

Aus der

Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik

Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der
Universität Tübingen

**CTLA-4 als potenzieller Risikomarker für postoperative
Komplikationen bei Trauma-Patienten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Mäling, Michelle

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. S. Hoefert

Tag der Disputation: 27.11.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Hintergrund	9
1.2	Frakturheilungsprozess	9
1.3	Zytokine und deren Rolle während der Fraktur- und Wundheilung	10
1.4	Risikofaktoren postoperativer Komplikationen	12
1.4.1	Mechanische Einflussfaktoren	12
1.4.2	Raucher	12
1.4.3	Fortgeschrittenes Alter	13
1.4.4	Immunsystem	13
1.4.5	BMI	14
1.5	Therapiemöglichkeiten bei Frakturheilungsstörungen	14
1.5.1	Bone morphogenetic proteins (BMPs)	14
1.5.2	Elektromagnetisches Feld	15
1.5.3	Mesenchymale Stammzellen	15
1.6	Einordnung der vorliegenden Studie in das KIKS-Projekt	16
1.7	Ziele und Fragestellung der vorliegenden Studie	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Studiendesign	18
2.2	Gutachten der Ethikkommission	19
2.3	Aufnahme der Patienten in die Studie	19
2.4	Einschlusskriterien	20
2.5	Befragung der Patienten	20
2.5.1	Allgemeiner Teil	20
2.5.2	FINDRISK	20
2.5.3	Alkoholkonsum	21
2.5.4	Rauchverhalten	21
2.5.5	Komorbiditäten	21
2.6	Probengewinnung und Verarbeitung	22
2.7	Follow-up	22
2.8	Bestimmung des Komplikationsgrades	23

2.9	Studienpopulation	23
2.10	Matching	23
2.11	Methode der Microarrays	24
2.12	Auswertung der Microarrays	26
2.13	Messung der Zytokin Konzentrationen mittels ELISA	27
2.14	ELISA Datenauswertung	29
2.15	Statistische Auswertung	29
3	Ergebnisse	31
3.1	Patientenkollektiv und Studiengruppen	31
3.2	Analyse des Patientenkollektivs	33
3.2.1	Geschlechterspezifische Unterschiede	33
3.2.2	Frauen mit Komplikationen weisen mehr Komorbiditäten auf	34
3.2.3	Frauen mit Komplikationen weisen einen höheren BMI auf	35
3.2.4	Frauen mit Komplikationen weisen einen höheren FINDRISK auf	36
3.2.5	Frauen mit Komplikationen weisen eine längere stationäre Verweildauer auf	37
3.2.6	Frauen weisen höheres Alter bei Studienaufnahme auf als Männer	38
3.2.7	Keine Auffälligkeiten in Bezug auf das Rauchverhalten	39
3.2.8	Alkoholkonsum	39
3.2.9	Häufigkeit des Alkoholkonsums bei Männern signifikant	40
3.3	Analyse der Microarrays	41
3.4	Ergebnisse der ELISAs	42
3.4.1	Niedrige CTLA-4 Konzentrationen bei Frauen mit Komplikation	45
3.5	Spezifische Zusammenhänge zwischen den CTLA-4 Konzentrationen und den zuvor identifizierten Risikofaktoren für Frauen	47
4	Diskussion	52
4.1	Identifizierte Risikofaktoren für Frauen	52
4.1.1	Anzahl an Komorbiditäten	52
4.1.2	Krankenhausverweildauer	53
4.1.3	BMI	54

4.1.4	FINDRISK	55
4.2	Erhöhter Alkoholkonsum als Risikofaktor für Männer	56
4.3	Ergebnisse der ELISAs	56
4.3.1	Nicht signifikante Ergebnisse der ELISAs	56
4.3.2	CTLA-4 als potenzieller Risiko-Marker für Frauen	58
4.3.3	CTLA-4: Unterschiedliche Regulation in Microarrays und ELISAs	60
4.4	Kombination der CTLA-4 Ergebnisse mit den signifikanten Ergebnissen der Fragebögen	60
4.5	Klassifikation nach CD als geeignete Einteilung der Komplikationen?	61
4.6	Klinischer Ausblick	62
4.7	Limitierungen der Arbeit	63
5	Zusammenfassung	65
6	Anhang	67
6.1	Literaturverzeichnis:	74
7	Erklärung zum Eigenanteil	82
8	Danksagung	83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beteiligte Zytokine während des Frakturheilungsprozesses. In Anlehnung an Maruyama et al. (16). Erstellt mit BioRender®.	12
Abbildung 2: Ablauf der Microarrays. Nach Protocol „RayBio® C-Series Human Cytokine Antibody Array C5“. Erstellt mit BioRender®.	26
Abbildung 3: Ablauf der ELISAs (R&D Systems®). In Anlehnung an das Protokoll R&D Systems®. Erstellt mit BioRender®. Ausführliche Protokolle ELISA siehe Anhang.	29
Abbildung 4: Übersicht der Fallzahlen.	31
Abbildung 5: Arten der Komplikationen der Gruppe CDIII (N = 31).	32
Abbildung 6: Verteilung der Anzahl an Komorbiditäten in Bezug auf das Geschlecht. A) Ktrl.: N = 234; CDIII: N = 31. B) Ktrl.: N = 131; CDIII: N = 18. C) Ktrl.: N = 103; CDIII: N = 13.	35
Abbildung 7: Body Mass Index. A) Ktrl: N = 131; CDIII: N = 18. B) Ktrl: N = 103; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.	36
Abbildung 8: Summe FINDRISK. A) Ktrl: N = 131; CDIII: N = 18. B) Ktrl: N = 103; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.	37
Abbildung 9: Stationäre Verweildauer. A) Ktrl: N = 131; CDIII: N = 18. B) Ktrl: N = 103; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.	38
Abbildung 10: Alter bei Studienaufnahme. A) Ktrl: N = 131; CDIII: N = 18. B) Ktrl: N = 103; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.	38
Abbildung 11: Anzahl der berechneten PY. A) Ktrl: N = 131; CDIII: N = 18. B) Ktrl: N = 103; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.	39
Abbildung 12: Summe Audit-C. A) Ktrl: N = 131; CDIII: N = 18. B) Ktrl: N = 103; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.	40
Abbildung 13: Wie oft trinken Sie Alkohol? A) Ktrl: N = 131; CDIII: N = 18. B) Ktrl: N = 103; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.	40
Abbildung 14: Heat Map. Relative Zytokin Spiegel im Blutserum. A) Hochregulierte Zytokine. B) Herunterregulierte Zytokine. C) Gegensätzlich hochherunter regulierte Zytokine, zur jeweiligen Geschlechter spezifischen Kontrollgruppe. Männer: CDIII: N = 17; Ktrl: N = 17. Frauen: CDIII: N = 13; Ktrl.: N = 13.	40

N = 13. Die Werte der Signalintensitäten wurden zweimal normalisiert (zunächst auf den MW der jeweiligen positiv Kontrolle und darauffolgend auf den MW der Signalintensitäten der jeweiligen Zytokine)	41
Abbildung 15: Vergleich der Konzentration von B7-2. A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.....	42
Abbildung 16: Vergleich der Konzentration von IL-1 β . A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.....	43
Abbildung 17: Vergleich der Konzentration von PIGF-1. A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.....	43
Abbildung 18: Vergleich der Konzentration von TGF- β 2. A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.....	44
Abbildung 19: Vergleich der Konzentration von BMP-2. A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.....	44
Abbildung 20: Vergleich der Konzentration von B7-1. A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.....	45
Abbildung 21: Vergleich der Konzentration von TIM-1. A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.....	45
Abbildung 22: Vergleich der Konzentration von CTLA-4. A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test. C) Roc-Kurve	46
Abbildung 23: A) Zusammenhang des BMIs mit der CTLA-4 Konzentration. Ktrl. \rightarrow 16-18.4: N = 7; 18.5-24.9: N = 44; 25-30: N = 16; >30: N = 19. CDIII \rightarrow 16-18.4: N = 0; 18.5-24.9: N = 4; 25-30: N = 4; >30: N = 5. Mann-Whitney Test. B) ROC-Kurve. Ktrl.: N = 35; CDIII: N = 9.....	48
Abbildung 24: A) Zusammenhang der Summe des FINDRISK mit der CTLA-4 Konzentration bei Frauen. Ktrl. \rightarrow 0-6: N = 35; 7-11: N = 34; 12-14: N = 10; 15-21: N = 7. CDIII = \rightarrow 0-6: N = 4; 7-11: N = 2; 12-14: N = 4; 15-21: N = 3. B) ROC-Kurve. Ktrl.: N = 18; CDIII: N = 7.....	49
Abbildung 25: A) Zusammenhang der Anzahl an Komorbiditäten mit der CTLA-4 Konzentration. Ktrl. \rightarrow 0: N = 42; 1-2: N = 36; 3-5: N = 4. CDIII \rightarrow 0: N = 1; 1-2: N = 6; 3-5: N = 6. B) ROC-Kurve. Ktrl.: N = 40; CDIII: N = 12.....	50

Abbildung 26: A) Zusammenhang der Verweildauer mit der CTLA-4 Konzentration. Ktrl. → 1-11: N = 65; ≥ 12 : N = 21. CDIII → 1-11: N = 6; ≥ 12 : N = 7. Mann-Whitney Test. B) ROC-Kurve. Ktrl.: N = 21, CDIII: N = 7. ... 51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation nach Clavien-Dindo	19
Tabelle 2: Übersicht der durchgeführten Microarrays mit Anzahl der detektierten Zytokine pro Membran.	24
Tabelle 3: Übersicht der unterschiedlichen Konzentrationen und Verdünnungen der ELISA	28
Tabelle 4: Aufteilung der Patienten nach Geschlecht	32
Tabelle 5: Unterteilung der Studiengruppen in Männer und Frauen mit Darstellung des Mittelwertes, der Standardabweichung und p-Wert (mittels Mann-Whitney-Test berechnet). Männer: N = 149 (Kontrollgruppe + CDIII); Frauen: N = 116 (Kontrollgruppe + CDIII).	34
Tabelle 6: Koordinaten ROC-Kurve zu Abbildung 22C.	47
Tabelle 7: Koordinaten ROC-Kurve zu Abbildung 23B	48
Tabelle 8: Parameter der ROC-Kurve zu Abbildung 24B.....	49
Tabelle 9: Fläche unter der ROC-Kurve zu Abbildung 25B.....	50
Tabelle 10: Koordinaten ROC-Kurve zu Abbildung 26B	51

Abkürzungsverzeichnis

µl.....	Mikroliter
AB	Antikörper
ATZ.....	geriatrische Traumatologie
AUC	Fläche unter der ROC-Kurve
AUDIT.....	Alcohol Use Disorders Identification Test
BGU.....	Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik
BMI.....	Body Mass Index
BMP.....	Bone morphogenetic protein
CD.....	Clavien-Dindo
ELISA.....	Enzyme linked Immunosorbent Assay
Eppis.....	Eppendorf Mikroreaktionsgefäße
FINDRISK.....	Finde dein Risiko
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IFN-γ.....	Zytokins Interferon-gamma
KIKS.....	Künstliche Intelligenz für klinische Studie
Konz.....	Konzentration
ml.....	Milliliter
MW.....	Mittelwert
nm.....	Nanometer
POS.....	Positiv Kontrolle
PY.....	Pack Years
ROC-Kurve.....	Receiver-operating-characteristics Kurve
RT.....	Raumtemperatur
VAS.....	Visuelle Analogskala

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Die zunehmende Frakturhäufigkeit bei älteren Erwachsenen stellt für das Gesundheitssystem ein immer schwerwiegenderes Problem dar. Zwischen den Jahren 2009 und 2019 wurde ein Anstieg der Frakturinzidenzen in Deutschland um 14 % vermerkt. Fast jeder zweite Erwachsene im Alter von 55 Jahren oder älter erlitt in seinem Leben bereits eine Fraktur, wobei die weibliche Bevölkerung öfters betroffen war als die männliche (1).

In ca. 5-10 % der Fälle kommt es zu Komplikationen der Knochenbruchheilung bis hin zur Ausbildung einer Pseudarthrose (2). Bei Patienten mit Risikofaktoren kann sich diese Wahrscheinlichkeit auf über 30 % erhöhen (3). Ebenso bei Frakturen, die mit zusätzlichen Schäden der Weichteile oder Muskulatur verbunden sind, steigt die Wahrscheinlichkeit eines verzögerten Heilungsverlaufes (4).

Die Folgen solcher Komplikationen reichen von physischen und psychischen Belastungen für die Patienten (5), bis hin zu eingeschränkter Lebensqualität, sowie hohen zusätzlichen Kosten für das Gesundheitssystem (6, 7).

Diese Daten bestätigen den zunehmenden Bedarf an Präventionsmaßnahmen für Komplikationen während der Frakturheilung. Hierfür ist jedoch eine frühzeitige Identifikation von Risikopatienten unumgänglich.

1.2 Frakturheilungsprozess

Grundsätzlich ist die Art der Frakturheilung in eine direkte (primäre) und eine indirekte (sekundäre) zu unterteilen. In den meisten Fällen kommt es zu einer sekundären Frakturheilung (mit Bildung eines stabilisierenden Kallus im Frakturspalt), da eine geringe interfragmentäre Bewegung trotz guter Fixierung häufig nicht vermeidbar ist (8). Nur bei einer besonders rigiden Fixierung durch stabile Kompressionsplatten, kann es zu dem Prinzip der primären Frakturheilung kommen (9).

Die sekundäre Frakturheilung basiert auf einem natürlichen Heilungsprozess, und läuft in vier zeitlich überlappenden Phasen ab (10):

1. Inflamationsphase: Unmittelbar nach dem Auftritt der Fraktur tritt durch die Unterbrechung der Gefäßsysteme eine Hämatombildung auf und Entzündungszellen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten) wandern an die betroffene Stelle.
2. Weichgewebekallus: Das entstandene Hämatom wird nach und nach durch Knorpel- und Bindegewebe ersetzt. Dies dient als temporäre Stützstruktur des Frakturspaltes.
3. Knöcherner Kallus: Der bindegewebige, weiche Kallus wird zunehmend durch hartes Knochengewebe (harter Kallus) ersetzt. Die zunehmende Vaskularisierung des Kallus führt dazu, dass sich die Mesenchymalen Stammzellen vermehrt zu knochenbildenden Zellen differenzieren.
4. Remodellierungsphase: Der gebildete Geflecht-Knochen wird mithilfe von knochenbildenden (Osteoblasten) und knochenresorbierenden Zellen (Osteoklasten) durch Lamellenknochen ersetzt. Dieser Prozess kann über mehrere Monate andauern.

Während dem Prozess der Frakturheilung kann es zu Komplikationen und atypischen Heilungsverläufen kommen, welche durch Begleitumstände, das Trauma Ereignis selbst, verschiedenen Komorbiditäten oder durch die Behandlung entstehen können. Zu diesen Komplikationen zählen z.B. Hämatome, Infektionen oder gelockertes Osteosynthese Material, welche häufig zu einer erneuten Operation führen (11).

1.3 Zytokine und deren Rolle während der Fraktur- und Wundheilung

Bei Zytokinen handelt es sich um körpereigene Proteine (Molekulargewicht < 30 Kilodalton), welche von Zellen des Immunsystems bei Bedarf freigesetzt werden und bei der Steuerung von Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle spielen. Zu unterscheiden sind Zytokine mit entzündungsfördernder (proinflammatorischer) und entzündungshemmender (antiinflammatorischer) Wirkung (12).

Schon während der Initialphase der Frakturheilung (Inflammationsphase) wird der Heilungsprozess durch Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und dem Tumor Necrosis Faktor Alpha (TNF- α) in Gang gesetzt. Gerstenfeld *et al.* zeigte in seiner Studie, dass für eine erfolgreiche Knochenheilung ein zeitlich überlappendes Zusammenspiel von vielen verschiedenen Zytokinen entscheidend ist (13). Eine Übersicht von wichtigen Zytokinen ist in Abbildung 1 aufgezeigt.

Eine besondere Rolle während der Knochenheilung spielt der Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) und dessen Superfamilie. In der Literatur ist bereits bekannt, dass TGF- β durch das Fördern der Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten die Knochenbildung antreibt und zudem die Produktion von Kollagen und anderen extrazellulären Matrixproteinen stimuliert (14). Zimmermann *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass das Zytokin TGF- β 1 im Blutserum von Patienten mit verzögerter Frakturheilung vier Wochen nach Trauma Zeitpunkt signifikant niedrigere Konzentrationen aufwies als bei Patienten mit regulärem Knochenheilungsverlauf. Diese Erkenntnis lieferte somit erste Hinweise, dass TGF- β 1 auch als potentieller prädiktiver Zytokin-Serummarker für verzögerte Frakturheilung dienen könnte (15).

Die genaue Funktion aller Zytokine während der Knochen- und Wundheilung, sowie deren gegenseitigen Beeinflussung bedarf jedoch noch weiterer Forschung (15).

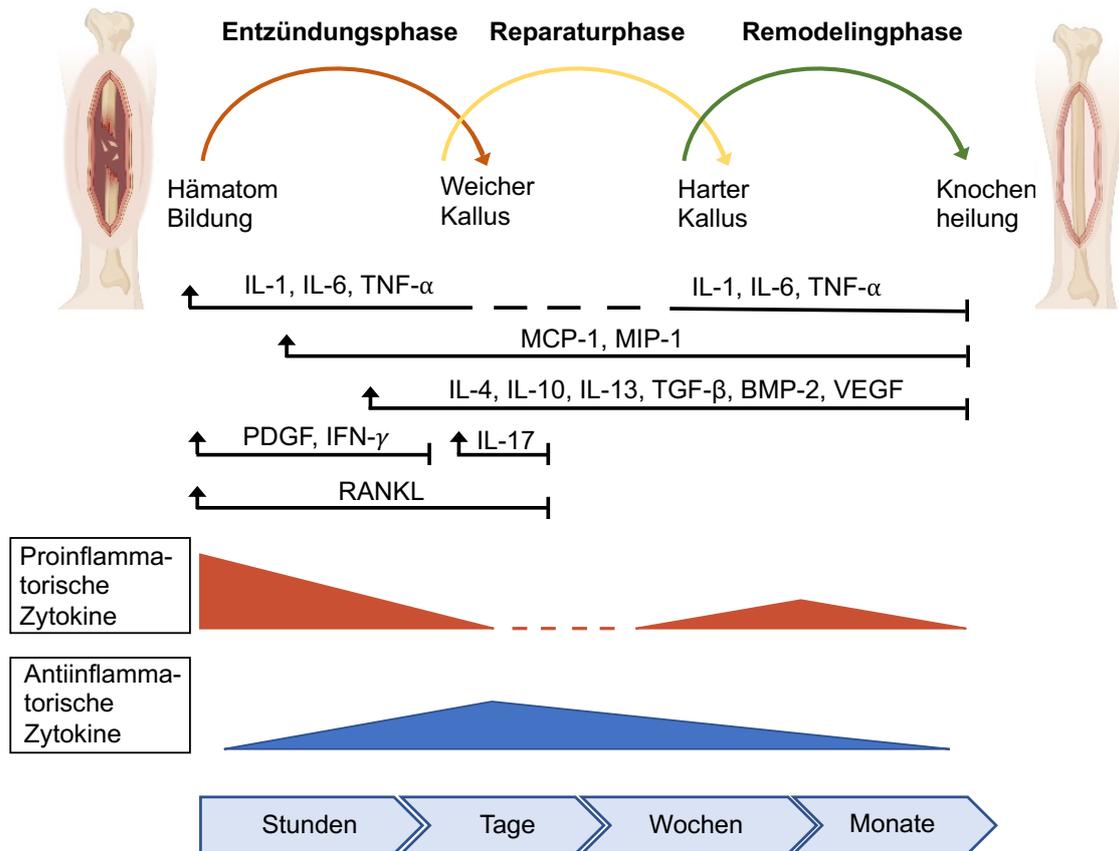


Abbildung 1: Beteiligte Zytokine während des Frakturheilungsprozesses. In Anlehnung an Maruyama et al. (16). Erstellt mit BioRender®.

1.4 Risikofaktoren postoperativer Komplikationen

1.4.1 Mechanische Einflussfaktoren

Während der Frakturheilung können unterschiedliche mechanische Faktoren den Heilungsprozess beeinflussen. Es kann zu Plattenlockerungen und damit einhergehenden mangelnden Rigidität mit vergrößertem Frakturspalt kommen, was nachweislich die Frakturheilung verzögern kann (17). Darüber hinaus kann auch ein zu steif befestigter Bruchspalt durch fehlende Stimulation zu Heilungsschwierigkeiten führen (18). In seltenen Fällen kommt es zu einem kompletten Materialversagen (11).

