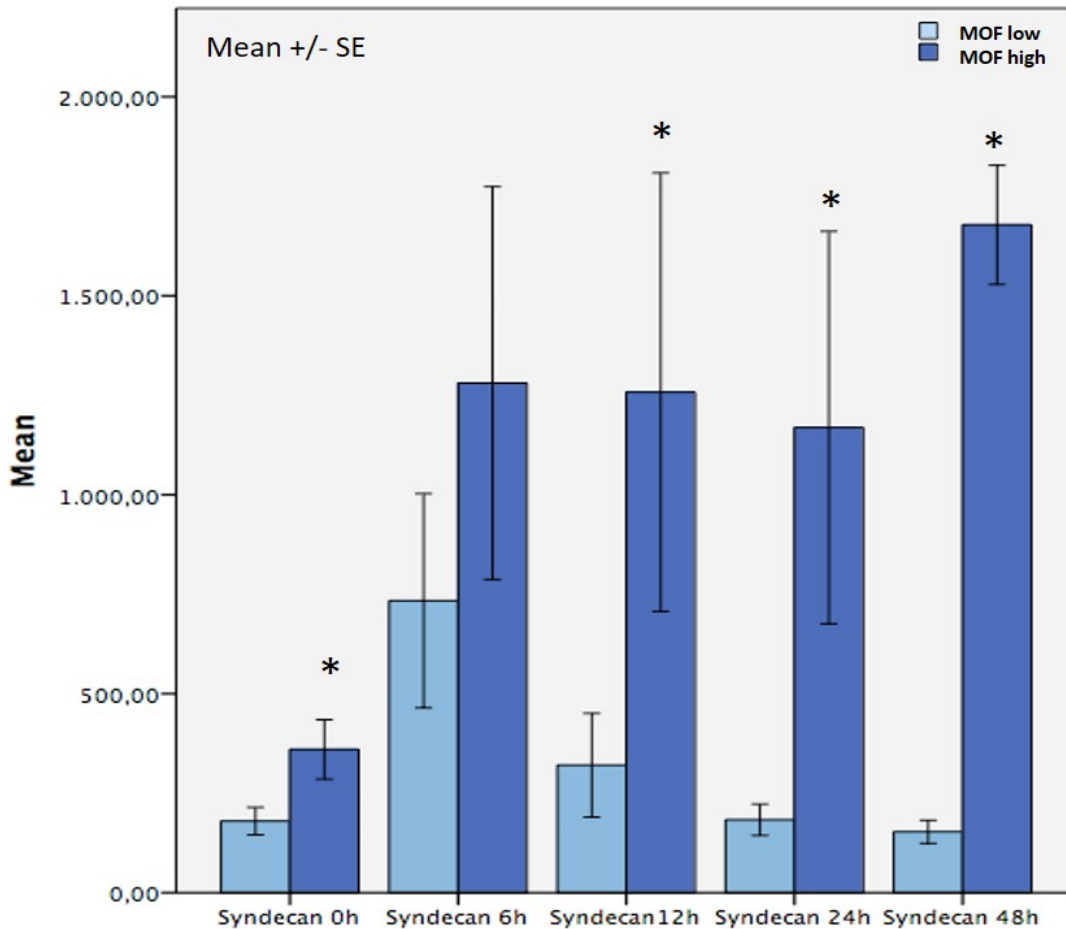


Abbildung 4 (5.7): Korrelation von Syndecan-1 Konzentrationen and Multiorganversagen 0-48h nach OHCA. Signifikante Korrelation von Syndecan-1 und Multiorganversagen ($MOF > 6$); MW +/- ISE; MANOVA Analyse und post-hoc * Mann-Whitney-U-Test; $p \leq 0.05$; $MOF \leq 6$: $n=9$, $MOF > 6$: $n=4$).

Die von uns untersuchten Parameter konnten so bereits unmittelbar (0h) nach einem Herzkreislaufstillstand und ROSC zeigen, welche PatientInnen besonders von einem komplizierten Verlauf betroffen waren. In Zukunft können diese Glykokalyxparameter daher eventuell als „Serum-Biomarker“ für die frühe Phase nach Reanimation dienen und so eine Auskunft über den individuellen Status eines reanimierten Patienten geben, um die individuelle Gefährdung für die Entwicklung eines schweren Ischämie-Reperfusionssyndroms abschätzen zu können. Damit könnte ein „Serummonitoring“ unter Umständen dazu beitragen, diese besonders gefährdeten Patienten

frühzeitig zu erkennen und so die Folgen eines schweren Ischämie-Reperfusionssyndroms abzumildern.