1.4.2 Raucher

Der Effekt des Konsums von Zigaretten auf die Fraktur- und Wundheilung wird bereits seit vielen Jahren erforscht. Raucher weisen nicht nur eine signifikant längere Frakturheilung auf, auch die Gefahr eines komplikationsreichen,

postoperativen Verlaufs nimmt mit dem Konsum von Zigaretten zu (19-21). Durch den Nikotinkonsum wird die Durchblutung und Sauerstoffversorgung im Gewebe beeinträchtigt und dadurch die Wundheilung maßgeblich erschwert (22). Eine weitere Ursache für den erschwerten Heilungsprozess bei Rauchern ist eine eingeschränkte Immunreaktion (23, 24). Lindström *et al.* bewiesen zudem in ihrer Studie einen positiven Effekt einer vierwöchigen präoperativen und vierwöchigen postoperativen Nikotinabstinenz auf die Frakturheilung (25).

1.4.3 Fortgeschrittenes Alter

Mit steigendem Alter verlieren mesenchymale Stammzellen zunehmend ihre Differenzierungsfähigkeit und ihre Lebensdauer ist verringert, was wiederum eine geringere Anzahl an Osteoblasten und deren knochenbildenden Aktivität bedeutet. Eine gleichzeitige Zunahme an oxidativem Stress und proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF- α führt zu einer Verstärkung der Osteoklastogenese. Dies führt im Alter zu einer geringeren Knochenmineraldichte (26) und einer verzögerten Frakturheilung (27). Eine verminderte Produktion an Vitamin-D in der Haut, geringe körperliche Aktivität und Regenerationsfähigkeit erhöhen zudem das Risiko für Osteoporose im Alter um ein vielfaches (28). Osteoporose tritt durch den postmenopausalen Östrogenmangel vor allem bei Frauen im Alter von über 65 Jahren auf und steht im direkten Zusammenhang mit dem Auftreten einer verzögerten Frakturheilung (29, 30).

1.4.4 Immunsystem

Ein intaktes Immunsystem ist für den gesamten Knochenstoffwechsel und damit auch für den Reparaturvorgang nach Verletzungen besonders wichtig. Autoimmunerkrankungen gehen häufig mit einem größeren Risiko für das Auftreten von Osteoporose und Frakturen einher (31). Der Zusammenhang von chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus und dem Auftreten von komplikationsreichen postoperativen Verläufen während der Frakturheilung konnte mehrfach bestätigt werden (32, 33).

T-Lymphozyten, kurz T-Zellen, präsentieren einen essenziellen Bestandteil des adaptiven Immunsystems und übernehmen eine Schlüsselrolle bei der

Identifikation und Eliminierung von Infektionen sowie bei der Regulation von abnormen Zellen im Organismus. Durch die Differenzierung und Reifung im Thymus, einem lymphatischen Organ, entwickeln T-Zellen spezifische Oberflächenrezeptoren. Diese Rezeptoren ermöglichen es den T-Zellen, antigenspezifische Erkennungsmechanismen auszubilden und so auf Fremdstoffe und Pathogene im Organismus zu reagieren (34).

Unabhängig von definierten Krankheiten stellten Wissenschaftler fest, dass eine bestimmte Art an T-Zellen (CD8+ T_{EMRA}-Zellen) in erhöhter Konzentration zu einer verzögerten Frakturheilung beitragen. CD8+ T_{EMRA}-Zellen produzieren unter anderem proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ und TNF- α und tragen so zu einer krankhaften Bindegewebsvermehrung und einer eingeschränkten Knochenbildung bei (35).

1.4.5 BMI

Der Body Mass Index (BMI) dient als Bewertungsmaßstab von Über- oder Untergewicht und ist verbunden mit dem Risiko an chronischen Krankheiten zu erkranken (36).

Bei Patienten mit einem erhöhten BMI (kg/m²) wurde ein Zusammenhang mit der Entstehung von komplikationsreichen Verläufen, insbesondere der Entstehung von Wundinfektionen beobachtet. Darüber hinaus konnte auch bei Patienten mit einem BMI < 18,5 kg/m² diese Korrelation festgestellt werden (37).

1.5 Therapiemöglichkeiten bei Frakturheilungsstörungen

1.5.1 Bone morphogenetic proteins (BMPs)

BMPs gehören zur Superfamilie der TGF- β Proteine und spielen während der Knochen- und Knorpelentwicklung, sowie der Knochenheilung eine besondere Rolle (38). Sie tragen zur Knochenneubildung bei, indem sie die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu knochenbildenden Zellen induzieren können (39).

Bereits seit dem Jahr 2002 werden BMPs (vor allem BMP-2 und BMP-7) auch in der Therapie von schwer heilenden Frakturen eingesetzt. Studien beweisen

durch den Einsatz solcher Knochenwachstumsfaktoren, auch bei bereits mehrfach operierten Brüchen, eine Heilungschance von bis zu 92 % (40). Vor allem die klinische Wirksamkeit von BMP-7 konnte mehrfach positiv bestätigt werden (40, 41). Darüber hinaus kann der therapeutische Einsatz von BMPs zu wirtschaftlichen Einsparungen und Verbesserung des Patientenwohls führen. Dennoch konnte eine Etablierung von BMPs im klinischen Alltag bislang nicht flächendeckend durchgesetzt werden. Die klinischen Erfolgsaussichten dieser Therapie bleiben ungewiss, während die Erstattung durch Krankenkassen bisher schwierig ist (42).

1.5.2 Elektromagnetisches Feld

Durch die Knochenstimulation durch elektromagnetische Felder wird nicht nur die Proliferation von Knochenbildenden Zellen gefördert (43), sondern es konnte auch ein positiver Effekt auf Bindegewebszellen bestätigt werden (44). Eine *in vitro* Studie von Ehnert *et al.* zeigte, dass mit einem extrem niedrigfrequentierten elektromagnetischen Feld eine verbesserte Osteoblastenfunktion erreicht werden konnte, ohne dabei die Osteoklastenfunktion zu stimulieren (45).

Die Effektivität der Behandlung von nicht heilenden Brüchen mithilfe von elektromagnetischen Feldern wurde bereits im Jahr 1974 von Bassett *et al.* erkannt (46). Seither konnten einige Studien den positiven Nutzen dieser Therapie bestätigen, allerdings waren die Ergebnisse nicht ausreichend, um eine standardmäßige Etablierung bei schwer heilenden Brüchen durchzusetzen (47, 48).

1.5.3 Mesenchymale Stammzellen

Bei mesenchymalen Stammzellen handelt es sich um reife bzw. adulte Stammzellen, welche die Fähigkeit der Differenzierung zu verschiedenen Zelltypen (z.B. Osteoblasten, Knorpelzellen oder Fettzellen) aufweisen. Die aus dem Knochenmark, Fettgewebe oder Beckenkamm gewonnenen Zellen werden durch ihre Differenzierungsfähigkeit bereits in der regenerativen Medizin eingesetzt (49). Zudem gibt es erste Erkenntnisse über die Effektivität der Kombination von BMP-7 und mesenchymalen Stammzellen bei nicht heilenden Brüchen (50). Die Anwendung während der chronischen Entzündungsphase

konnte dem Prozess der Knochenheilung positiv beitragen. Der richtige Zeitpunkt der Anwendung dieser Therapiemöglichkeit ist jedoch von besonderer Wichtigkeit, da das Einsetzen von mesenchymalen Stammzellen während der akuten Entzündungsphase der Knochenheilung auch zu negativen Auswirkungen führen kann (51).

1.6 Einordnung der vorliegenden Studie in das KIKS-Projekt

Die Patienten der vorliegenden Studie wurden im Rahmen des Projektes der „künstlichen Intelligenz für klinische Studien (KIKS)“ in die Datenbank aufgenommen. Bei dem KIKS-Projekt handelt es sich um ein Digitalisierungsprojekt, welches eine sektorenübergreifende Digitalisierung von Patientendaten anstrebt. Im Rahmen dieses Projektes werden in der berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik (BGU) Tübingen stationäre Patienten aus den Bereichen Traumatologie, Endoprothetik, geriatrische Traumatologie (ATZ), sowie ‚septische‘ Unfallchirurgie durch Doktorand/-innen und Mitarbeiter/-innen des klinischen Studienzentrums der BGU Tübingen in die Datenbank aufgenommen. Dadurch wird eine Art „Patientenpool“ aufgebaut, welcher unter Berücksichtigung des Datenschutzes in der Zukunft auch weiteren Kliniken zur Verfügung stehen soll. Als eine Art „digitales Ökosystem“ soll das Projekt auch die Medizintechnik in den Punkten Ökonomie und Qualitätssicherung weiterbringen und klinische Studien in einem hohen Maß einfacher und schneller vorantreiben (52). Für die vorliegende Studie wurden ausschließlich Daten der Trauma-Patienten aus der KIKS-Dokumentation analysiert.

1.7 Ziele und Fragestellung der vorliegenden Studie

Wie zuvor beschrieben, sind bereits einige Risikofaktoren für verzögerte Frakturheilungen bekannt (siehe Kapitel 1.4). In vielen Fällen werden die Patienten allerdings zu wenig über ihr vorhandenes Risiko aufgeklärt und aktive Präventionsmaßnahmen fallen nur geringfügig aus. Darüber hinaus ist über die Funktion von Zytokinen als Risikomarker für verzögerte Frakturheilungen bislang wenig bekannt.

Anhand der Microarrays und ELISAs soll in der vorliegenden Studie erforscht werden, ob bestimmte Zytokine postoperative Komplikationen von Trauma-

Patienten vorhersagen könnten. Zudem sollen durch die Auswertung der Fragebögen zusätzliche Risikofaktoren bestimmt werden können. Ein wünschenswertes Ziel ist es, bereits vor der Operation anhand des Anamnesebogens und einer Blutuntersuchung erkennen zu können, welche Trauma-Patienten ein erhöhtes Risiko für einen komplikationsreichen Heilungsverlauf haben. Auch wenn es sich bei dem Gesundheitszustand, Geschlecht oder Lebensumstände der Patienten um nicht-modifizierbare Faktoren zum Zeitpunkt der Fraktur handelt, besteht ein potenzieller Nutzen darin, Personen mit einem erhöhten Risiko für Komplikationen zu identifizieren. Anhand dieses Wissens könnte in Zukunft durch angepasste Therapieansätze das postoperative Komplikationsaufkommen bei Trauma-Patienten reduziert oder gar verhindert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Alle Patienten der vorliegenden klinisch-experimentellen Studie befanden sich aufgrund von Traumata der Extremitäten oder der Wirbelsäule in stationärer Behandlung an der BGU in Tübingen. Nach freiwilliger Zustimmung der Teilnahme und unterschriebener Datenschutzerklärung, füllten die Patienten einen Erhebungsbogen mittels iPad aus. Sofern die Patienten zustimmten, wurde zusätzlich zur Befragung eine venöse Blutabnahme mittels EDTA- und Serum-Röhrchen durchgeführt, um später die Zytokin Profile der Patienten zu bestimmen.

Zur Erfassung des postoperativen Verlaufs wurden die eingeschlossenen Patienten nach drei Monaten im Rahmen eines Follow-ups (siehe Kapitel 2.7) über ihren bisherigen postoperativen Verlauf befragt. Um Komplikationen bestimmen zu können, wurden dabei jegliche Abweichungen aus der Befragung und der Patientenakte dokumentiert.

Für die Bestimmung des Komplikationsgrades wurde die Clavien-Dindo (CD) Klassifikation (53) (siehe Tabelle 1) verwendet. Hierfür wurden die Angaben des Follow-ups und die ärztlichen Diagnosen der routinemäßigen, postoperativen Kontrolluntersuchung (entnommen aus dem Kliniksystem Medico) genutzt. Anhand dieser Klassifikation wurden die Patienten in Komplikationsgruppen und Kontrollgruppen für die weitere Analyse eingeteilt.

Mit den gewonnenen Blutproben wurde durch die Methode der Microarrays die relative Expression von verschiedenen Zytokinen im Blut bestimmt.

Im Anschluss an die Microarrays wurden für bestimmte Zytokine die Konzentrationen mit Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) quantifiziert und mit den Daten aus dem klinischen Verlauf korreliert, um potenzielle Risikopatienten zu identifizieren.

Tabelle 1: Klassifikation nach Clavien-Dindo (53)

Grad	Definition
I	Jede Abweichung vom normalen postoperativen Verlauf, ohne Notwendigkeit einer pharmakologischen Behandlung, chirurgischer, radiologischer oder endoskopischer Intervention. Erlaubte Therapien sind: Medikamente wie Antiemetika, Antipyretika, Analgetika, Diuretika und Elektrolyte sowie Physiotherapie. Zu diesem Grad gehören auch Wundinfektionen, die am Krankenbett eröffnet werden.
II	Komplikationen, welche eine pharmakologische Behandlung, Bluttransfusion oder eine parenterale Ernährung benötigen
III	Komplikationen, die eine chirurgische, endoskopische oder radiologische Intervention erforderlich machen
IIIa	- Intervention in Lokalanästhesie
IIIb	- Intervention in Allgemeinanästhesie
IV	Lebensbedrohliche Komplikationen, welche eine intensivmedizinische Behandlung erfordern
IVa	- Dysfunktion eines Organs
IVb	- Multiorgandysfunktion
V	Tod des Patienten

2.2 Gutachten der Ethikkommission

Das Gutachten der Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen am 08.07.2020 unter der Projekt-Nummer: 346/2015BO2 geprüft und genehmigt.

2.3 Aufnahme der Patienten in die Studie

Bei den Patienten der vorliegenden Studie handelt es sich ausschließlich um Trauma-Patienten des Trauma Level 1 Centers der BG Klinik Tübingen, wobei Polytraumata, Traumata aus dem Bereich Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie, sowie Handverletzungen ausgeschlossen wurden. Die ausführliche Aufklärung über den Datenschutz fand über einen Broad Consent (umfassende Datenschutzerklärung für allgemeine Forschungszwecke) statt. Alle Patienten haben eine Kopie der unterschriebenen Datenschutzerklärung ausgehändigt bekommen und wurden ausführlich über einen jederzeit möglichen Austritt aus der Studie informiert. Um an der Studie teilzunehmen, musste die Einwilligung an

der Studie und die selbstständig unterschriebene Datenschutzerklärung vorliegen. Die Patientendaten wurden verschlüsselt und mittels einer Studiennummer (Studien-ID) codiert. Ein Zugang zu den unverschlüsselten Patientendaten stand nur dem Doktorvater, dem Mentor, der Betreuerin und der Doktorandin zu.

2.4 Einschlusskriterien

- Freiwillige Teilnahme an der Studie mit unterschriebener Datenschutzerklärung
- Diagnostizierte Fraktur der Extremitäten oder der Wirbelsäule
- Operativer Eingriff
- Alter zwischen 18 und 69 Jahren (ab 70 Jahren Einstufung in ATZ)
- Kognitiv uneingeschränkt
- Gute Deutschkenntnisse

2.5 Befragung der Patienten

Die Beantwortung der Fragebögen für die Datenerhebung wurde im Rahmen des KIKS-Projektes mittels iPad durch die Patienten selbst durchgeführt. Nur in einzelnen Fällen wurden z.B. ältere oder motorisch eingeschränkte Patienten durch Studenten oder Mitarbeiter der BGU Tübingen befragt.

2.5.1 Allgemeiner Teil

Zunächst wurden allgemeine Daten wie Alter, Geschlecht und Trauma-Zeitpunkt dem Krankenhausinformationssystem (Medico) entnommen und notiert. Daten wie die Krankenhausverweildauer wurden nachträglich ermittelt.

2.5.2 FINDRISK

Der Finnish Diabetes Risk Score (FINDRISC) dient der Einschätzung des Risikos in den nächsten 10 Jahren an Diabetes mellitus Typ-2 zu erkranken. In der vorliegenden Studie wurde die deutsche Version: „Finde dein Risiko“ (FINDRISK) verwendet, welche an die deutsche Bevölkerung angepasst wurde (54). Hierbei werden acht Fragen einbezogen und den Antworten Punkten zugeteilt. Je höher der ermittelte Punktwert desto höher ist das Risiko in den nächsten zehn Jahren an Diabetes zu erkranken.

2.5.3 Alkoholkonsum

Der Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) wird als Screening-Score in Bezug auf eine mögliche Alkohol-Abhängigkeit verwendet. In der vorliegenden Studie wurde eine verkürzte Version genutzt (AUDIT-C der Weltgesundheitsorganisation), bei der nur die ersten drei Fragen abgefragt werden (siehe Anhang: Fragebögen). Diese beziehen sich nur auf die Menge und Häufigkeit des Alkoholkonsums. Für jede beantwortete Frage werden Punkte vergeben, wodurch am Ende ein Score zwischen 0 und 12 Punkten erreicht werden kann. Auch hier zeigt ein höherer Score einen riskanten Alkoholkonsum an (ab 5 Punkte bei Männern/ ab 4 Punkte bei Frauen).

2.5.4 Rauchverhalten

Das Rauchverhalten wurde durch den Ultrakurzfragebogen des Robert-Koch-Instituts dokumentiert (siehe Anhang: Fragebögen). Wenn die Patienten aktuell oder früher geraucht haben, wurde durch den zweiten Fragenkomplex näher über die Menge und Dauer des Konsums abgefragt. Dadurch konnte die Anzahl der Pack Years (PY) berechnet werden. Eine Zigarettenpackung wird mit 20 Zigaretten berechnet.

Anzahl PY =

(Pro Tag gerauchte Zigarettenpackungen) x (Anzahl Raucherjahre)

2.5.5 Komorbiditäten

Besonders die Multimorbidität (Vorhandensein von zwei oder mehr chronischen Erkrankungen) stellt für das Gesundheitssystem eine immer größer werdende Herausforderung dar, da die Versorgung dieser Patienten im Krankenhaus, deutlich zeit- und kostenintensiver ist (55). Zudem werden in der Literatur Komorbiditäten häufig in den Zusammenhang mit dem Auftreten von Knochen- und Wundheilungsstörungen gebracht (56, 57). Daher wurde die Anzahl der vorhandenen Komorbiditäten der Patienten notiert und im Zusammenhang mit dem Auftreten von komplikationsreichen, postoperativen Verläufen analysiert.

2.6 Probengewinnung und Verarbeitung

Die Probengewinnung erfolgte während einer routinemäßigen Blutabnahme in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen. Es liegen sowohl präoperative als auch postoperative Blutabnahmen vor, da eine einheitliche präoperative Blutabnahme aus logistischen Gründen nicht möglich war.

Mithilfe einer Safety-Multifly®- Kanüle wurden 7 ml venöses Blut entnommen (1x Serum-Röhrchen, 1x EDTA-Röhrchen). Bei der Blutentnahme wurde stets auf eine korrekte und hygienisch sichere Durchführung geachtet, sowie eine Stauungszeit von maximal 30 bis 60 sec eingehalten. Die beiden Blut-Röhrchen wurden für mindestens 30 bis maximal 60 min auf Eis gelagert, um eine vollständige Gerinnung zu gewährleisten. Anschließend wurde das Blut in den Monovetten bei 1000 G für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Blut in sieben verschiedene Eppendorf Mikroreaktionsgefäße (Eppis) pipettiert (3 x 450 µl Serum, 3 x 450 µl EDTA-Plasma, 1 x 450 µl Vollblut) und zur Konservierung bei - 80 °C eingefroren. Für die Microarrays wurde in dieser Studie nur das Blutserum verwendet, wobei für die Durchführung der ELISAs sowohl das Blutserum als auch EDTA-Plasma genutzt wurde.

2.7 Follow-up

Von wesentlicher Bedeutung waren die Follow-ups, bei denen die Patienten nach drei Monaten anhand eines Erhebungsbogens über ihren aktuellen Gesundheitszustand befragt wurden. Für die spätere Analyse war eine Zustimmung und ein erfolgtes drei-Monats-Follow-up der Patienten eine weitere Voraussetzung.

In dem Erhebungsbogen wurden zunächst wieder allgemeine Daten wie aktuelles Körpergewicht, allgemeiner Gesundheitszustand und Wohnverhältnisse abgefragt. Des Weiteren wurde explizit gefragt, ob der postoperativen Heilungsverlauf wie erwartet, prolongiert oder mit Komplikationen stattgefunden hat. Vermerkt wurden alle nach der Entlassung stattgefundenen Operationen, aktuell bestehende Krankschreibungen und Einschränkungen in der Mobilität und Alltagsbewältigung.