6. Aussicht

Aktuell werden zwei weitere konkrete Teilprojekte dieses Habilitationsprojektes umgesetzt, die sich inhaltlich aus den gewonnenen Erkenntnissen der oben vorgestellten Vorarbeiten ergeben.

6.1. Frühes Glykokalyxshedding, Multiorganversagen und Outcome nach Polytrauma

Korrespondierend zu der oben aufgeführten Untersuchung des Glykokalyxshedding nach Reanimation wollen wir in einem weiteren Teilprojekt die Auswirkungen des Polytraumas auf die endotheliale Glykokalyx untersuchen, denn der traumatisch-hämorrhagische Schock geht ebenfalls mit einer frühen posttraumatischen Schädigung der endothelialen Glykokalyx einher. Das Shedding von Glykokalyxkomponenten führt mutmaßlich über eine Aktivierung des unspezifischen Immunsystems zu einer zusätzlichen Verstärkung dieser systemischen posttraumatischen Inflammationsreaktion. Zu diesem Zweck sollen Hyaluronan und Syndecan-1 als Indikator für das endotheliale Shedding im Plasma polytraumatisierter PatientInnen bestimmt werden. Die Veränderungen der Plasmakonzentrationen innerhalb der ersten 12h nach Trauma können uns so möglicherweise helfen, die pathophysiologischen Zusammenhänge dieses vulnerablen Kollektivs besser zu verstehen. Insbesondere die initiale 0h-Abnahme ist hier von erheblichem Interesse, da diese frühe „native“ Untersuchung uns möglicherweise helfen kann, den unmittelbaren Einfluss der traumatischen Gewebeerstörung, (Massen-)Blutung/Koagulopathie und zellulären Hypoxie anhand von Glykokalyxmarkern zu erfassen und mit dem weiteren posttraumatischen Verlauf zu korrelieren.

6.2. Selen und seine Coenzyme nach kardiopulmonaler Reanimation

Die Arbeitsgruppe um Schomburg sowie Reisinger und Kollegen konnten zeigen, dass Selenoenzyme eine essenzielle Schutzfunktion des Körpers gegen schädigende Oxidationsvorgänge sowie regulatorischen Einfluss auf die Immunantwort innehaben (Becker et al., 2014b; Reisinger et al.,

2009). Unsere eigene Arbeit konnte bereits ein signifikantes 0h-Selendefizit nach Polytrauma nachweisen; passend dazu bestätigte eine aktuelle große Metaanalyse den positiven Effekt der Selensupplementierung beim Polytrauma (Huang et al., 2022).

Da wir einerseits zeigen konnten, dass sowohl das Serumselen als auch die Serumkonzentrationen von Selenoprotein P beim Polytrauma signifikant niedriger war als im gesunden europäischen Vergleichskollektiv und ein signifikantes Defizit bereits initial bei Aufnahme im Schockraum vorlag und wir andererseits wissen, dass die Immunreaktion nach Polytrauma und Reanimation ähnlich sind, liegt es also nahe, den Selenhaushalt auch bei PatientInnen nach Herzkreislaufstillstand so früh als möglich zu evaluieren.

Vorausgegangene Arbeiten konnten zudem den engen Zusammenhang zwischen der endothelialen Dysfunktion und dem Selenspiegel im Rahmen des Postreanimationssyndroms aufzeigen. Die frühe Substitution von Selen führte über einen antiinflammatorischen Effekt zu einer Protektion der endothelialen Glykokalyx, ein Selendefizit war gleichzeitig mit einem schlechten Outcome nach Reanimation assoziiert.

Basierend auf diesen Erkenntnissen, soll in der geplanten Studie - sowohl im Plasma als auch auf mRNA-Ebene - bereits unmittelbar nach erfolgreicher CPR (0h) und im weiteren Verlauf nach ROSC-Selen, Selenoprotein P (SePP) und Glutathionperoxidase 3 (GPx3) bestimmt werden. Darüber hinaus wollen wir evaluieren, inwieweit die Bestimmung dieser Parameter zu einer frühzeitigen Risiko- sowie Bedarfseinschätzung verwertbar ist. Damit könnten diese PatientInnen speziell angepassten Therapieschemata zugeführt werden, die darauf abzielen, die Folgen der Immundysregulation nach Reanimation abzumildern.