Während bei den Patienten, welche durch das Softwaresystem Klido in die Studie aufgenommen wurden, das Follow-up ausschließlich per telefonischer Befragung stattgefunden hat, konnte der Fragebogen bei Heartbeat medical automatisch per E-Mail an die Patienten gesendet werden. Lediglich die Patienten, die nach dreimaliger Verschickung des Fragebogens nicht auf die E-Mail reagiert haben oder keine E-Mail-Adresse angegeben hatten, wurden telefonisch kontaktiert.

2.8 Bestimmung des Komplikationsgrades

Mithilfe der Follow-ups und zusätzlicher ärztlicher Diagnose der postoperativen Kontrolluntersuchung konnte erfasst werden, ob die Patienten von einer postoperativen Frühkomplikation (innerhalb der ersten drei Monate postoperativ) betroffen waren. Um die Arten der Komplikationen vergleichbarer zu machen, wurde das Ausmaß der Komplikation in die Clavien-Dindo Klassifikation (siehe Tabelle 1) eingeteilt, wobei die Patienten der vorliegenden Studie ausschließlich die Grade I-III aufwiesen. Gründe für die Einstufung in Grad I waren häufig persistierende Schmerzen und/oder Schwellungen im betroffenen Bereich. Die Komplikationspatienten mit Grad III erlitten überwiegend leichte bis mittelschwere Wundheilungsstörungen, wodurch eine erneute Intervention in Lokalanästhesie (Grad IIIa) oder Allgemeinanästhesie (Grad IIIb) durchgeführt werden musste. Da lediglich ein Patient einen Clavien-Dindo Grad II aufwies, und es sich hierbei um eine mittelschwere Wundheilungsstörung (konsolidierte Wunde mit oberflächlich verzögerter Wundheilung) handelte, wurde dieser Patient zu der Komplikationsgruppe III gezählt. Patienten ohne Komplikationen dienten als Kontrollgruppe.

2.9 Studienpopulation

Der Zeitraum der Patientenaufnahme für die vorliegende Studie startete am 03.05.2021 und endete am 07.07.2022. Das letzte Follow-up wurde am 09.11.2022 erledigt.

2.10 Matching

Für das bestmögliche Matching wurde jeweils ein Patient aus der Komplikationsgruppe mit einem Patienten aus der Kontrollgruppe „gematcht“. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die gematchten Patienten in Geschlecht,

Alter, Rauchverhalten, Menge an Alkoholkonsum und Summe des FINDRISK Scores vergleichbare, dokumentierte Angaben aufwiesen.

2.11 Methode der Microarrays

Im nächsten Schritt der Studie wurde die Methode der Microarrays durchgeführt, um relevante Zytokine und deren relative Expression zu ermitteln. Insgesamt wurden vier Microarrays der Firma RayBio® durchgeführt (siehe Tabelle 2). Der Human Cytokine Antibody Array C5 und Human Immune Checkpoint Array 1 wurden für diese Studie ausgewählt, da auf den Membranen dieser Microarrays Zytokine (Targets) enthalten sind (siehe Anhang), welche für das Immunsystem von Bedeutung sind. Auf den Membranen des Human Angiogenesis Antibody Array C2 und Human TGFβ Array 2 sind entsprechende Zytokine enthalten, welche eine wichtige Rolle während der Knochenheilung spielen.

Tabelle 2: Übersicht der durchgeführten Microarrays mit Anzahl der detektierten Zytokine pro Membran.

Microarray (Firma: RayBio®)	Anzahl der Zytokine (Targets)
Human Cytokine Antibody Array C5	80
Human Immune Checkpoint Array 1	23
Human Angiogenesis Antibody Array C2	23
Human TGFβ Array 2	25

Als Proben wurden die Seren einer Gruppe zu einem Serum-Pool gemischt und als eine Probe auf die Membran aufgetragen. Um Schwankungen der Serumqualität innerhalb einer Studiengruppe zu minimieren, wurden die Serumproben der jeweiligen Studiengruppe zusammen in einem Mikroreaktionsgefäß homogen vermischt (Serum-Pool) und bei - 80 °C eingefroren.

Alle Zytokin Arrays wurden sorgfältig unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Arrays wurden entsprechend der Herstellervorgaben durchgeführt. Um eine gleichmäßige Verteilung der Lösungen auf den Membranen zu gewährleisten,

fanden alle Inkubations- und Waschdurchgänge unter sanften Rotationsbewegungen statt. Bei dem Umgang mit den Membranen wurde stets darauf geachtet, dass nur der nicht bedruckte Teil (Ränder) mit der Pinzette berührt wurde. Jeder Serum-pool wurde in zwei Durchläufen (Duplikate) analysiert.

Zunächst wurden die Membranen mit der bedruckten Seite nach oben vorsichtig in ein Inkubationstablett gelegt. Anschließend wurde auf jede Membran 1 ml Blocking Buffer pipettiert und eine Inkubationszeit von 30 Minuten eingehalten. Die zuvor hergestellten Serum-Pools wurden auf Eis vollständig aufgetaut, mithilfe eines Vortex Schüttlers gut vermischt und jeweils 200 µl Serum-pool zu dem Blocking Buffer hinzugefügt. Um eine ausreichende Inkubationszeit zu erreichen, wurden die Membranen mit den Serumproben über Nacht bei 4 °C gelagert. Am zweiten Tag wurde mit dem ersten Waschvorgang begonnen. Hierzu wurde jede Membran 3 x mit 1 ml Wash Buffer I und 2 x mit 1 ml Wash Buffer II für jeweils 5 Minuten gewaschen. Danach wurde 1 ml des biotinylierten Antibody Cocktails auf jede Membran pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Membranen erneut 3 x mit 1 ml Wash Buffer I und 2 x mit 1 ml Wash Buffer II für jeweils 5 Minuten gewaschen. Im Anschluss wurde 1 ml der Streptavidin-HRP Lösung auf jede Membran aufgebracht und bei RT für 2 Stunden inkubiert. Danach erfolgte der nächste Waschvorgang mit 3 x mit 1 ml Wash Buffer I und 2 x mit 1 ml Wash Buffer II für jeweils 5 Minuten. Für die Chemilumineszenz Erfassung wurde der letzte 1 ml Wash Buffer II entfernt, die Membranen auf eine Glasplatte gelegt und ca. 300 µl der enhanced chemiluminescence (ECL)-Lösung auf jede Membran pipettiert. Hierbei wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Lösung gleichmäßig auf der Membran verteilt wurde. Anschließend wurde die Glasplatte mit den Membranen in den ChemoCam Imager gelegt und auf eine optimale Belichtung geachtet.

In Abbildung 2 wurde der Ablauf der Microarrays bildlich dargestellt.

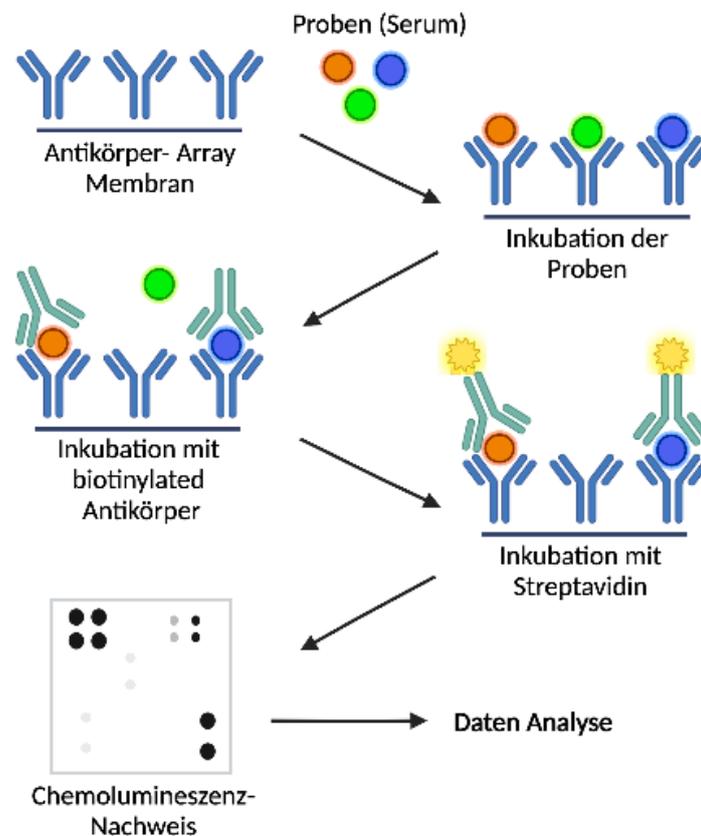


Abbildung 2: Ablauf der Microarrays. Nach Protocol „RayBio® C-Series Human Cytokine Antibody Array C5“. Erstellt mit BioRender®.

2.12 Auswertung der Microarrays

Jede Probe wurde in Duplikaten durchgeführt. Auf der Membran des C5 Microarrays war jedes Zytokin (Target) einmal vorhanden, auf den anderen Arrays war jedes Target zweimal vorhanden.

Um die Signalintensitäten der Targets in numerischer Weise zu vergleichen, erfolgte die Auswertung mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ. Um die Signaldichten der Targets möglichst genau zu messen, wurde zuerst der Hintergrund subtrahiert. Es wurden je neun Belichtungszeiten ausgewertet. Anschließend wurde die gemessene Intensität der Negativ-Kontrolle von den restlichen Werten abgezogen. Um die Signalintensitäten zwischen den Membranen vergleichen zu können, wurden die Daten auf den jeweiligen Mittelwert (MW) der Positiv Kontrolle (POS) normalisiert.

Im nächsten Schritt wurde der MW eines Zytokins über alle Gruppen berechnet und die einzelnen gemessenen Signalintensitäten auf diesen MW normalisiert.

Anschließend wurde die Differenz zwischen Komplikationsgruppe und Kontrollgruppe berechnet und das Signifikanzniveau auf > 40 % Differenz festgelegt.

2.13 Messung der Zytokin Konzentrationen mittels ELISA

Für die Quantifizierung der Zytokin-Konzentrationen im Blut der Patienten, wurde die Methode der Sandwich-ELISAs durchgeführt. Bei dieser Methode kamen ELISAs der Firma R&D Systems® (ELISA Duo Sets) und der Firma Peprotech® (ABTS ELISA Development Kits) zum Einsatz (Versuchsprotokolle siehe Anhang). Die Durchführung erfolgte streng nach Herstellerangaben. Alle Waschvorgänge wurden unter den gleichen Bedingungen mit jeweils 4x Wasch-Puffer (0,05 % Tween-20 in PBS) durchgeführt. Die Inkubationsschritte erfolgten bei leichter Rotationsbewegung und bei RT.

Zunächst wurden 96-well-Mikrotiterplatten mit dem entsprechenden Capture „Fang“ Antikörper (AB) vorbereitet und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten 4 x mit Wasch Puffer gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu verhindern erfolgte im nächsten Schritt eine einstündige Inkubation mit 150 µl/well Block-Puffer (1 % BSA in PBS). Nach einem weiteren Waschvorgang mit 4 x Wasch-Puffer, wurden die Proben in Duplikaten auf die wells gegeben und eine Inkubationszeit von 2 Stunden eingehalten. Bei jeder ELISA-Platte lief eine Standardreihe (S1-S8) in Triplikaten mit. Im Anschluss wurde nochmals mit 4 x Wasch-Puffer gewaschen und dann der Detektion AB in entsprechender Konzentration für 2 Stunden inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschvorgang mit Wasch-Puffer. Danach wurde das Streptavidin-HRP (Peprotech®: Avidin-HRP) auf die Wells pipettiert und eine Inkubationszeit von 20 Minuten (Peprotech®: 30 Minuten) bei RT und Schutz vor Tageslicht eingehalten. Nachdem die wells ein letztes Mal mit Wasch-Puffer gewaschen wurden, konnte die Substratlösung (Peprotech®: ABTS-Lösung) in die Wells gegeben werden und für 40 Minuten bei RT und Schutz vor Tageslicht die

Farbreaktion stattfinden. Mit der Zugabe von 50 µl 2 N H₂SO₄ wurde die Farbreaktion gestoppt und bei einer Wellenlänge von 450 nm die optische Dichte im Photometer gemessen (Peprotech®: keine Stopplösung wird verwendet, Messung der optischen Dichte nach einer Inkubationszeit von 60 und 90 Minuten bei 405 nm). Der Hintergrund wurde bei 540 nm gemessen (Peprotech®: 650 nm).

Tabelle 3: Übersicht der unterschiedlichen Konzentrationen und Verdünnungen der ELISA

Hersteller	R&D Systems®					Peprotech®		
ELISA	B7-1	B7-2	TIM-1	TGFβ-2	CTLA-4	PIGF-1	BMP-2	IL-1β
Capture-AB	4 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml
Standard	15,6-1000 pg/ml	31,3-2000 pg/ml	7,8-1000 pg/ml	15,6-1000 pg/ml	15,6-1000 pg/ml	32-2000 pg/ml	47-3000 pg/ml	8-1000 pg/ml
Proben	4:5 (EDTA)	4:5 (EDTA)	Keine Verdünnung (EDTA)	1:5 (Serum)	1:10 (Serum)	1:2 (Serum)	1:2 (Serum)	1:2 (Serum)
Detection-AB	125 ng/ml	250 ng/ml	200 ng/ml	150 ng/ml	500 ng/ml	500 ng/ml	500 ng/ml	500 ng/ml
Streptavidin-HRP/ (Peprotech®: Avidin-HRP)	1:200	1:40	1:200	1:200	1:200	1:2000	1:2000	1:2000

Die Abbildung 3 vermittelt eine exemplarische Übersicht der einzelnen Schritte für die ELISAs von R&D Systems®.

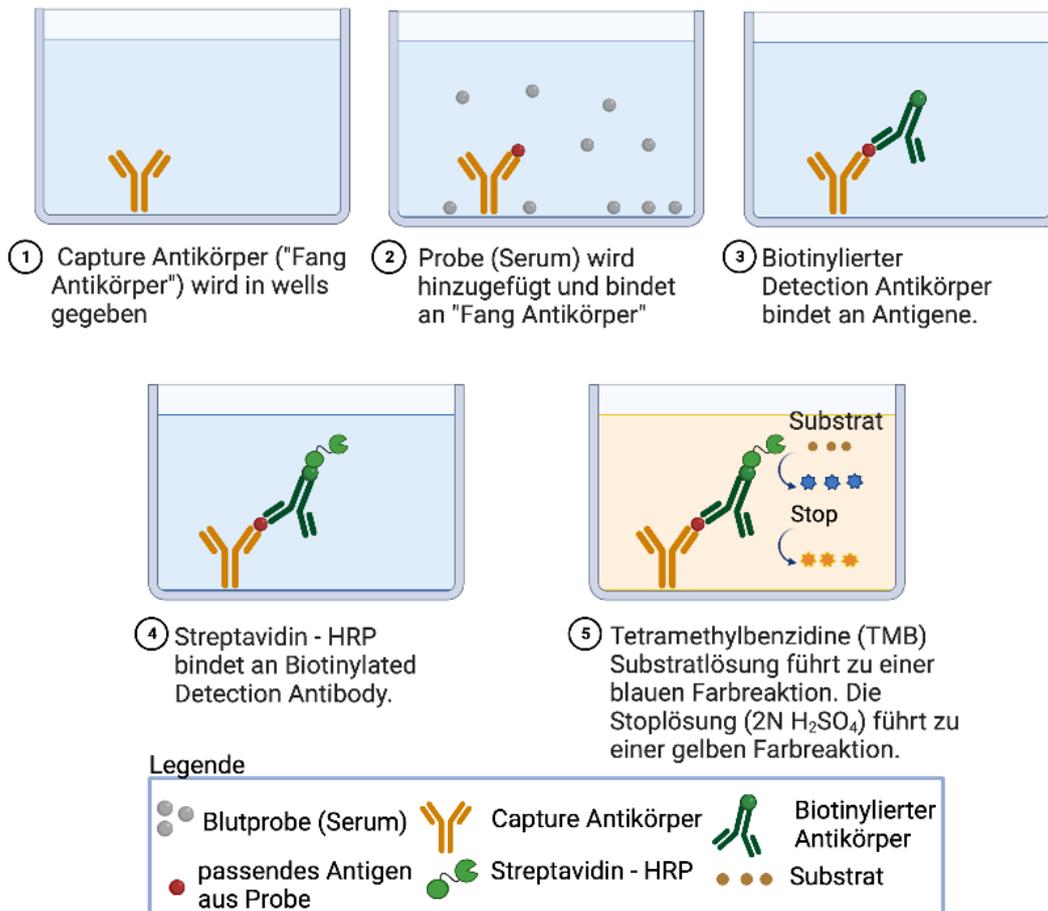


Abbildung 3: Ablauf der ELISAs (R&D Systems®). In Anlehnung an das Protokoll R&D Systems®. Erstellt mit BioRender®. Ausführliche Protokolle ELISA siehe Anhang.

2.14 ELISA Datenauswertung

Für die Auswertung wurde zunächst der Hintergrund bei 540 nm bzw. 650 nm abgezogen. Die Konzentrationen der Standardkurve wurden logarithmisch (\log_{10}) gegen die gemessene Absorption aufgetragen. So konnten die Konzentrationen der Proben ermittelt werden, welche anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert wurden, um die Konzentration in den Proben zu erhalten.

2.15 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der ermittelten Daten wurde das Statistikprogramm GraphPad Prism (Version 8, MA, USA) und JMP 16 angewandt. Für die

Darstellung der Ergebnisse wurden Tabellen, Heat Maps, Box-Plots, Violin-Plots und Receiver-Operating-Characteristics-Kurven (ROC-Kurve) genutzt.

Mithilfe einer Partition-Analyse mit dem Statistikprogramm JMP wurden die für diese Studie relevanten Fragen und mögliche Cut-off Werte ermittelt, um die Studienpopulation anhand dessen, zwischen Kontrollgruppe und Komplikationsgruppe trennen zu können. Die Cut-off Werte für die ROC-Kurven Analyse wurden mittels Youden-Index berechnet. Für den Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt, wobei das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ lag. Die jeweilige Größe einer Patientengruppe wurde mit (N) unter der jeweiligen Abbildung aufgeführt.

Eine statistische Beratung erfolgte am 23.05.2023 im Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie Tübingen durch Herrn Prof. Dr. Blumenstock.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv und Studiengruppen

Alle Patienten dieser Studie wurden aus der KIKS-Dokumentation entnommen. Von 379 dokumentierten Trauma-Patienten wurden 92 Patienten ausgeschlossen, bei denen keine Zustimmung für das Follow-up vorlag oder keine CD-Klassifikation bestimmt werden konnte. Die verbliebenden 287 Patienten wurden für die Auswertung der Fragebögen einbezogen. Bei 48 Patienten lag keine Zustimmung für die venöse Blutabnahme vor, somit ergab sich für die weiteren Laboruntersuchungen ein Patientenpool von 239 Patienten (siehe Abbildung 4).

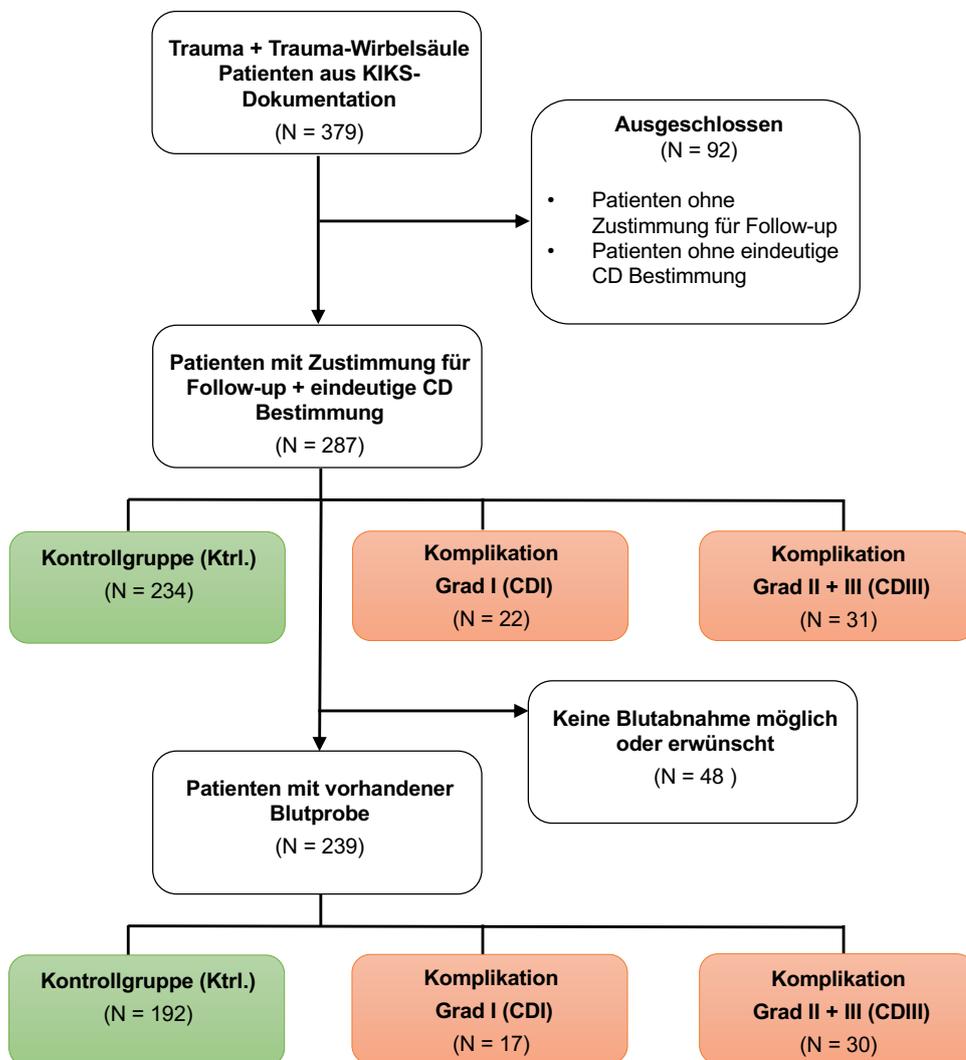


Abbildung 4: Übersicht der Fallzahlen

Weiter wurden die Patienten nach dem Geschlecht eingeteilt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Aufteilung der Patienten nach Geschlecht

Patienten		Mit Zustimmung für Follow up (N = 287)		mit vorhandener Blutprobe (N = 239)	
Geschlecht		Frauen	Männer	Frauen	Männer
Kontrollgruppen		N = 103	N = 131	N = 84	N = 108
Komplikationsgruppen	CDI	N = 10	N = 12	N = 9	N = 8
	CDIII	N = 13	N = 18	N = 13	N = 17

Nach statistischer Beratung wurde eine Mindestgruppengröße von N = 10 eingehalten, wodurch die Grad I Komplikationen in der weiteren statistischen Auswertung nicht mit einbezogen wurden. Da die Auswertung der Fragebögen und Laboruntersuchungen eine einheitliche Analyse darstellen sollten, wurde bereits bei Auswertung der Fragebögen nur die Kontrollgruppen mit der Komplikationsgruppe CDIII mit einbezogen.

Die Komplikationsarten aller Patienten mit Grad III Komplikationen (N = 31) wurden im Folgenden in Kategorien zusammengefasst und als Kreisdiagramm dargestellt. Mit 55 % trat die Wundheilungsstörung am häufigsten als postoperative Komplikation auf.

ARTEN DER KOMPLIKATIONEN

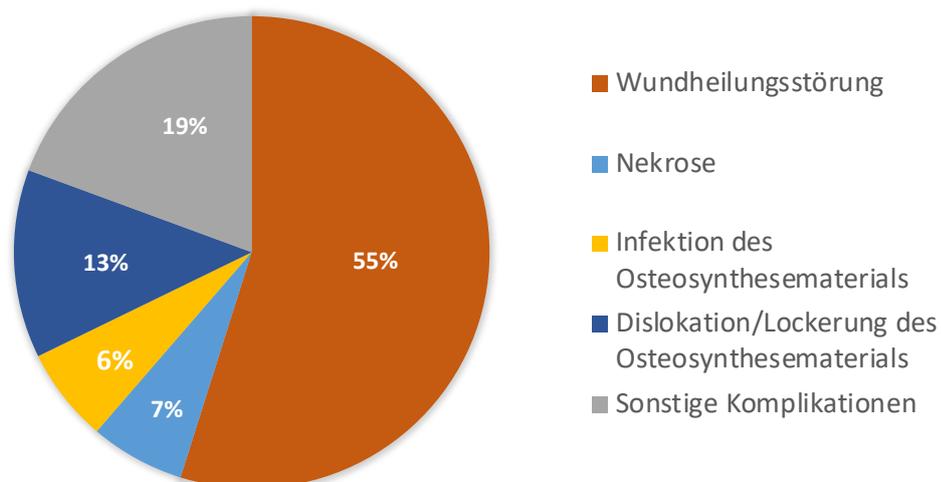


Abbildung 5: Arten der Komplikationen der Gruppe CDIII (N = 31).

3.2 Analyse des Patientenkollektivs

3.2.1 Geschlechterspezifische Unterschiede

Zunächst wurden Männer und Frauen in Bezug auf Alter, Verweildauer, Body Mass Index (BMI), Diabetesrisiko (Summe FINDRISK), Anzahl an Komorbiditäten, Rauchverhalten anhand der PY und Häufigkeit des Alkoholkonsums (aus AUDIT-C) verglichen (siehe Tabelle 5).

Interessanterweise waren Frauen im Schnitt mit 52,86 Jahren signifikant älter als Männer (44,92 Jahre). Der Vergleich der Verweildauer zeigte, dass Männer mit 9,79 Tagen im Schnitt einen dezent längeren Aufenthalt im Krankenhaus hatten als Frauen mit 8,21 Tagen. Dagegen war der durchschnittliche BMI bei Männern (26,3 kg/m²) und Frauen (26,18 kg/m²) ähnlich. Die Summe des FINDRISKS unterschied sich zwischen Männern (6,42) und Frauen (8,15) signifikant ($p = 0,0024$). Frauen litten im Durchschnitt an mehr Komorbiditäten als Männer (Frauen: 0,98 \Leftrightarrow Männer: 0,50). Das Rauchverhalten wurde anhand der PY analysiert, wobei Männer im Schnitt etwas mehr PY aufwiesen als Frauen (Frauen: 8,34 \Leftrightarrow Männer: 10,77). Auch die Summe des AUDIT-C unterschied sich signifikant zwischen Frauen und Männern (Frauen: 1,67 \Leftrightarrow Männer: 3,37; $p = < 0,0001$). Betrachtete man nur die erste Frage des AUDIT-C, zeigte sich auch hier ein signifikanter Unterschied der Punktwerte zwischen Frauen und Männern (Frauen: 1,31 \Leftrightarrow Männer: 2,08; $p = < 0,0001$).

Tabelle 5: Unterteilung der Studiengruppen in Männer und Frauen mit Darstellung des Mittelwertes, der Standardabweichung und p-Wert (mittels Mann-Whitney-Test berechnet). Männer: N = 149 (Kontrollgruppe + CDIII); Frauen: N = 116 (Kontrollgruppe + CDIII).

Parameter	Männer	Frauen	p-Wert
Ø Alter [Jahre]	44,92 ± 14,41	52,86 ± 14,32	< 0,0001*
Ø Verweildauer [Tage]	9,79 ± 9,42	8,21 ± 6,61	0,1427
Ø BMI [kg/m ²]	26,3 ± 4,26	26,18 ± 6,96	0,0634
Ø Summe FINDRISK	6,42 ± 3,68	8,15 ± 4,61	0,0024*
Ø Anzahl Komorbiditäten	0,50 ± 0,79	0,98 ± 1,28	0,0016*
Ø Anzahl PY	10,77 ± 18,41	8,34 ± 15,85	0,0477*
Ø Summe AUDIT-C	3,37 ± 2,19	1,67 ± 1,70	< 0,0001*
Ø Häufigkeit Alkoholkonsum [Punktwert AUDIT-C]	2,08 ± 1,24	1,31 ± 1,15	< 0,0001*

In der weiteren Analyse des Patientenkollektivs wurden Frauen und Männer weiterhin gesondert betrachtet und mithilfe von Box-Plot und Violin-Plot zusätzlich die Unterschiede der jeweiligen Kontrollgruppe zur Komplikationsgruppe dargestellt.

3.2.2 Frauen mit Komplikationen weisen mehr Komorbiditäten auf

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurde die Anzahl an Komorbiditäten (anhand der ICD-10 Codes) in Bezug auf das Geschlecht und die Komplikationsentwicklung der Patienten analysiert.

Folgende Krankheiten wurden hierbei mit einbezogen: Diabetes mellitus, Hypertonie, Krankheiten des Kreislaufsystems, Erkrankungen des Atmungssystems, Erkrankungen des Nervensystems, Endokrine, Ernährungs- und Stoffwechselkrankheiten, sowie psychische Krankheiten und Verhaltensstörungen.

Abbildung 6A zeigt, dass in der Komplikationsgruppe mit CDIII deutlich mehr Patienten an Komorbiditäten litten als Patienten in der Kontrollgruppe

($p = 0,0063$). Sieht man sich die Geschlechterverteilung in Abbildung 6B und C an, fällt auf, dass vor allem Frauen mit Komplikationen mehr Komorbiditäten aufwiesen ($p = 0,0001$). Bei Männern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Für Frauen stellt das Vorhandensein von Komorbiditäten somit ein Risikofaktor für das Auftreten von Komplikationen während der Knochen- und Wundheilung dar.

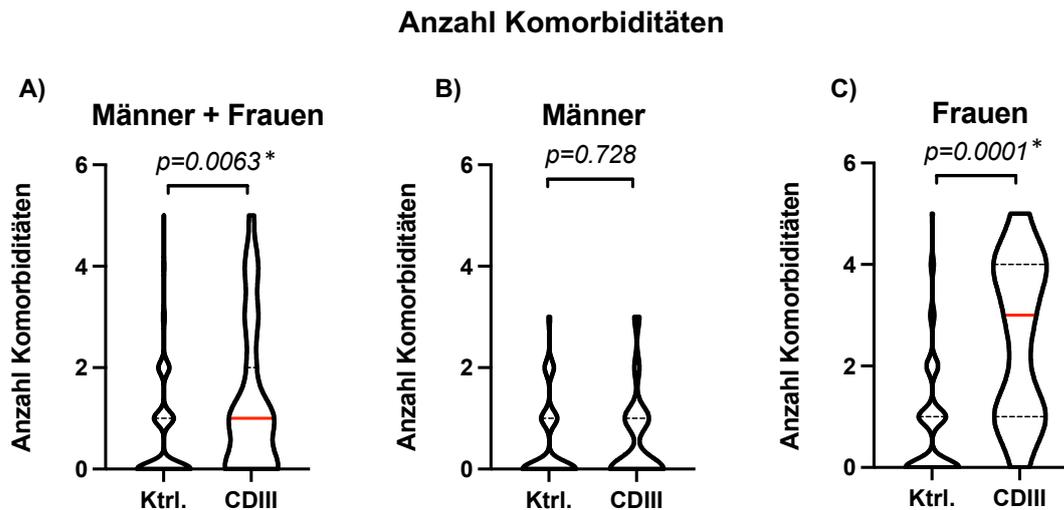


Abbildung 6: Verteilung der Anzahl an Komorbiditäten in Bezug auf das Geschlecht. A) Ktrl.: $N = 234$; CDIII: $N = 31$. B) Ktrl.: $N = 131$; CDIII: $N = 18$. C) Ktrl.: $N = 103$; CDIII: $N = 13$.

3.2.3 Frauen mit Komplikationen weisen einen höheren BMI auf

Frauen mit CDIII hatten einen signifikant höheren BMI als die Kontrollgruppe. Bei Männern war kein Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen. Der Cut-off-Wert der JMP-Analyse ergab $29,4 \text{ kg/m}^2$. Ein erhöhter BMI stellt einen weiteren Risikofaktor für Frauen dar.

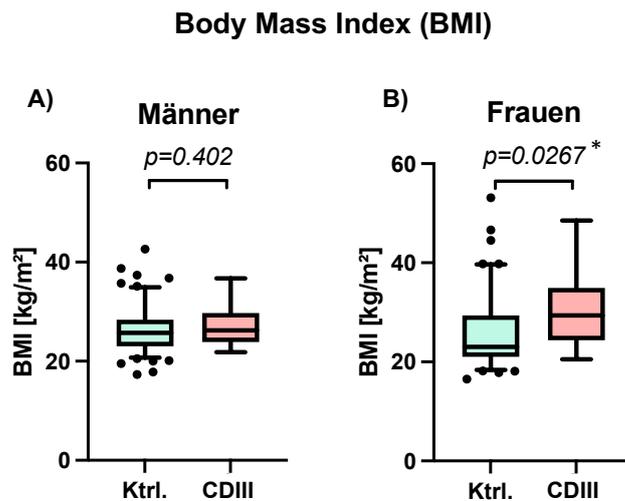


Abbildung 7: Body Mass Index. A) Ktrl: N = 131; CDIII: N = 18. B) Ktrl: N = 103; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.

3.2.4 Frauen mit Komplikationen weisen einen höheren FINDRISK auf

Während bei den Männern der FINDRISK keinen Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Komplikationsgruppe aufwies ($p = 0,784$), zeigte sich bei den Frauen ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Komplikationsgruppe ($p = 0,044$). Auch eine erhöhte Summe des FINDRISKS stellt sich als Risiko für einen komplikationsreichen postoperativen Verlauf bei Frauen dar. Die Partition Analyse ergab einen möglichen Cut-off-Wert bei einer Summe FINDRISK ≥ 14 .

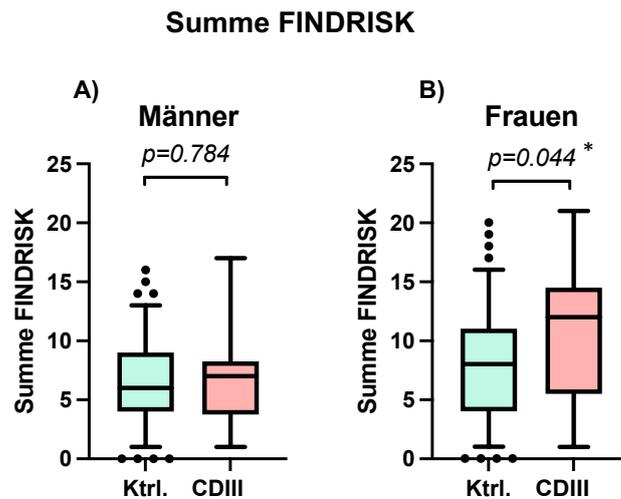


Abbildung 8: Summe FINDRISK. A) Ktrl: N = 131; CDIII: N = 18. B) Ktrl: N = 103; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.

3.2.5 Frauen mit Komplikationen weisen eine längere stationäre Verweildauer auf

Wie in Abbildung 9B zu erkennen, hatten Frauen mit Komplikationsentwicklung eine signifikant ($p = 0,0487$) längere stationäre Verweildauer als Frauen in der Kontrollgruppe (Median: Ktrl.: 5,0 Tage; CDIII: 12,0 Tage). Männer in der Komplikationsgruppe wiesen hingegen nur eine Tendenz zu einem längeren Krankenhausaufenthalt auf (Median: Ktrl.: 7,0 Tage; CDIII: 11,5 Tage; $p = 0,137$).

Stationäre Verweildauer

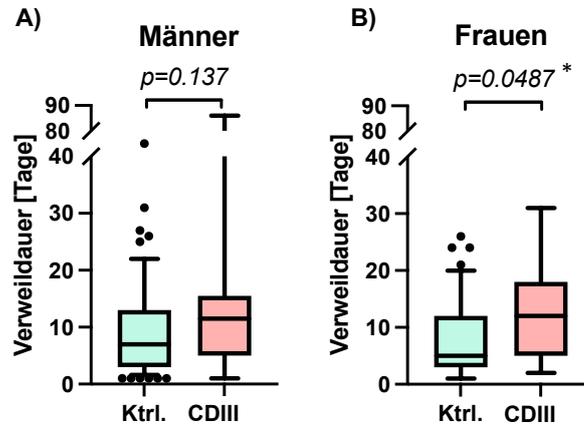


Abbildung 9: Stationäre Verweildauer. A) Ktrl: N = 131; CDIII: N = 18. B) Ktrl: N = 103; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.

3.2.6 Frauen weisen höheres Alter bei Studienaufnahme auf als Männer

Die Verteilung des Alters innerhalb einer Geschlechtergruppe ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Komplikationsgruppe. Es ist jedoch auffällig, dass Frauen zum Zeitpunkt der Studienaufnahme insgesamt deutlich älter waren als Männer.

Alter bei Studienaufnahme

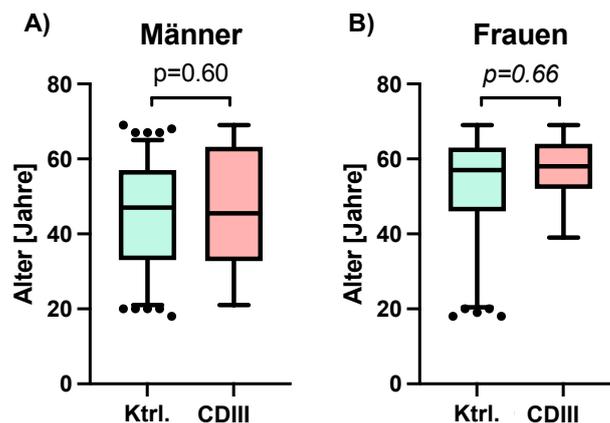


Abbildung 10: Alter bei Studienaufnahme. A) Ktrl: N = 131; CDIII: N = 18. B) Ktrl: N = 103; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.

3.2.7 Keine Auffälligkeiten in Bezug auf das Rauchverhalten

Das Rauchverhalten wurde anhand der Pack Years (PY) analysiert. Bei Frauen in der Komplikationsgruppe zeigte sich eine Tendenz zu einer höheren Anzahl an PY ($p = 0,269$), ansonsten zeigten sich keine Korrelationen zwischen dem Rauchverhalten der Patienten und dem Auftreten von Komplikationen (Abbildung 11).

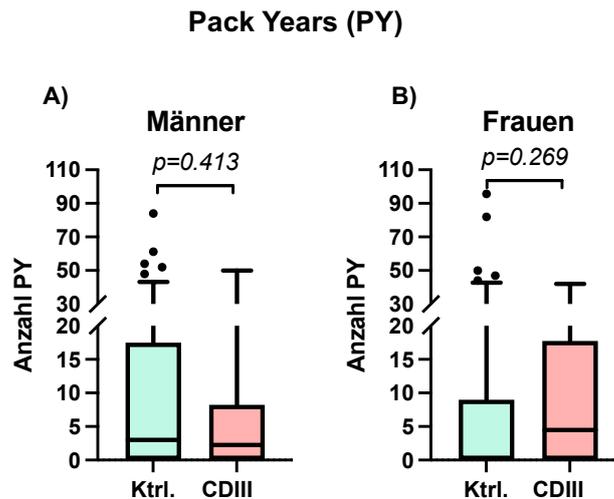


Abbildung 11: Anzahl der berechneten PY. A) Ktrl: $N = 131$; CDIII: $N = 18$. B) Ktrl: $N = 103$; CDIII: $N = 13$. Mann-Whitney Test.

3.2.8 Alkoholkonsum

In Abbildung 12A ist zu erkennen, dass Männer mit Komplikationsentwicklung ausschließlich Summen von > 3 des AUDIT-C Scores vorwiesen. Somit gab jeder Mann dieser Gruppe an, Alkohol zu konsumieren. Bei den Frauen fielen die Summen des AUDIT-C in der Kontrollgruppe und Komplikationsgruppe im Mittel geringer aus als bei den Männern.

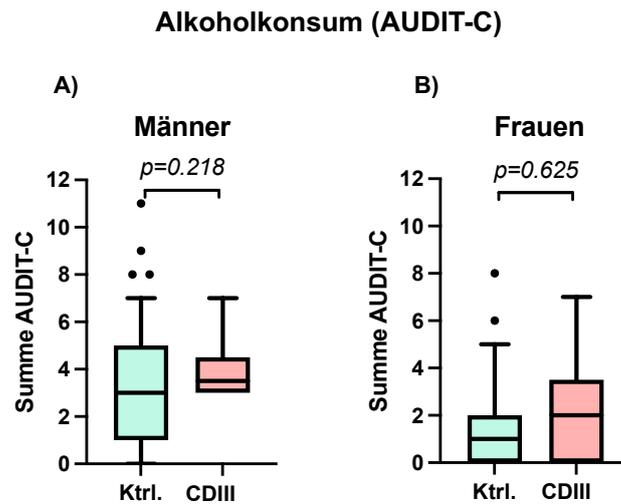


Abbildung 12: Summe Audit-C. A) Ktrl: N = 131; CDIII: N = 18. B) Ktrl: N = 103; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.