7. Literaturverzeichnis

- Adams, J. A. (2006). Endothelium and cardiopulmonary resuscitation. *Critical Care Medicine*, 34(12), S458–S465. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000246012.68479.49>
- Adrie, C., Adib-Conquy, M., Laurent, I., Monchi, M., Vinsonneau, C., Fitting, C., Fraise, F. cois, Dinh-Xuan, A. T., Carli, P., Spaulding, C., Dhainaut, J.-F. cois, & Cavaillon, J.-M. (2002). Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a “sepsis-like” syndrome. *Circulation*, 106(5), 562--568.
- Adrie, C., Laurent, I., Monchi, M., Cariou, A., Dhainaou, J.-F. cois, & Spaulding, C. (2004a). Postresuscitation disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome? *Current Opinion in Critical Care*, 10(3), 208--212.
- Adrie, C., Laurent, I., Monchi, M., Cariou, A., Dhainaou, J.-F. cois, & Spaulding, C. (2004b). Postresuscitation disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome? *Current Opinion in Critical Care*, 10(3), 208--212.
- Angstwurm, M. W., & Gaertner, R. (2006). Practicalities of selenium supplementation in critically ill patients. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 9(3), 233--238.
- Annecke, T., Fischer, J., Hartmann, H., Tschoep, J., Rehm, M., Conzen, P., Sommerhoff, C. P., & Becker, B. F. (2011). Shedding of the coronary endothelial glycocalyx: effects of hypoxia/reoxygenation vs ischaemia/reperfusion. *British Journal of Anaesthesia*, 107(5), 679–686. <https://doi.org/10.1093/bja/aer269>
- Becker, N.-P., Martitz, J., Renko, K., Stoedter, M., Hybsier, S., Cramer, T., & Schomburg, L. (2014a). Hypoxia reduces and redirects selenoprotein biosynthesis. *Metallomics : Integrated Biometal Science*, 6(5), 1079--1086.
- Becker, N.-P., Martitz, J., Renko, K., Stoedter, M., Hybsier, S., Cramer, T., & Schomburg, L. (2014b). Hypoxia reduces and redirects selenoprotein biosynthesis. *Metallomics*, 6(5), 1079–1086. <https://doi.org/10.1039/c4mt00004h>
- Bogner, V., Baker, H. V., Kanz, K.-G., Moldawer, L. L., Mutschler, W., & Biberthaler, P. (2009). Hemorrhage and subsequent allogenic red blood cell transfusion are associated with characteristic monocyte messenger RNA expression patterns in patients after multiple injury—a genome wide view. *The Journal of Trauma*, 67(4), 792--801.
- Bogner, V., Keil, L., Kanz, K.-G., Kirchhoff, C., Leidel, B. A., Mutschler, W., & Biberthaler, P. (2009). Very early posttraumatic serum alterations are significantly associated to initial massive RBC substitution, injury severity, multiple organ failure and adverse clinical outcome in multiple injured patients. *European Journal of Medical Research*, 14(7), 284--291.
- Bro-Jeppesen, J., Johansson, P. I., Hassager, C., Wanscher, M., Ostrowski, S. R., Bjerre, M., & Kjaergaard, J. (2016). Endothelial activation/injury and associations with severity of post-cardiac arrest syndrome and mortality after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation*, 107, 71--79.