3.2.9 Häufigkeit des Alkoholkonsums bei Männern signifikant

Betrachtete man hingegen nur die erste der drei Fragen des AUDIT-Cs („Wie oft trinken Sie Alkohol?“), viel auf, dass Männer in der Komplikationsgruppe signifikant häufiger Alkohol tranken als Männer in der Kontrollgruppe ($p = 0,0087$). Die Partition Analyse ergab einen Cut-off-Wert ab 3 Punkten (2–3-mal pro Woche Alkoholkonsum). Bei den Frauen war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu verzeichnen.

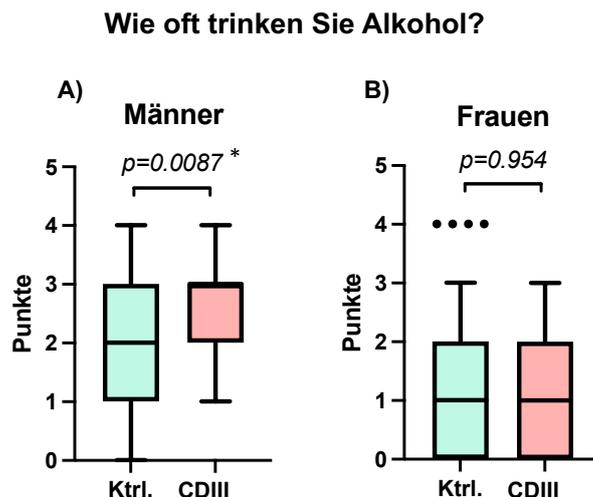


Abbildung 13: Wie oft trinken Sie Alkohol? A) Ktrl: N = 131; CDIII: N = 18. B) Ktrl: N = 103; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.

3.3 Analyse der Microarrays

Das übergeordnete Ziel dieser Studie war es, anhand von Zytokinprofilen Risikopatienten für Knochen- und Wundheilungsstörungen frühzeitig identifizieren zu können. Für die Bestimmung der relativen Zytokin Spiegel im Blutserum wurden, wie zuvor beschrieben, Zytokin Arrays der Firma RayBio® angewandt. Nach der Auswertung aller Zytokin-Signalintensitäten zeigten sich folgende relevante Zytokine (siehe Abbildung 14).

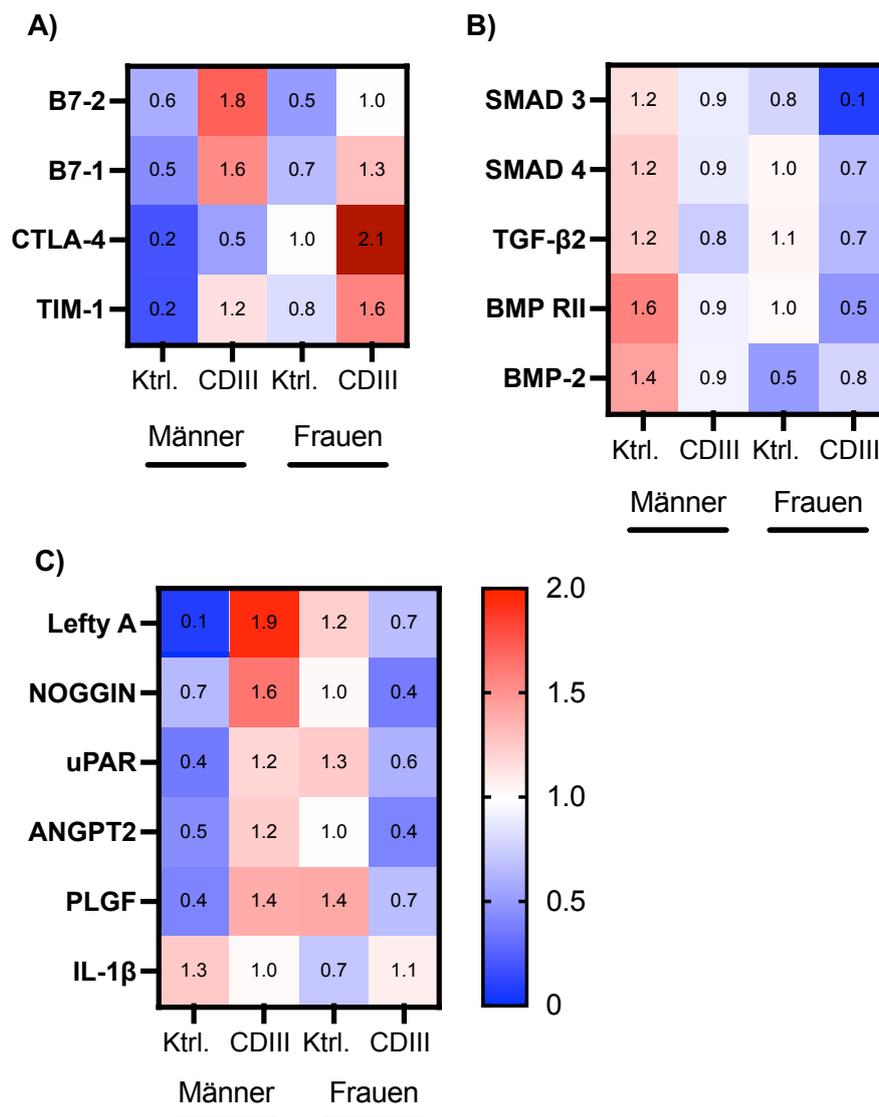


Abbildung 14: Heat Map. Relative Zytokin Spiegel im Blutserum. A) Hochregulierte Zytokine. B) Herunterregulierte Zytokine. C) Gegensätzlich hoch- herunter regulierte Zytokine, zur jeweiligen Geschlechter spezifischen Kontrollgruppe. Männer: CDIII: N = 17; Ktrl: N = 17. Frauen: CDIII: N = 13; Ktrl.: N = 13. Die Werte der Signalintensitäten wurden zweimal normalisiert (zunächst auf den MW der jeweiligen positiv Kontrolle und darauffolgend auf den MW der Signalintensitäten der jeweiligen Zytokine)

3.4 Ergebnisse der ELISAs

Um die Ergebnisse der Microarrays weiter zu spezifizieren, wurden wie zuvor beschrieben, darauffolgend ELISAs durchgeführt.

Zu folgenden Zytokinen wurden ELISAs durchgeführt: B7-2, PIGF-1, B7-1, IL-1 β , TGF β -2, BMP-2, TIM-1 und CTLA-4, da sich diese Zytokine teilweise gegenseitig beeinflussen und hierzu interessante Ergebnisse zu erwarten waren.

Wie bereits bei der Analyse der Arrays wurde für die ELISA Auswertung auch auf eine geschlechterspezifische Auswertung geachtet. Für die Analyse der ELISAs wurden alle vorhandenen Patientenproben verwendet.

Die Auswertung der gemessenen B7-2 Konzentrationen ergab, sowohl bei Männern als auch bei Frauen, keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Komplikationsgruppe. Auch die Konzentrationen von IL-1 β , PIGF-1, TGF- β 2 und BMP-2 ergaben bei beiden Geschlechtern keine Signifikanzen.

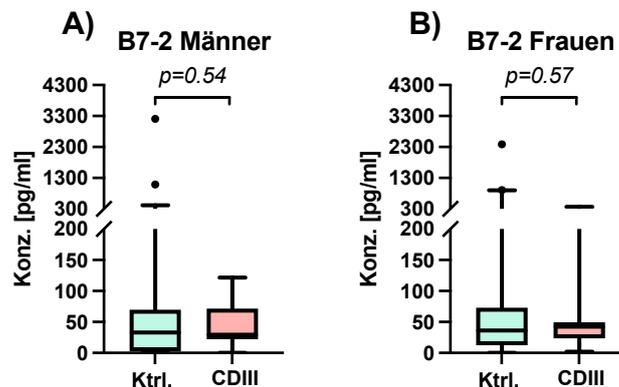


Abbildung 15: Vergleich der Konzentration von B7-2. A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.

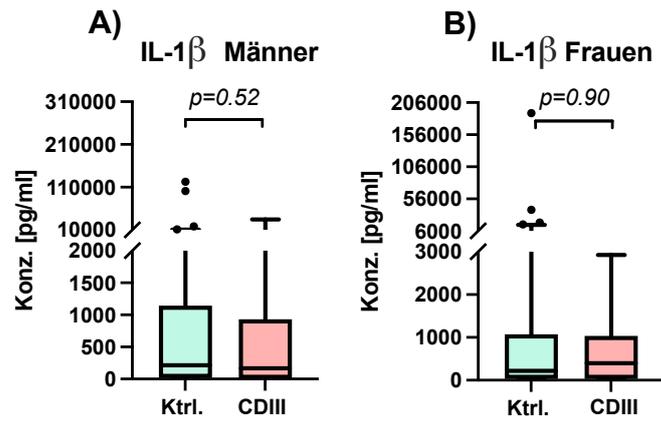


Abbildung 16: Vergleich der Konzentration von IL-1 β . A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.

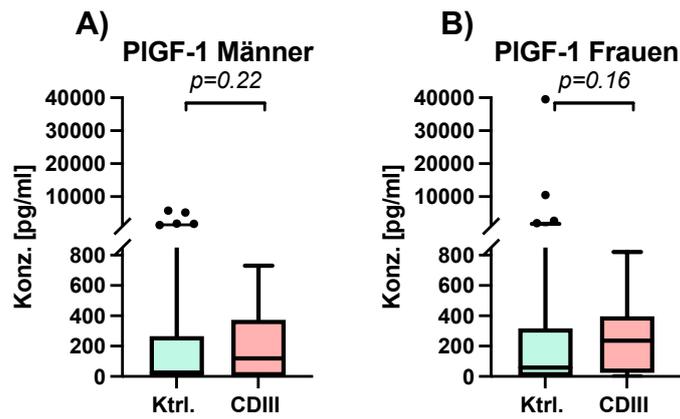


Abbildung 17: Vergleich der Konzentration von PIGF-1. A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.

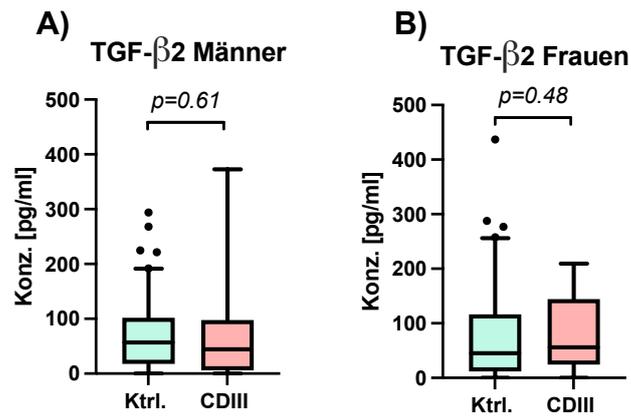


Abbildung 18: Vergleich der Konzentration von TGF-β2. A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.

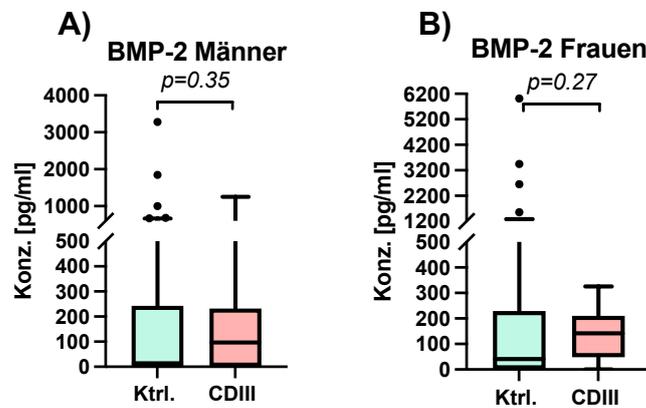


Abbildung 19: Vergleich der Konzentration von BMP-2. A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.

Die Analyse der B7-1 Konzentrationen ergab keine signifikanten Werte, jedoch ist bei den Frauen ein Trend zu höheren B7-1 Konzentrationen in der Komplikationsgruppe zu erkennen.

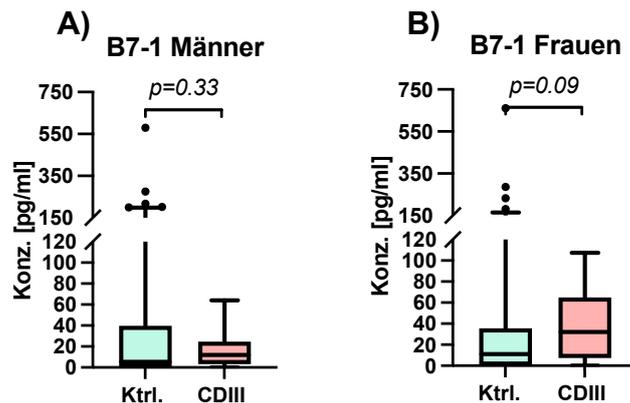


Abbildung 20: Vergleich der Konzentration von B7-1. A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.

In der Komplikationsgruppe der Männer zeigte sich ein dezenter Trend zu höheren TIM-1 Konzentrationen. Dagegen war bei den Frauen dieser Trend nicht zu erkennen.

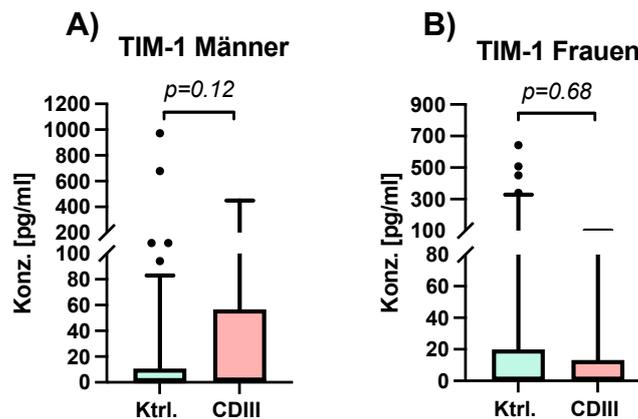


Abbildung 21: Vergleich der Konzentration von TIM-1. A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test.

3.4.1 Niedrige CTLA-4 Konzentrationen bei Frauen mit Komplikation

Die CTLA-4 Konzentrationen zeigten, im Vergleich zu der Kontrollgruppe der Frauen, in der Komplikationsgruppe signifikant niedrigere Konzentrationen ($p = 0,036$) (siehe Abbildung 22B). Männer hingegen zeigten keine Tendenz zu veränderten CTLA-4 Konzentrationen ($p = 0,47$) (siehe Abbildung 22A).

In Abbildung 22C wurde eine ROC-Kurve erstellt, um das Ergebnis und die diagnostische Qualität von CTLA-4 durch die Kombination der Sensitivität und

Spezifität graphisch darzustellen. Bei CTLA-4 Konzentrationen < 484,6 pg/ml, ergab sich eine Sensitivität von 92,31 % und eine Spezifität von 51,16 % für Frauen. Bei den Männern hingegen lag bei einem Cut-off-Wert von > 480,4 pg/ml die Sensitivität bei nur 64,71 %. Die Spezifität war mit 56,88 % ca. 5 % höher als bei den Frauen. Die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC), der Youden-Index und die Likelihood ratio zeigten für Frauen bessere diagnostische Werte (siehe Tabelle 6).

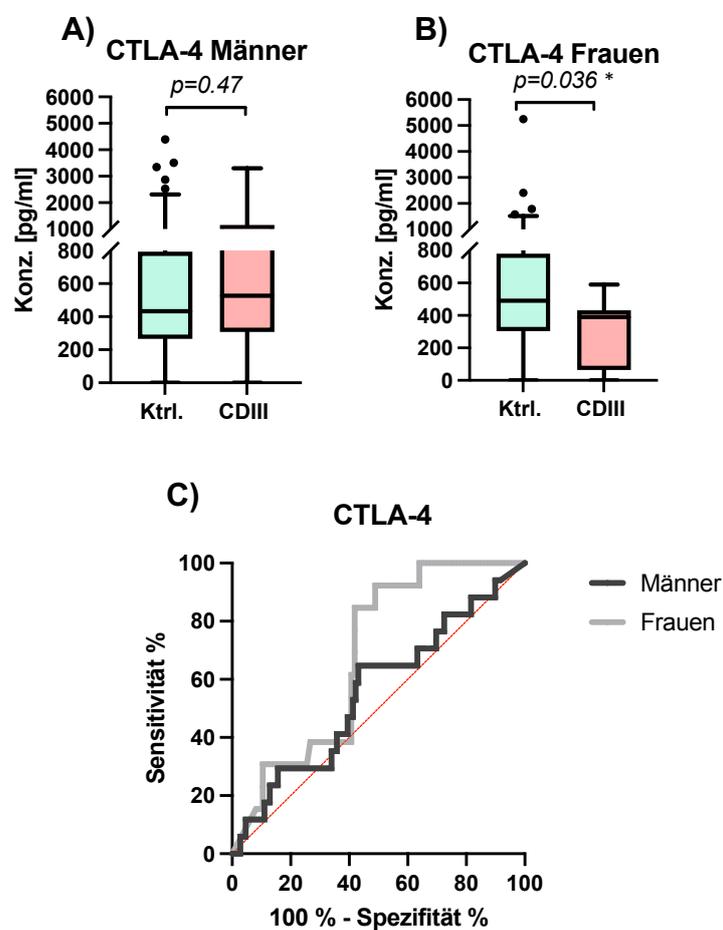


Abbildung 22: Vergleich der Konzentration von CTLA-4. A) Ktrl: N = 109; CDIII: N = 17. B) Ktrl: N = 86; CDIII: N = 13. Mann-Whitney Test. C) Roc-Kurve

Tabelle 6: Koordinaten ROC-Kurve zu Abbildung 22C.

Geschlecht	AUC (95% KI)	Cut-off [pg/ml]	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Youden-Index	Likelihood ratio
Frauen	0,68 (0,56-0,80)	< 484,6	92,31	51,16	43,47	1,89
Männer	0,56 (0,40-0,70)	> 480,4	64,71	56,88	21,59	1,50

3.5 Spezifische Zusammenhänge zwischen den CTLA-4 Konzentrationen und den zuvor identifizierten Risikofaktoren für Frauen

Die vorherige Analyse ergab für Männer den signifikanten Risikofaktor des erhöhten Alkoholkonsums. Die Ergebnisse der ELISAs zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Komplikationsgruppe bei Männern.

Für Frauen ergaben sich aus den Fragebögen folgende Risikofaktoren: erhöhte Verweildauer, erhöhter BMI, Summe des FINDRISKS und höhere Anzahl an Komorbiditäten. Diese Risikofaktoren werden im Folgenden mit dem zusätzlichen Marker aus der ELISA-Analyse (CTLA-4) in Verbindung gebracht, um eine mögliche Steigerung der Sensitivität und Spezifität zu erreichen.

In Kombination mit CTLA-4 zeigten sich bei einem BMI zwischen 25-30 kg/m² in der Komplikationsgruppe signifikant niedrigere CTLA-4 Konzentrationen (p = 0,0219). Für eine vereinfachte klinische Anwendbarkeit wurden für die Darstellung und Analyse der ROC-Kurve in Abbildung 23B alle weiblichen Patienten ab einem BMI von 25 kg/m² mit einbezogen. Durch die Kombination der Risikofaktoren BMI und CTLA-4 konnte die Sensitivität auf 100 % (vorher 92,31 %) und die Spezifität auf 60 % (vorher 51,16 %) gesteigert werden. Der Youden-Index lag somit bei 60,00. Der Cut-off-Wert für CTLA-4 änderte sich hierbei auf < 504,3 pg/ml (siehe Tabelle 7).

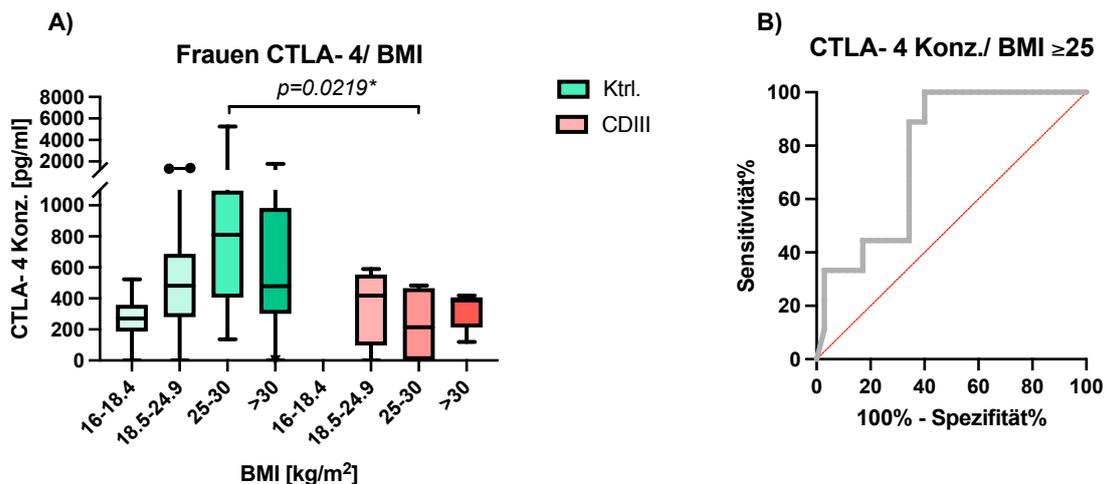


Abbildung 23: A) Zusammenhang des BMIs mit der CTLA-4 Konzentration. Ktrl. → 16-18.4: N = 7; 18.5-24.9: N = 44; 25-30: N = 16; >30: N = 19. CDIII → 16-18.4: N = 0; 18.5-24.9: N = 4; 25-30: N = 4; >30: N = 5. Mann-Whitney Test. B) ROC-Kurve. Ktrl.: N = 35; CDIII: N = 9.

Tabelle 7: Koordinaten ROC-Kurve zu Abbildung 23B

AUC (95% KI)	Cut-off [pg/ml]	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Youden-Index	Likelihood ratio
0,78 (0,63-0,92)	< 504,3	100	60	60,00	2,5

Ein weiterer Risikofaktor für Frauen stellte eine erhöhte Summe des FINDRISKS dar. Allgemein sind in der Komplikationsgruppe der Frauen zwar niedrigere CTLA-4 Konzentrationen als in der Kontrollgruppe zu finden, der Vergleich der beiden Gruppen nach Unterteilung des FINDRISK Scores ergab jedoch keine signifikanten Werte (siehe Abbildung 24A).

Bei vorheriger Analyse des FINDRISK ergab sich ein Cut-off-Wert bei ≥ 14 Punkten. Der Mittelwert bei Frauen mit Komplikationen lag bei ca. 11 Punkten. Nach der FINDRISK Punktebewertung liegt ab einer Summe von 12 Punkten ein Diabetes Risiko von 17 % vor. Daher wurde der Cut-off-Wert von 14 auf 12 Punkte herabgesetzt.

Bei CTLA-4 Konzentrationen $< 504,3$ pg/ml und einer Summe des FINDRISK ≥ 12 konnte die Sensitivität auf 100 % (vorher 92,31 %) und die Spezifität auf 58,82 % (vorher 51,16 %) gesteigert werden. Auch die AUC verbesserte sich auf

0,79 (vorher 0,68), der Youden Index auf 58,82 (vorher 43,47) und die Likelihood ratio auf 2,4 (vorher 1,89) (siehe Tabelle 8).

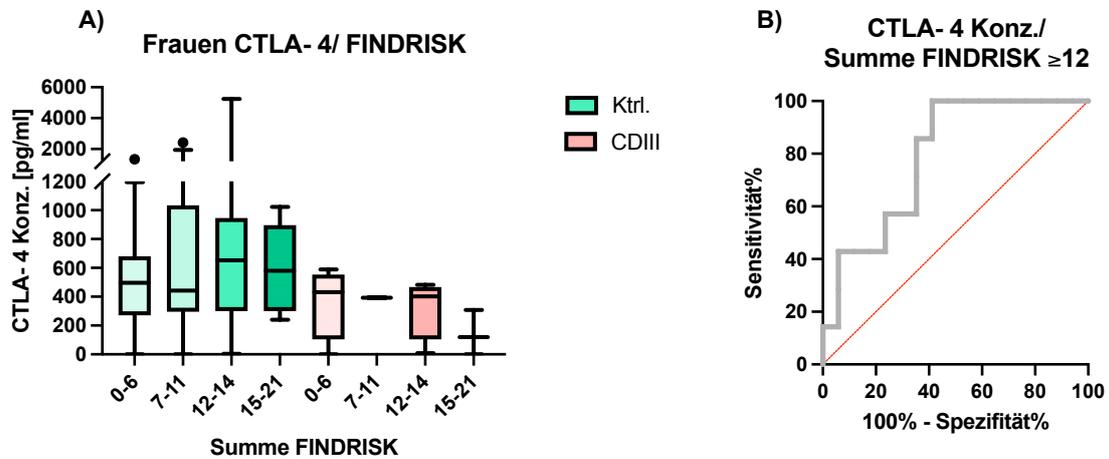


Abbildung 24: A) Zusammenhang der Summe des FINDRISK mit der CTLA-4 Konzentration bei Frauen. Ktrl. → 0-6: N = 35; 7-11: N = 34; 12-14: N = 10; 15-21: N = 7. CDIII = → 0-6: N = 4; 7-11: N = 2; 12-14: N = 4; 15-21: N = 3. B) ROC-Kurve. Ktrl.: N = 18; CDIII: N = 7.

Tabelle 8: Parameter der ROC-Kurve zu Abbildung 24B

AUC (95% KI)	Cut-off [pg/ml]	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Youden-Index	Likelihood ratio
0,79 (0,61-0,97)	< 504,3	100	58,82	58,82	2,4

In Abbildung 25A wurde der Zusammenhang zwischen der Anzahl an Komorbiditäten und der CTLA-4 Konzentrationen aufgeführt. Es zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen niedrigerer CTLA-4 Konzentration und mehr Komorbiditäten. Auch die ROC-Kurve in Abbildung 25B zeigt, dass die Kombination der CTLA-4 Konzentration und das Vorhandensein einer Komorbidität keine Steigerung der Sensitivität und Spezifität erbringen konnte (siehe Tabelle 9).

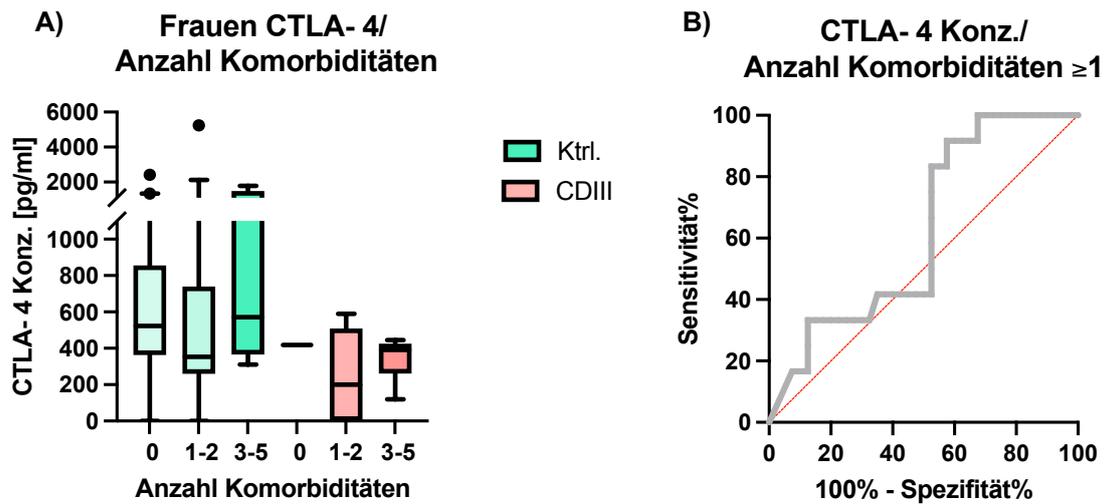


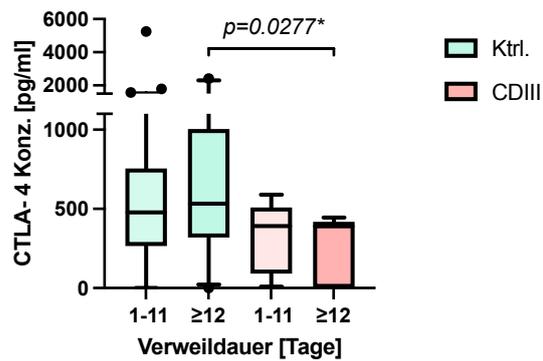
Abbildung 25: A) Zusammenhang der Anzahl an Komorbiditäten mit der CTLA-4 Konzentration. Ktrl. → 0: N = 42; 1-2: N = 36; 3-5: N = 4. CDIII → 0: N = 1; 1-2: N = 6; 3-5: N = 6. B) ROC-Kurve. Ktrl.: N = 40; CDIII: N = 12.

Tabelle 9: Fläche unter der ROC-Kurve zu Abbildung 25B

AUC (95% KI)	Cut-off [pg/ml]	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Youden-Index	Likelihood ratio
0,62 (0,46-0,79)	< 491,7	91,67	42,50	34,17	1,59

Bei einer Verweildauer von ≥ 12 Tagen hatten Frauen in der Komplikationsgruppe signifikant niedrigere CTLA-4 Konzentrationen als Frauen in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 26A). Durch die Kombination der Risikofaktoren Verweildauer ≥ 12 Tage und CTLA-4 Konzentration konnte die Sensitivität auf 100 % (vorher 92,31 %) und die Spezifität auf 66,67 % (vorher 51,16 %) gesteigert werden (siehe Tabelle 10). Der Youden-Index stieg somit auf 66,67 (vorher 43,47). Die Kombination von CTLA-4 und Verweildauer zeigte somit die beste Vorhersagekraft einer Komplikation bei Frauen.

A) Frauen CTLA- 4/ Verweildauer



B) CTLA- 4 Konz./ Verweildauer ≥ 12 Tage

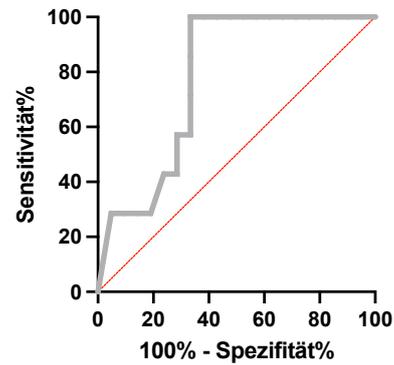


Abbildung 26: A) Zusammenhang der Verweildauer mit der CTLA-4 Konzentration. Ktrl. \rightarrow 1-11: $N = 65$; ≥ 12 : $N = 21$. CDIII \rightarrow 1-11: $N = 6$; ≥ 12 : $N = 7$. Mann-Whitney Test. B) ROC-Kurve. Ktrl.: $N = 21$, CDIII: $N = 7$.

Tabelle 10: Koordinaten ROC-Kurve zu Abbildung 26B

AUC (95% KI)	Cut-off [pg/ml]	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Youden-Index	Likelihood ratio
0,78 (0,61-0,95)	< 447,0	100	66,67	66,67	3,00

4 Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit konnten Erkenntnisse über die mit Komplikationen assoziierten Risikofaktoren bei Trauma-Patienten in der orthopädischen Unfallchirurgie gewonnen werden. Eine essenzielle Erkenntnis, die aus der vorliegenden Studie hervorgeht, betrifft die geschlechterspezifischen Diskrepanzen in den Ergebnissen. Diese Differenzen spiegelten sich nicht nur in der Analyse der Fragebögen wider, sondern diese waren auch in den Ergebnissen der ELISA-Messungen wiederzufinden.

Im Folgenden werden die ermittelten Ergebnisse kritisch beurteilt, diskutiert und mit ähnlichen Studien verglichen.

4.1 Identifizierte Risikofaktoren für Frauen

4.1.1 Anzahl an Komorbiditäten

Ein signifikantes Ergebnis dieser Studie war die erhöhte Anzahl an Komorbiditäten bei Frauen mit Komplikationen, im Vergleich zu Frauen ohne Komplikationen ($p = 0,0001$). Der ermittelte Cut-off-Wert lag hierbei bei ≥ 3 Komorbiditäten. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in einer Beobachtungsstudie von Roche *et al.* wider, in welcher bei Patienten über 60 Jahren ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Letalität und dem Vorhandensein von mehr als 3 Komorbiditäten festgestellt wurde (58). Darüber hinaus konnten Kruppa *et al.* eine generelle Zunahme der Quantität von Komorbiditäten zwischen den Jahren 2005-2016 feststellen (59) und bestätigte so die zunehmende Relevanz von Komorbiditäten für den medizinischen Versorgungssektor.

In den meisten wissenschaftlichen Arbeiten steht nicht primär die Analyse der Quantität von Komorbiditäten im Vordergrund, sondern vielmehr die Analyse der spezifischen Art der vorliegenden Komorbidität (60, 61). Von besonderem wissenschaftlichem Interesse für zukünftige Forschungsergebnisse ist eine systematische Analyse der Zusammenhänge zwischen der Anzahl an Komorbiditäten, sowie spezifische Kombinationen von Komplikationsarten und deren Einfluss auf die Komplikationsrate.

4.1.2 Krankenhausverweildauer

In der vorliegenden Studie hatte zudem die Dauer des stationären Aufenthaltes einen signifikanten Einfluss auf die Komplikationsrate bei Frauen ($p = 0,0497$). In den Studien von Mostafa *et al.* und Marfil-Garza *et al.* konnten dagegen bei Männern allgemein längere Krankenhausaufenthalte festgestellt werden (62, 63). Betrachtet man in der vorliegenden Studie hingegen die Männer unabhängig von der Komplikationseinteilung, ist auch hier in der männlichen Geschlechtergruppe im Schnitt ein dezent längerer Krankenhausaufenthalt (9,79 Tage) als bei den Frauen (8,21 Tage) zu verzeichnen.

Allgemein ist die Krankenhausverweildauer als ermittelter Risikofaktor auch kritisch zu beleuchten, da dieser erst zum Zeitpunkt der Entlassung der Patienten beurteilt werden kann und dieses Kriterium nicht als potenzieller Marker für eine präoperative Risikoprophylaxe analysiert werden kann. Dennoch ist dieses statistisch signifikante Ergebnis aus medizinischer Sicht nicht zu vernachlässigen, denn auch in der Literatur sind Angaben über Zusammenhänge von Komplikationsaufkommen und einem verlängerten Krankenhausaufenthalt zu finden (64, 65). Häufig wurden hierbei auch Komplikationen mit einbezogen, welche bereits während des Krankenhausaufenthaltes auftraten. Dies war in der vorliegenden Studie jedoch nicht der Fall. Frauen in der Komplikationsgruppe wiesen zudem auch deutlich mehr Komorbiditäten auf ($p = 0,0001$), somit könnte der verlängerte Krankenhausaufenthalt auch hiermit im Zusammenhang stehen. Auch andere Studien konnten einen Zusammenhang von verlängertem Krankenhausaufenthalt und dem Vorhandensein von Komorbiditäten mit dem Auftreten von Komplikationen bestätigen (63, 66).

Dies unterstreicht die Wichtigkeit von Präventionsmaßnahmen bei potenziellen Risikopatienten im klinischen Alltag. Diese Patientengruppen sollten bereits während ihres Aufenthaltes und zusätzlich vor ihrer Entlassung über ihr potenzielles Risiko einer Komplikationsentwicklung aufgeklärt werden und ein entsprechender Präventionsplan aufgestellt werden.

4.1.3 BMI

Die Analyse der Fragebögen ergab, dass Frauen in der Komplikationsgruppe einen signifikant höheren BMI als Frauen in der Kontrollgruppe aufwiesen ($p = 0,0267$). Der ermittelte Cut-off-Wert lag hierbei bei $\geq 29,4 \text{ kg/m}^2$, wobei ab einem BMI von 30 kg/m^2 eine Adipositas Grad I vorliegt (67). Diese Korrelation zeigte sich geschlechterunabhängig auch in vorausgegangenen Studien, in denen vor allem Wundheilungsstörungen bei adipösen Patienten häufiger als bei Normalgewichtigen auftraten (37, 68). Grund hierfür sind unter anderem erhöhte Serumspiegel von pro-inflammatorischen Zytokinen, welche für eine erhöhte Entzündungsbereitschaft des Körpers sorgen (69-71). Zudem ist die Immunantwort bei übergewichtigen Patienten allgemein reduziert. Diese kann jedoch interessanterweise durch eine Gewichtsabnahme wieder gesteigert werden (72).

Darüber hinaus kann das erhöhte Gewicht von adipösen Patienten vermehrt zu komplizierteren Brüchen führen (73) und zusätzlichen Aufwand im Krankenhaus verursachen (74). Somit stellt eine Adipositas nicht zuletzt auch einen erhöhten wirtschaftlichen Aspekt für das Gesundheitssystem dar (75).

In der Studie von Whiting *et al.* konnte zusätzlich eine Korrelation zwischen dem Auftreten von postoperativen Komplikationen und einem BMI $< 18,5 \text{ kg/m}^2$ festgestellt werden (37). Dabei ist vor allem bei älteren Patienten ein Zusammenhang zwischen Mangelernährung und Komplikationsaufkommen zu beobachten (76). In der vorliegenden Studie wurden geriatrische Patienten (≥ 70 Jahre) ausgeschlossen. Dieser Ausschluss könnte ein Grund sein, warum die Korrelation eines zu niedrigen BMIs und eines erhöhten Aufkommens an Komplikationen nicht als Risikofaktor identifiziert wurde.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass eine Überernährung grundsätzlich eine gesundheitlich belastende Situation darstellt und aus medizinischer Sicht möglichst vermieden werden sollte. Auch wenn der BMI zu den präoperativ nicht-modifizierbaren Risikofaktoren zählt, ist eine ausführliche Aufklärung der Betroffenen unverzichtbar, um ein allgemeines Bewusstsein für diesen Risikofaktor zu vermitteln.

4.1.4 FINDRISK

Auch die Summe des FINDRISK stellte für Frauen ein signifikantes Ergebnis der Auswertung der Fragebögen dar. Frauen in der Komplikationsgruppe wiesen hierbei signifikant höhere Summen des FINDRISK auf als Frauen in der Kontrollgruppe ($p = 0,044$). Bei den Männern waren hierbei keine signifikanten Ergebnisse zu betrachten.

Die Gesamtsumme des FINDRISK dient der Ermittlung des individuellen Risikos an Diabetes Typ 2 zu erkranken. Insgesamt besteht der FINDRISK aus acht Fragen (siehe Anhang: Fragebögen), welche sowohl Lifestylefaktoren als auch medizinische Parameter (unter anderem BMI) betreffen. Jede beantwortete Frage erhält einen bestimmten Punktwert, wodurch am Ende eine Gesamtsumme (bis 26 Punkte) berechnet werden kann. Ab einem Punktwert von 11 Punkten ist von einem erhöhten Diabetes Risiko auszugehen und eine Verbesserung des Lebensstils wird dringend angeraten (54).

In der vorliegenden Studie lag der Mittelwert bei den Frauen mit Komplikationen bei ca. 11 Punkten, womit dieser Wert bereits in der Risikogruppe einzuordnen ist. Diabetes Typ 2 hat einen negativen Effekt auf die Wundheilung (60) und kann sogar das Frakturrisiko erhöhen (77), wodurch eine Identifikation und Präventionsstrategie dieser Krankheit in der Traumatologie besonders wichtig ist.

Die Frage, ob die verschiedenen medizinischen Parameter des FINDRISK Fragenkatalogs besser einzeln betrachtet werden sollten oder ob eine Analyse als Gesamtsumme des FINDRISK angemessener ist, eröffnet zweifellos einen Diskussionspunkt. Eine ganzheitliche Analyse der FINDRISK Gesamtsumme bietet Vorzüge aus medizinischer und wissenschaftlicher Sicht. Sie ermöglicht die Berücksichtigung eines komplexen Zusammenspiels von wechselseitig beeinflussenden, medizinischen Faktoren und bietet zudem eine vereinfachte Vergleichbarkeit. Die Betrachtung einzelner Parameter allein ist möglicherweise weniger aussagekräftig. Jedoch könnte bei einer isolierten Betrachtung näher auf die einzelnen Parameter eingegangen werden und eine gezieltere Präventionsstrategie angewandt werden. Der BMI wurde alleinstehend auch als Risikofaktor identifiziert und gehört als medizinischer Parameter bereits zu den

routinemäßig dokumentierten Daten im Klinikalltag. Dieser muss im Gegensatz zu einem FINDRISK nicht zusätzlich bei den Patienten erfragt werden. Somit wäre die alleinige Auswertung des BMIs für weitere Studien eine mögliche Alternative als die gesamte FINDRISK Befragung durchzuführen.