- Callaway, C. W. (2012). Endothelial damage after cardiac arrest—“Endotheliitis.” *Resuscitation*, 83(6), 667–668. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2012.03.008>
- Castro, W. M. (2007). [Selenium in critically ill patients with systemic inflammatory response]. *Nutricion Hospitalaria*, 22(3), 295--306.
- Chelazzi, C., Villa, G., Mancinelli, P., Gaudio, A. R. D., & Adembri, C. (2015). Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. *Critical Care*, 19(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0741-z>
- Fuchs, A., Groß, S., Neumann, T., Illerhaus, A., Vink, H., Klasen, G., Gathof, B., & Annecke, T. (2020). Immediate effects of whole blood donation on the endothelial surface layer and glycocalyx shedding. *Blood Transfusion = Trasfusione Del Sangue*. <https://doi.org/10.2450/2020.0025-20>
- Gebhard, F., & Huber-Lang, M. (2008). Polytrauma—pathophysiology and management principles. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 393(6), 825. <https://doi.org/10.1007/s00423-008-0334-2>
- Geppert, A., Zorn, G., Karth, G. D., Haumer, M., Gwechenberger, M., Koller-Strametz, J., Heinz, G., Huber, K., & Siostrzonek, P. (2000). Soluble selectins and the systemic inflammatory response syndrome after successful cardiopulmonary resuscitation. *Critical Care Medicine*, 28(7), 2360–2365. <https://doi.org/10.1097/00003246-200007000-00030>
- Gill, S. E., & Parks, W. C. (2008). Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 40(6–7), 1334--1347.
- Golen, R. F. van, Gulik, T. M. van, & Heger, M. (2012). Mechanistic overview of reactive species-induced degradation of the endothelial glycocalyx during hepatic ischemia/reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(8), 1382–1402. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.013>
- Gräsner, J.-T., Wnent, J., Herlitz, J., Perkins, G. D., Lefering, R., Tjelmeland, I., Koster, R. W., Masterson, S., Rossell-Ortiz, F., Maurer, H., Böttiger, B. W., Moertl, M., Mols, P., Alihodžić, H., Hadžibegović, I., Ioannides, M., Truhlář, A., Wissenberg, M., Salo, A., ... Bossaert, L. (2020). Survival after out-of-hospital cardiac arrest in Europe - Results of the EuReCa TWO study. *Resuscitation*, 148, 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2019.12.042>
- Grundmann, S., Fink, K., Rabadzhieva, L., Bourgeois, N., Schwab, T., Moser, M., Bode, C., & Busch, H.-J. (2012). Perturbation of the endothelial glycocalyx in post cardiac arrest syndrome. *Resuscitation*, 83(6), 715–720. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2012.01.028>
- Guisasola, M. C., Alonso, B., Bravo, B., Vaquero, J., & Chana, F. (2018). An overview of cytokines and heat shock response in polytraumatized patients. *Cell Stress and Chaperones*, 23(4), 483–489. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0859-9>
- Hasegawa, H., Senga, T., Ito, S., Iwamoto, T., & Hamaguchi, M. (2009). A role for AP-1 in matrix metalloproteinase production and invadopodia formation of v-Crk-transformed cells. *Experimental Cell Research*, 315(8), 1384--1392.

- Hästbacka, J., Linko, R., Tervahartiala, T., Varpula, T., Hovilehto, S., Parviainen, I., Vaara, S. T., Sorsa, T., & Pettilä, V. (2014). Serum MMP-8 and TIMP-1 in Critically Ill Patients with Acute Respiratory Failure. *Anesthesia & Analgesia*, *118*(4), 790–798. <https://doi.org/10.1213/ane.0000000000000120>
- Hildebrand, F., Pape, H.-C., & Krettek, C. (2005). [The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction]. *Der Unfallchirurg*, *108*(10), 793--4-- 796--803.
- Huang, J.-F., Hsu, C.-P., Ouyang, C.-H., Cheng, C.-T., Wang, C.-C., Liao, C.-H., Wu, Y.-T., & Hsieh, C.-H. (2022). The Impact of Selenium Supplementation on Trauma Patients—Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, *14*(2), 342. <https://doi.org/10.3390/nu14020342>
- Jedlicka, J., Becker, B. F., & Chappell, D. (2020). Endothelial Glycocalyx. *Critical Care Clinics*, *36*(2), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.007>
- Keel, M., & Trentz, O. (2005). Pathophysiology of polytrauma. *Injury*, *36*(6), 691--709.
- Lier, H., Bernhard, M., & Hossfeld, B. (2018). Hypovolämisch-hämorrhagischer Schock. *Der Anaesthetist*, *67*(3), 225–244. <https://doi.org/10.1007/s00101-018-0411-z>
- Lorente, L., Martin, M. M., Labarta, L., Diaz, C., Sole-Violan, J., Blanquer, J., Orbe, J., Rodriguez, J. A., Jimenez, A., Borreguero-Leon, J. M., Belmonte, F., Medina, J. C., Lliminana, M. C., Ferrer-Aguero, J. M., Ferreres, J., Mora, M. L., Lubillo, S., Sanchez, M., Barrios, Y., ... Paramo, J. A. (2009). Matrix metalloproteinase-9, -10, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 blood levels as biomarkers of severity and mortality in sepsis. *Critical Care (London, England)*, *13*(5), R158.
- Mtairag, E. M., Chollet-Martin, S., Oudghiri, M., Laquay, N., Jacob, M. P., Michel, J. B., & Feldman, L. J. (2001). Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion. *Cardiovascular Research*, *49*(4), 882--890.
- Nishimoto, N., & Kishimoto, T. (2006). Interleukin 6: from bench to bedside. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, *2*(11), 619–626. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0338>
- Nolan, J. P., Neumar, R. W., Adrie, C., Aibiki, M., Berg, R. A., Böttiger, B. W., Callaway, C., Clark, R. S. B., Geocadin, R. G., Jauch, E. C., Kern, K. B., Laurent, I., Longstreth, W. T., Merchant, R. M., Morley, P., Morrison, L. J., Nadkarni, V., Peberdy, M. A., Rivers, E. P., ... Stroke, C. on. (2010). Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication: a scientific statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke (Part II). *International Emergency Nursing*, *18*(1), 8--28.
- Parks, W. C., Wilson, C. L., & Lopez-Boado, Y. S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*, *4*(8), 617--629.
- Rai, V., Mathews, G., & Agrawal, D. K. (2022). Translational and Clinical Significance of DAMPs, PAMPs, and PRRs in Trauma-induced Inflammation. *Archives of Clinical and Biomedical Research*, *6*(5), 673–685. <https://doi.org/10.26502/acbr.50170279>