4.2 Erhöhter Alkoholkonsum als Risikofaktor für Männer

Für Männer ergab sich der Risikofaktor des erhöhten Alkoholkonsums, da dieser bei Männern mit Komplikationsaufkommen im Vergleich zu Männern aus der Kontrollgruppe ($p = 0,0087$) signifikant höher war. Bei der Analyse des AUDIT-C Fragebogen fiel auf, dass in diesem Zusammenhang insbesondere ein Alkoholkonsum von mindestens zweimal wöchentlich ausschlaggebend war.

Allgemein wurde, im Vergleich zu den Frauen, von Männern ein höherer Alkoholkonsum festgestellt ($p = < 0,0001$). Dieser spiegelt sich auch in allgemeinen Daten der deutschen Bevölkerung wider. Nach Daten des Robert-Koch-Instituts trinken ca. 13 % der Frauen und ca. 18 % der Männer Alkohol in gesundheitsgefährdenden Mengen (78). Darüber hinaus ist bekannt, dass Alkohol durch einen gesteigerten Entzündungsprozess zu einer gestörten Wundheilung führen kann (79). Im Rattenmodell konnte bereits ein negativer Einfluss von erhöhtem Alkoholkonsum in Bezug auf die Frakturheilung festgestellt werden (80). Auch in der vorliegenden Studie wurde dieser Zusammenhang in der männlichen Geschlechtsgruppe deutlich.

Betroffene Patienten sollten in jedem Fall über ihr Risiko aufgeklärt werden und alkoholfreie Alternativgetränke in Betracht gezogen werden.

4.3 Ergebnisse der ELISAs

4.3.1 Nicht signifikante Ergebnisse der ELISAs

Nach Auswertung der ELISA Messwerte stellte sich lediglich der CTLA-4 ELISA für Frauen als signifikant dar. In der Literatur dagegen liegen auch weitere signifikante Ergebnisse von den in dieser Studie untersuchten Targets vor.

TGF- β wird in vorausgegangenen Studien bereits in Verbindung mit dem Auftreten von postoperativen Wundinfektionen gebracht. Darüber hinaus konnte

bestätigt werden, dass die Substitution von TGF- β 1 sogar die Heilung von Frakturen maßgeblich unterstützen kann (81). Ein Zusammenhang zwischen niedrigen TGF- β Konzentrationen und einem erhöhten Aufkommen an postoperativen Komplikationen konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Auch das zu der TGF- β Superfamilie gehörende Zytokin BMP-2 zählt zu den bereits erforschten Zytokinen in Bezug auf postoperative Komplikationen in der Traumatologie (39, 40, 82). Auch in diesem Fall decken sich die Angaben der Literatur nicht mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Studie. Dies kann zum einen auf die verringerte Zahl an vorhandenen Blutproben zurückzuführen sein, zum anderen auf die Art der Komplikationen in der vorliegenden Arbeit. So wird in einigen Studien vor allem auf den Bezug zwischen TGF- β und reine Knochenheilungsstörungen eingegangen (15, 81). In der vorliegenden Studie handelte es sich meist um Störungen der Wundheilung (siehe Abbildung 5).

TIM-1 (KIM-1) stellt bereits einen Marker für Nierenschädigungen dar (83) und hat eine regulierende Wirkung auf Immunzellen (84). Auch mit Asthmaerkrankungen (85) und der Infektionskrankheit COVID-19 (86) wird eine erhöhte Expression von TIM-1 (KIM-1) in Verbindung gebracht. In der Komplikationsgruppe der Männer war zwar eine Tendenz zu höheren TIM-1 Konzentrationen zu erkennen, allerdings stellten sich diese Ergebnisse als nicht signifikant dar. Möglicherweise hat eine Hochregulierung von TIM-1 einen negativen Einfluss auf Heilungsprozesse des Körpers. Die Rolle von TIM-1 während der Frakturheilung ist jedoch noch nicht ausreichend bekannt und sollte in weiteren Studien geklärt werden.

Die Zytokine B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) haben ko-stimulatorische Funktionen während der T-Zell Aktivierung. Hierbei führt die Bindung von B7-1 und B7-2 an CD28 zu einer Aktivierung der T-Zelle (87, 88). Diese Aktivierung spielt eine entscheidende Rolle in der Immunfunktion (89). Dennoch wurden sowohl im Mausmodell, als auch in humanem Blutserum erhöhte Konzentrationen von B7-1 mit einer erhöhten Entzündungsbereitschaft des Körpers in Verbindung gebracht (90). Daher ist es nicht erstaunlich, dass in der vorliegenden Arbeit eine Tendenz zu erhöhten B7-1 Konzentrationen bei Frauen mit Komplikationen zu

finden waren. Bei den B7-2 Konzentrationen der Männer war dieses Ergebnis jedoch nicht zu erkennen. Die genaue Funktion von B7-1 und B7-2 in der Entstehung von Komplikationen bei Trauma-Patienten muss jedoch weiterhin erforscht werden.

Die Auswertung der IL-1 β ELISA Messungen ergaben keine Signifikanzen. Obwohl eine gewisse Expression von IL-1 β für die Wundheilung essenziell ist, konnte im Mausmodell bestätigt werden, dass unter erhöhten IL-1 β Expressionen die krankhafte Vermehrung von Bindegewebe gefördert wird (91). Zudem kann IL-1 β eine Verringerung der Kollagenproduktion und eine Hemmung der Granulationsgewebekonstruktion bewirken (92). Dies kann sich negativ auf die Wundheilung auswirken. In stark traumatisierten Wunden konnten neben erhöhten IL-6 und TNF- α Werten auch erhöhte Expressionen von IL-1 β nachgewiesen werden (93). Zudem kann eine Blockade der IL-1 β Aktivität zu einer Reduzierung diverser entzündlicher Krankheiten führen. So werden bereits einige IL-1 β Blocker in der Chirurgie und Unfallchirurgie genutzt (94). Bei den Trauma-Patienten dieser Studie konnten diese Forschungsergebnisse allerdings nicht belegt werden.

Bei PIGF handelt es sich um einen Wachstumsfaktor, welcher zu Beginn der Frakturheilung der Vaskularisation des Knochens beiträgt. Im Mausmodell wurde das Fehlen von PIGF bereits in Zusammenhang mit einer unzureichenden Knochenbruchheilung gebracht (95). In den vorliegenden Ergebnissen konnte jedoch keine Verbindung zwischen herunterregulierten PIGF-1 Konzentrationen und dem Aufkommen von Komplikationen identifiziert werden.

4.3.2 CTLA-4 als potenzieller Risiko-Marker für Frauen

In der Komplikationsgruppe der Frauen waren signifikant niedrigere CTLA-4 Konzentrationen zu finden als in der Kontrollgruppe. Mit einer ermittelten Sensitivität von 92,31 % und einer Spezifität von 51,16 % bei CTLA-4 Konzentrationen < 484,6 pg/ml stellt dieses Zytokin einen potenziellen Blutserum-Marker zur frühzeitigen Detektion von Risikopatienten bei Frauen dar.

CTLA-4 wird auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen exprimiert und ist für eine negative Regulation der T-Zell-Aktivierung verantwortlich (96). Diese Regulation ist für das Immunsystem von hoher Bedeutung, da so eine übermäßige Immunreaktion verhindert werden kann. Bei einem Mangel an CTLA-4 kann es zu Immunstörungen bis hin zu Autoimmunerkrankungen kommen (97). Mesenchymale Stammzellen können durch die Sekretion von CTLA-4 sogar eine Unterdrückung des Immunsystems auslösen (98).

Zudem konnte in der Studie von Jiang *et al.* eine geringere Oberflächenexpression von CTLA-4 bei Patienten mit verzögerter Frakturheilung nachgewiesen werden (99). Bozec *et al.* stellten zudem eine erhöhte Osteoklasten Aktivität bei einer Inhibierung von CTLA-4 fest (100). Im Gegenteil dazu, konnte in der Immuntherapie gegen verschiedene Krebsarten, insbesondere des Melanoms, durch die Blockade von CTLA-4 mittels monoklonaler Antikörper (z.B. Ipilimumab) vielversprechende Ergebnisse erzielt werden (101). Durch das Blockieren von CTLA-4 wird die T-Zell-Hemmung reduziert und eine verbesserte Immunaktivität gegen Tumore erzielt (102).

Interessanterweise wird in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis bereits ein Medikament namens „Abatacept“ eingesetzt, welches in der Lage ist, die Bindung von CTLA-4 und CD80/CD86 zu unterbinden und somit die Menge an löslichem CTLA-4 im Blut zu erhöhen. Folglich weist Abatacept eine immunsuppressive Eigenschaft auf, welche sich positiv auf die Entzündungsprozesse der rheumatoiden Arthritis auswirkt (103). Die immunsuppressive Wirkung von Abatacept wird jedoch auch kontrovers diskutiert, da es zu Nebenwirkungen wie virale oder bakterielle Infektionen führen kann (104). Über die Wirkung von Abatacept auf Wundheilungs- und Knochenheilungsstörungen ist bislang wenig bekannt. Möglicherweise könnte sich die Immunsuppression auch negativ auf solche Heilungsstörungen auswirken.

Zusammenfassend handelt es sich bei CTLA-4 um einen bedeutenden Regulator des Immunsystems, der das Immun-Gleichgewicht aufrechterhält. Zu geringe Konzentrationen an CTLA-4 scheinen eine überaktive Immunantwort

herbeizuführen und somit Heilungsprozesse des Körpers negativ zu beeinflussen. Dagegen konnte dieses Prinzip in der Tumorthherapie bereits positive klinische Relevanz erlangen, da es die Aktivierung der Immunantwort des Organismus gegenüber schädlichen Tumorzellen ermöglicht.

Die genaue Rolle von CTLA-4 während der Entstehung von postoperativen Komplikationen bleibt weiter zu erforschen. Zudem muss in größeren Kohortenstudien getestet werden, ob sich die Ergebnisse auch bei Männern feststellen lassen. Für eine klinische Anwendbarkeit sind zudem noch weitere Studien über CTLA-4 und dessen Potenzial als Risiko-Marker für postoperative Komplikationen bei Trauma-Patienten nötig.

4.3.3 CTLA-4: Unterschiedliche Regulation in Microarrays und ELISAs

Nicht zu vernachlässigen ist das widersprüchliche Ergebnis der gemessenen CTLA-4 Werte von Microarrays und ELISAs. So wurden bei den Microarrays in den Komplikationsgruppen hochregulierte Werte gemessen und die Werte der ELISAs waren herunterreguliert. Da alle Laborversuche streng nach Herstellerprotokoll durchgeführt worden sind, ist nicht von einem Laborfehler auszugehen. Möglicherweise lassen sich die Ergebnisse durch die verschiedene Anwendung der Blutproben erklären. So wurden die Microarrays mit Proben-Pools durchgeführt, die ELISAs dagegen wurden mit einzelnen Blutproben durchgeführt. Ausreißer können in einem Probenpool größere Auswirkungen haben, wodurch diese unterschiedliche Regulation möglicherweise zu erklären ist.

4.4 Kombination der CTLA-4 Ergebnisse mit den signifikanten Ergebnissen der Fragebögen

Um die diagnostische Leistungsfähigkeit des Blutmarkers CTLA-4 zu verbessern und somit eine klinische Anwendbarkeit der Ergebnisse anzustreben, wurden die zuvor identifizierten signifikanten Parameter der Fragebogenergebnisse in einer kombinierten Analyse integriert.

Es stellte sich heraus, dass die Kombination der Verweildauer, BMI und Summe FINDRISK mit den CTLA-4 Werten zu einer Steigerung der Sensitivität und

Spezifität führte. Am besten war die Kombination der CTLA-4 Werte und der Krankenhausverweildauer. Dabei konnte die Sensitivität um ca. 8 % (92,31 % vs. 100 %) und die Spezifität um ca. 15 % (51,16 % vs. 66,67 %) gesteigert werden. Somit wurden durch diese Kombination alle tatsächlich vorkommenden Komplikationen identifiziert, wobei zu beachten ist, dass bei dieser Analyse die Probandenzahlen deutlich verringert waren. Eine verlängerte stationäre Verweildauer geht häufig auch mit vermehrten Komorbiditäten einher (63, 66). Daher ist es möglich, dass nicht die Verweildauer allein, sondern die Kombination mit einer erhöhten Anzahl an Komorbiditäten zu einer verstärkten Reaktion des Immunsystems und den möglicherweise damit verbundenen niedrigeren CTLA-4 Konzentrationen im Blutserum führt. Die Korrelation von Verweildauer und Komorbiditäten sollte in weiteren Studien überprüft werden, um die Kombination einer CTLA-4 Diagnostik und der Krankenhausverweildauer als Diagnostikmittel von Risikopatienten in der Traumatologie einsetzen zu können.

4.5 Klassifikation nach CD als geeignete Einteilung der Komplikationen?

Für die Einteilung der Komplikationen wurde in dieser Studie die Klassifikation nach CD gewählt. Diese Klassifizierung von postoperativen Komplikationen ermöglicht eine präzisere Einschätzung des individuellen Komplikationsaufkommens und verbessert die Interpretation und Vergleichbarkeit von klinischen Forschungsergebnissen. Die Klassifikation nach CD wurde von Pierre-Alain Clavien 1992 erstmals vorgestellt und 2004 durch Daniel Dindo modifiziert (53, 105). Postoperative chirurgische Komplikationen werden hierbei unabhängig von der Art der Komplikation anhand der durchgeführten Therapien eingeteilt. Dadurch wird eine Vielzahl von Komplikationen vereinheitlicht und vergleichbarer gemacht. Die Effektivität und Anwendbarkeit dieser Graduierung konnte für verschiedenste Bereiche der Chirurgie klinisch bestätigt werden (106).

Aus Sicht der medizinischen Forschung gibt es auch negative Aspekte dieser Art der Klassifizierung. Zwar wird nach Art der durchgeführten Therapie eingeteilt, jedoch wird die genaue medizinische Diagnose und somit Typ der Komplikation nicht mit einbezogen. So besteht die Gefahr, dass sehr unterschiedlich schwere

Komplikationen aufgrund derselben Therapie verglichen werden. In der vorliegenden Studie reichten die Gründe für eine erneute Operation (CDIII) von gelockertem Osteosynthesematerial bis hin zu schwerwiegende Wundinfektionen. Eine Studie von Suda *et al.* zeigte, dass unter anderem das Ausmaß der vorausgegangenen Gewebeläsion, sowie die Frakturlokalisierung entscheidende Faktoren im Zusammenhang mit dem Komplikationsaufkommen darstellen (107). Darüber hinaus stellten spezifische Faktoren wie der genaue Operationszeitpunkt (108) und Ausbildungsstand des Chirurgen (109) in vorherigen Studien weitere signifikante Risikofaktoren dar. Dabei konnte in der Orthopädischen Unfallchirurgie vor allem bei Operationen am späten Nachmittag und in der Nacht ein erhöhtes Komplikationsaufkommen festgestellt werden (108). Die Art der Wundverschließung konnte unabhängig von weiteren Risikofaktoren als signifikanter Einflussfaktor identifiziert werden. So konnte ein Wundverschluss nach orthopädischen Operationen mittels Z-Plastik im Vergleich mit einer normalen Wundnaht maßgeblich zu einer verbesserten Wundheilung beitragen (110).

Es ist jedoch zu erwähnen, dass die genannten möglichen Einflussfaktoren sich unmöglich in eine klinisch anwendbare Komplikationseinteilung ableiten lassen, da es sich um unvermeidbare Diskrepanzen in der Behandlung von Trauma-Patienten handelt.

In künftigen Studien sollte dennoch neben der klassischen Klassifikation nach CD die Berücksichtigung der spezifischen Art, Lokalisation und Schwere der aufgetretenen Komplikation in Betracht gezogen werden. Somit könnte das Komplikationsaufkommen noch individueller beurteilt werden und Risikofaktoren sicher diagnostiziert und anschließend vorbeugend behandelt werden.

4.6 Klinischer Ausblick

Durch eine präoperative Diagnostik der CTLA-4 Werte könnte in Zukunft eine Identifikation von Risikopatienten möglich sein und eine frühzeitige Intervention bei den betroffenen Patienten möglicherweise Komplikationen reduzieren oder sogar vermeiden. Dennoch bedarf es einer kritischen Betrachtung, ob eine präoperative Frühdiagnose mittels der Bestimmung eines Zytokin-Profiles einen

positiven Nutzen für die Patienten bietet. Die Bestimmung eines breitflächigen Zytokin Profils würde einen zusätzlichen Zeit- und Kostenaufwand für den klinischen Alltag bedeuten. Zudem können operative Eingriffe in der Traumatologie häufig zeitlich nicht verschoben werden, sodass eine Beeinflussung des Immunsystems durch den begrenzten Faktor Zeit nur bedingt möglich ist.

In weiteren Studien muss erforscht werden, ob es sich bei einer geringen CTLA-4 Konzentration im Blut tatsächlich um einen Risikofaktor handelt und eine frühzeitige Intervention Komplikationen vermeiden lässt. Beispielsweise sollte eine Langzeitstudie in Betracht gezogen werden, bei der weitere Erkenntnisse über den genauen Zeitpunkt der CTLA-4 Ausschüttung und Konzentrationen im Blut der Patienten gewonnen werden können. Hierbei sollte auf eine zeitlich übereinstimmende, präoperative Blutabnahme geachtet werden. Darüber hinaus sollte das CTLA-4 beeinflussende Medikament „Abatacept“ zunächst durch Laborversuche in weitere Forschungsstudien mit einbezogen werden, um die potenzielle Anwendung dieses Biologikums zur Risikoprävention in der Traumatologie zu untersuchen.

Da es das Ziel war, mögliche Risikofaktoren zu finden, welche in der präoperativen Frühdiagnostik eingesetzt werden können, ist den Ergebnissen des CTLA-4 die größte klinisch, chirurgische Relevanz zu erteilen. Bei den ermittelten Risikofaktoren: Krankenhausverweildauer, BMI, Anzahl der Komorbiditäten, Summe FINDRISK und Alkoholkonsum handelt es sich um präoperativ nicht therapiebare Faktoren. Um diese zu reduzieren, bedarf es einer ausführlichen Aufklärung der Patienten, wobei insbesondere die Compliance der Patienten von der Effektivität der Prävention von Komplikationen abhängt.

4.7 Limitierungen der Arbeit

Durch Faktoren wie zu wenige freiwillige Blutabgaben und fehlende Einwilligungen der Follow-ups waren die absoluten Zahlen des Patientenkollektivs deutlich reduziert. Darüber hinaus konnte aus logistischen Gründen das Blut nicht rein präoperativ gesammelt werden, somit waren sowohl prä- als auch postoperative Blutproben vorhanden. Um ein einheitliches

Zytokinprofil der Patienten widerspiegeln zu können und zu analysieren, ist für zukünftige Studien eine zeitlich einheitliche Blutentnahme zu empfehlen. Hierfür könnte bereits bei Aufnahme der Patienten ins Krankenhaus, im Rahmen der Prädiagnostik, eine Blutabnahme mit folgender Zytokin Diagnostik stattfinden.

5 Zusammenfassung

Postoperative Komplikationen im Bereich der Unfallchirurgie stellen zweifellos eine starke physische und psychische Belastung für die Patienten, sowie eine zusätzliche wirtschaftliche Belastung für das Gesundheitssystem dar. Um Komplikationen vorzubeugen ist eine frühzeitige Identifizierung von Risikopatienten unumgänglich. Wie Eingangs beschrieben konnten in der Literatur bereits Erkenntnisse über spezifische Risikofaktoren gewonnen werden. Über die Effektivität von Zytokin-Blutmarkern als Mittel zur Identifikation von Risikopatienten ist jedoch bislang wenig bekannt. Zudem existiert nach heutigem Kenntnisstand keine einheitliche Präventionsstrategie bei Risikopatienten.

Von 379 aufgenommenen Trauma- und Trauma-Wirbelsäule Patienten konnten von 239 Patienten mittels Microarrays und ELISAs Zytokinprofile analysiert werden. Die Analyse der Fragebögen vermittelte weitere Erkenntnisse über Risikofaktoren im Bereich allgemeiner und medizinischer Parameter. Nach ausführlicher Diskussion sollte für weitere Studien eine modifizierte Klassifikation nach CD genutzt werden, um auch entscheidende Faktoren wie Art und Lokalisation der Fraktur mit einzubeziehen und so Risikofaktoren noch genauer identifizieren zu können.