- Reisinger, J., Höllinger, K., Lang, W., Steiner, C., Winter, T., Winter, A., Mori, M., Lindorfer, A., Kiblböck, D., & Siostrzonek, P. (2009). Does early administration of selenium improve neurological outcome after cardiac arrest? *The American Journal of Emergency Medicine*, 27(2), 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2008.01.020>
- Sauaia, A., Moore, F. A., & Moore, E. E. (2016). Postinjury Inflammation and Organ Dysfunction. *Critical Care Clinics*, 33(1), 167–191. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2016.08.006>
- Simon, D., Evaldt, J., Nabinger, D. D., Fontana, M. F., Klein, M. G., Gomes, J. do A., & Regner, A. (2017). Plasma matrix metalloproteinase-9 levels predict intensive care unit mortality early after severe traumatic brain injury. *Brain Injury*, 31(3), 390–395. <https://doi.org/10.1080/02699052.2016.1259501>
- Steppan, J., Hofer, S., Funke, B., Brenner, T., Henrich, M., Martin, E., Weitz, J., Hofmann, U., & Weigand, M. A. (2011). Sepsis and Major Abdominal Surgery Lead to Flaking of the Endothelial Glycocalyx. *Journal of Surgical Research*, 165(1), 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.04.034>
- Stoppe, C., Fries, M., Rossaint, R., Grieb, G., Coburn, M., Simons, D., Brucken, D., Bernhagen, J., Pallua, N., & Rex, S. (2012). Blood levels of macrophage migration inhibitory factor after successful resuscitation from cardiac arrest. *PloS One*, 7(4), e33512.
- Wang, W., Deng, M., Liu, X., Ai, W., Tang, Q., & Hu, J. (2011). TLR4 Activation Induces Nontolerant Inflammatory Response in Endothelial Cells. *Inflammation*, 34(6), 509–518. <https://doi.org/10.1007/s10753-010-9258-4>
- Weinbaum, S., Tarbell, J. M., & Damiano, E. R. (2007). The Structure and Function of the Endothelial Glycocalyx Layer. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9(1), 121–167. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151959>
- White, N. J., Ward, K. R., Pati, S., Strandenes, G., & Cap, A. P. (2017). Hemorrhagic blood failure. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 82(6S), S41–S49. <https://doi.org/10.1097/ta.0000000000001436>
- Yan, S., Gan, Y., Jiang, N., Wang, R., Chen, Y., Luo, Z., Zong, Q., Chen, S., & Lv, C. (2020). The global survival rate among adult out-of-hospital cardiac arrest patients who received cardiopulmonary resuscitation: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care*, 24(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-2773-2>