Eine entscheidende Erkenntnis zeigte die geschlechterspezifische Diskrepanz der Ergebnisse. Obwohl die Rolle des Geschlechts im Zusammenhang mit dem Komplikationsaufkommen in der Literatur kontrovers diskutiert wird, stellten sich in der vorliegenden Studie vor allem Risikofaktoren für Frauen heraus (verlängerte Krankenhausverweildauer, erhöhter BMI, Summe FINDRISK, erhöhte Anzahl an Komorbiditäten sowie niedrige CTLA-4 Werte). Für Männer ergab sich lediglich der ermittelte Risikofaktor eines erhöhten Alkoholkonsums. Um die diagnostische Qualität des CTLA-4 für Frauen weiter zu verbessern, wurden die zuvor ermittelten signifikanten Risikofaktoren mit den CTLA-4 Werten kombiniert. Die separate Kombination von CTLA-4 mit der Verweildauer, dem BMI und der Summe FINDRISK führte jeweils zu einer Verbesserung der Sensitivität und Spezifität. Die Ergebnisse sind aufgrund der geringen Anzahl an

Probanden in den Subgruppen trotz einer ermittelten Sensitivität von bis zu 100 % mit gebotener Zurückhaltung zu betrachten.

CTLA-4 stellt anhand der vorliegenden Ergebnisse einen potenziellen Blutmarker für Frauen bei der Identifizierung von Risikopatienten in der Unfallchirurgie dar. Um die Effektivität dieses Zytokinmarkers zur Präventionsdiagnostik weiter zu bestätigen und diesen im klinischen Alltag einsetzen zu können, sind weitere klinische Forschungen durchzuführen.

6 Anhang

1. Materialliste:

Zytokin-Array	Hersteller	Katalognummer
Human Cytokine Array C5	RayBiotech®	Cat# AAH-CYT-5
Human Immune Checkpoint Array C1	RayBiotech®	Cat# AAH-ICM-1
Human Angiogenesis Array C2	RayBiotech®	Cat# AAH-ANG-2
Human TGF beta Array C2	RayBiotech®	Cat# AAH-TGFB-2
ELISA		
Human TIM-1 DuoSet ELISA	R&D Systems®	Cat# DY1750B
Human B7-2/CD86 DuoSet ELISA	R&D Systems®	Cat# DY141-05
Human B7-1/CD80 DuoSet ELISA	R&D Systems®	Cat# DY140
Human TGF-β2 DuoSet ELISA	R&D Systems®	Cat# DY302
Human CTLA-4 DuoSet ELISA	R&D Systems®	Cat# DY386-05
Human IL-1β Standard ABTS ELISA Development Kit	Peprtech®	Cat# 900-K95
Human/Murine/Rat BMP- 2 Standard ABTS ELISA Development Kit	Peprtech®	Cat# 900-K255
Human PIGF-1 Standard ABTS ELISA Development Kit	Peprtech®	Cat# 900-K307
Weitere Chemikalien ELISA		
PBS (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2-7,4, 0,2 µm filtered)	R&D Systems®	Cat#DY006
Wash Buffer (0,05% Tween® 20 in PBS, pH 7,2-7,4)	R&D Systems®	Cat#WA126

Reagent Diluent (1% BSA in PBS, pH 7,2-7,4, 0,2 µm filtered)	R&D Systems®	Cat#DY995
Substrate Solution (1:1 mixture of Color Reagent A (H ₂ O ₂) and Color Reagent B (Tetramethylbenzidine))	R&D Systems®	Cat#DY999
Stop Solution (2N H ₂ SO ₄)	R&D Systems®	Cat#DY994

2. Verwendete Geräte:

Gerät (Typ/Modell)	Hersteller
Kleine Zentrifuge (Sprout)	Heathrow Scientific LLC, MA, USA
Große Zentrifuge (Megafuge 40R)	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Chemolumineszenz- Immunoassay-Analysegerät (Chemocam Imager)	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Germany
Schüttelgerät (BenchRocker 3D)	Benchmark Scientific, New Jersey, USA
Mischer (Vortex Mixer)	Corning Incorporated, New York, USA
Spektralphotometer (Fluostar Omega)	BMG LABTECH GmbH, Germany
Pipetten	Corning, New York, USA; Eppendorf, Hamburg Germany

3. Fragebögen zu AUDIT-C, FINDRISK, Rauchen

<p><u>AUDIT-C Alkoholkonsum</u></p> <p>Wie oft trinken Sie Alkohol?</p> <p><input type="radio"/> Nie (0 Punkte)</p> <p><input type="radio"/> Etwa 1-mal pro Monat (1 Punkt)</p> <p><input type="radio"/> 2–4-mal pro Monat (2 Punkte)</p> <p><input type="radio"/> 2–3-mal pro Woche (3 Punkte)</p> <p><input type="radio"/> 4-mal oder öfter pro Woche (4 Punkte)</p>
--

Wenn Sie an einem Tag Alkohol trinken, wieviel alkoholhaltige Getränke trinken Sie dann typischerweise?

- 1 oder 2 (0 Punkte)
- 3 oder 4 (1 Punkt)
- 5 oder 6 (2 Punkte)
- 7 oder 8 (3 Punkte)
- 10 oder mehr (4 Punkte)

Wie oft haben Sie an einem Tag mehr als 6 alkoholische Getränke getrunken?

- Nie (0 Punkte)
- seltener als 1-mal pro Monat (1 Punkt)
- 1-mal pro Monat (2 Punkte)
- 1-mal pro Woche (3 Punkte)
- täglich oder fast täglich (4 Punkte)

FINDRISK Diabetesrisiko

1. Wie alt sind Sie?

- unter 35 Jahre (0 Punkte)
- 35 bis 45 Jahre (1 Punkt)
- 45 bis 54 Jahre (2 Punkte)
- 55 bis 65 Jahre (3 Punkte)
- älter als 64 Jahre (4 Punkte)

2. Wurde bei mindestens einem Mitglied Ihrer Verwandtschaft Diabetes diagnostiziert?

- Nein (0 Punkte)
- Ja, in der entfernten Verwandtschaft bei leiblichen Großeltern, Tanten, Onkel, Cousinen oder Cousins (3 Punkte)
- Ja, in der nahen Verwandtschaft bei leiblichen Eltern, Kindern oder Geschwistern (5 Punkte)

3. Welchen Taillen-Umfang messen Sie auf Höhe des Bauchnabels?

Frau:

Mann:

unter 80cm (0 Punkte)

unter 94cm (0 Punkte)

80 bis 88cm (3 Punkte)

94 bis 102cm (3 Punkte)

über 88cm (4 Punkte)

über 102cm (4 Punkte)

4. Haben Sie täglich mindestens 30 Minuten körperliche Bewegung?

Ja (0 Punkte)

Nein (2 Punkte)

5. Wie oft essen Sie Obst, Gemüse oder dunkles Brot (Roggen-oder Vollkornbrot)?

Jeden Tag (0 Punkte)

nicht jeden Tag (1 Punkt)

6. Wurden Ihnen schon einmal Medikamente gegen Bluthochdruck verordnet?

Nein (0 Punkte)

Ja (2 Punkte)

7. Wurden bei ärztlichen Untersuchungen schon einmal zu hohe Blutzuckerwerte festgestellt?

Nein (0 Punkte)

Ja (5 Punkte)

8. Wie ist bei Ihnen das Verhältnis von Körpergröße zu Körpergewicht (BMI)?

unter 25 (0 Punkte)

25 bis 30 (1 Punkt)

über 30 (3 Punkte)

Rauchen – Ultrakurzfragebogen RKI

Rauchen Sie zurzeit Zigaretten- wenn ja auch nur gelegentlich?

Ja

Nein, ich habe früher regelmäßig geraucht, aber jetzt nicht mehr

Nein, ich habe noch nie regelmäßig geraucht

Anzahl Zigaretten pro Tag?

Wann haben Sie angefangen regelmäßig zu rauchen (Alter, im Jahr...)?

Anzahl Zigaretten pro Tag (früher)

Wann haben Sie das Rauchen angefangen (Alter, im Jahr..)?

4. Targets Zytokin- Arrays

Human Cytokine Array C5

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	ENA-78 (CXCL5)	G-CSF	GM-CSF	GRO a/b/g	GRO alpha (CXCL1)
2	I-309 (CCL1)	IL-1 alpha (IL-1 F1)	IL-1 beta (IL-1 F2)	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8 (CXCL8)	IL-10
3	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN-gamma	MCP-1 (CCL2)	MCP-2 (CCL8)	MCP-3 (CCL7)	M-CSF	MDC (CCL22)	MIG (CXCL9)	MIP-1 beta (CCL4)
4	MIP-1 delta	RANTES (CCL5)	SCF	SDF-1 alpha	TARC (CCL17)	TGF beta 1	TNF alpha	TNF beta (TNFSF1B)	EGF	IGF-1	Angiogenin
5	OSM	TPO	VEGF-A	PDGF-BB	Leptin	BDNF	BLC (CXCL13)	Ck beta 8-1 (CCL23)	Eotaxin-1 (CCL11)	Eotaxin-2 (CCL24)	Eotaxin-3 (CCL26)
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7 (KGF)	FGF-9	FLT-3 Ligand	Fractalkine (CX3CL1)	GCP-2 (CXCL6)	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10 (CXCL10)	LIF	LIGHT (TNFSF14)	MCP-4 (CCL13)	MIF	MIP-3 alpha	NAP-2 (CXCL7)	NT-3
8	NT-4	OPN (SPP1)	OPG (TNFRSF11)	PARC	PLGF	TGF beta 2	TGF beta 3	TIMP-1	TIMP-2	POS	POS

Human Immune Checkpoint Array C1

Each antibody is spotted in duplicate		A	B	C	D	E	F	G	H
	1	POS	POS	NEG	NEG	4-1BB (CD137)	B7-1/CD80	B7-2/CD86	B7-H2/ICOSL
	2								
	3	B7-H3	B7-H4	CD200	CD200R	CD27	CD270/HVEM	CD27L/CD70	CD28
	4								
	5	CD40L	CTLA4	ICOS	LAG3	OX40	OX40L/CD252	PD-1/CD279	PDL1/B7-H1
	6								
	7	PD-L2	TIM1	TIM3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
	8								

Human Angiogenesis Array C2

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	POS	POS	NEG	NEG	ANGPT1	ANGPT2	PLG	Endostatin
2	POS	POS	NEG	NEG	ANGPT1	ANGPT2	PLG	Endostatin
3	G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 alpha	IL-1 beta	IL-2	IL-4
4	G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 alpha	IL-1 beta	IL-2	IL-4
5	I-TAC	MCP-3	MCP-4	MMP-1	MMP-9	PECAM-1	TIE-2	TNF alpha
6	I-TAC	MCP-3	MCP-4	MMP-1	MMP-9	PECAM-1	TIE-2	TNF alpha
7	uPAR	VEGF R2	VEGFR3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
8	uPAR	VEGF R2	VEGFR3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS

Human TGF beta Array C2

Each antibody is spotted in duplicate vertically		A	B	C	D	E	F	G	H
		POS	POS	NEG	NEG	Activin A	Activin R1A	BAMBI	beta-IG-H3
		BMP2	BMP4	BMP6	BMP7	BMP8	BMP9	BMP15	BMPRIA
		BMPRII	Follistatin	GDF11	GDF15	LeftyA	NOGGIN	SMAD3	SMAD4
		TGFa	TGFb1	TGFb2	TGFbRII	TGFbRIII	NEG	NEG	POS

5. ELISA Protokoll (R&D Systems®)

		TGF-β2	CTLA-4
Day 1	Plate preparation - Capture	2 µg/ml - 30 µl in 5,4 ml	1 µg/ml - 45 µl in 5,4 ml
	diluent	PBS	
	Incubation	50 µl/well ON (RT)	
Day 2	washing step	4X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)	
	blocking unspecific binding sites	150 µl blocking buffer (1 % BSA in PBS) per well for 1 h	
	washing step	4X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)	
	standard incubation	15,6 - 1000 pg/ml	15,6 - 1000 pg/ml
	dilution factor Standard	S1: 8 µl in 460 µl	S1: 8 µl in 520 µl
	dilution factor samples	1 : 5	1 : 10
	sample incubation	50 µl/well RT 2h	
	diluent	1 % BSA in PBS	
	Incubation	50 µl/well for 2 h	
	washing step	4X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)	
	Detection AB	150 ng/ml - 30 µl in 5,4 ml	500 ng/ml - 90 µl in 5,4 ml
	diluent	1 % BSA in PBS	
	Incubation	50 µl/well for 2 h	
	washing step	4X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)	
	Streptavidin-HRP conjugate	1:200 dilution	1:40 dilution
	diluent	1 % BSA in PBS	
	Incubation	50µl/well 20 min at RT - protected from light	
washing step	4X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)		
Substrate Solution	50 µl/well 20-60 min at RT (370 nm)		
Stop solution	50 µl/well --> immediatly into microplate reader (450 / 540 nm)		

		B7-1	B7-2	TIM-1
Day 1	Plate preparation - Capture	4 µg/ml - 30 µl in 5,4 ml	2 µg/ml - 45 µl in 5,4 ml	4 µg/ml - 30 µl in 5,4 ml
	diluent	PBS		
	Incubation	50 µl/well ON (RT)		
Day 2	washing step	4X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)		
	blocking unspecific binding	150 µl blocking buffer (1 % BSA in PBS) per well for 1 h		
	washing step	4X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)		
	standard incubation	15,6 - 1000 pg/ml	31,3 - 2000 pg/ml	7,8 - 500 pg/ml
	dilution factor Standard	S1: 5 µl in 450 µl	S1: 10 µl in 500 µl	S1: 2,5 µl in 500 µl
	dilution factor samples	4 : 5	4 : 5	no dilution
	sample incubation	50 µl/well RT 2h		
	diluent	1 % BSA in PBS		
	Incubation	50 µl/well for 2 h		
	washing step	4X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)		
	Detection AB	125 ng/ml - 30 µl in 5,4 ml	250 ng/ml - 90 µl in 5,4 ml	200 ng/ml - 30 µl in 5,4 ml
	diluent	1 % BSA in PBS		
	Incubation	50 µl/well for 2 h		
	washing step	4X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)		
	Streptavidin-HRP conjugate	1:200 dilution	1:40 dilution	1:200 dilution
	diluent	1 % BSA in PBS		
	Incubation	50µl/well 20 min at RT - protected from light		
	washing step	4X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)		
Substrate Solution	50 µl/well 20-60 min at RT (370 nm)			
Stop solution	50 µl/well --> immediatly into microplate reader (450 / 540 nm)			

6. ELISA Protokoll (Peprotech®)

		human PIGF-1	human BMP-2	human IL-1β
Day 1	Plate preparation - Capture	1 µg/ml (50 µl)	0.5 µg/ml (25 µl) / 50 µl	0.5 µg/ml (25 µl)
	diluent	5 ml PBS		
	Incubation	50 µl/well ON (RT)		
Day 2	washing step	3X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)		
	blocking unspecific binding	150 µl blocking buffer (1 % BSA in PBS) per well for 1 h		
	washing step	3X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)		
	standard incubation	32-2000 pg/ml (2 µl in 1 ml)	47-3000 pg/ml (2 ml in 666 µl)	8-1000 pg/ml (2µl 2 ml)
	sample incubation	1:2	1:2	1:2
	diluent	0.05% Tween-20 and 0.1%BSA in PBS		
	Incubation	50 µl/well for 2 h		
	washing step	3X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)		
	Detection AB	0.5 µg/ml (25 µl)	0.5 µg/ml (50 µl)	0.5 µg/ml (25 µl)
	diluent	0.05% Tween-20 and 0.1%BSA in PBS		
	Incubation	50 µl/well for 2 h		
	washing step	3X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)		
	Avidin-HRP conjugate	1:2000 dilution (5.5 µl in 11 ml diluent)		
	diluent	0.05% Tween-20 and 0.1%BSA in PBS		
Incubation	30 min at RT			
washing step	3X washing with washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS)			
ABTS	100 µl / well => measure immediatly			

6.1 Literaturverzeichnis:

1. Rupp M, Walter N, Pfeifer C, Lang S, Kerschbaum M, Krusch W, et al. The Incidence of Fractures Among the Adult Population of Germany—an Analysis From 2009 through 2019. *Dtsch Arztebl Int.* 2021;118(40):665-9.
2. Zura R, Xiong Z, Einhorn T, Watson JT, Ostrum RF, Prayson MJ, et al. Epidemiology of Fracture Nonunion in 18 Human Bones. *JAMA Surg.* 2016;151(11):e162775.
3. Zimmermann G. Verzögerte Knochenheilung. In: Biberthaler P, van Griensven M, editors. *Knochendefekte und Pseudarthrosen.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017. p. 63-76.
4. Gardner MJ, Higgins TA, Harvin WH, Stannard JP, Lee MA, Crist BD. What Is Important Besides Getting the Bone to Heal? Impact on Tissue Injury Other Than the Fracture. *Journal of Orthopaedic Trauma.* 2018;32:S21-S4.
5. Johnson L, Igoe E, Kleftouris G, Papachristos IV, Papakostidis C, Giannoudis PV. Physical Health and Psychological Outcomes in Adult Patients with Long-bone Fracture Non-unions: Evidence Today. *J Clin Med.* 2019;8(11).
6. Whitehouse JD, Friedman ND, Kirkland KB, Richardson WJ, Sexton DJ. The impact of surgical-site infections following orthopedic surgery at a community hospital and a university hospital: adverse quality of life, excess length of stay, and extra cost. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2002;23(4):183-9.
7. Scholes S, Panesar S, Shelton NJ, Francis RM, Mirza S, Mindell JS, et al. Epidemiology of lifetime fracture prevalence in England: a population study of adults aged 55 years and over. *Age Ageing.* 2014;43(2):234-40.
8. Bastian O, Pillay J, Alblas J, Leenen L, Koenderman L, Blokhuis T. Systemic inflammation and fracture healing. *Journal of Leukocyte Biology.* 2011;89(5):669-73.
9. Konrads C, Giebel G. Grundlagen der Frakturheilung und Bedeutung für die Osteosynthese. *Chirurgische Allgemeine Zeitung.* 2012;13:468-70.
10. Saul D, Khosla S. Fracture Healing in the Setting of Endocrine Diseases, Aging, and Cellular Senescence. *Endocr Rev.* 2022;43(6):984-1002.
11. Omar M, Graulich T. Komplikationen der Frakturbehandlung. In: Engelhardt M, Raschke M, editors. *Orthopädie und Unfallchirurgie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020. p. 1-31.
12. Feuchtenberger M, Kneitz C, Tony HP. Zytokine. *Zeitschrift für Rheumatologie.* 2007;66(4):297-303.
13. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2003;88(5):873-84.
14. Yeung H-Y, Lee K-M, Fung K-P, Leung K-S. Sustained expression of transforming growth factor- β 1 by distraction during distraction osteogenesis. *Life Sciences.* 2002;71(1):67-79.
15. Zimmermann G, Moghaddam A, Reumann M, Wangler B, Breier L, Wentzensen A, et al. TGF- β 1 als pathophysiologischer Faktor bei der Frakturheilung. *Der Unfallchirurg.* 2007;110(2):130-6.

16. Maruyama M, Rhee C, Utsunomiya T, Zhang N, Ueno M, Yao Z, et al. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:386.
17. Claes L, Augat P, Suger G, Wilke HJ. Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res*. 1997;15(4):577-84.
18. Harvin WH, Oladeji LO, Della Rocca GJ, Murtha YM, Volgas DA, Stannard JP, et al. Working length and proximal screw constructs in plate osteosynthesis of distal femur fractures. *Injury*. 2017;48(11):2597-601.
19. Little CP, Burston BJ, Hopkinson-Woolley J, Burge P. Failure of surgery for scaphoid non-union is associated with smoking. *J Hand Surg Br*. 2006;31(3):252-5.
20. Kyrö A, Usenius JP, Aarnio M, Kunnamo I, Avikainen V. Are smokers a risk group for delayed healing of tibial shaft fractures? *Ann Chir Gynaecol*. 1993;82(4):254-62.
21. Donigan JA, Fredericks DC, Nepola JV, Smucker JD. The effect of transdermal nicotine on fracture healing in a rabbit model. *J Orthop Trauma*. 2012;26(12):724-7.
22. Probst S. Welche Einflussfaktoren können eine Wundheilung hemmen? *Wund*. 2012:78.
23. Ehnert S, Aspera-Werz RH, Ihle C, Trost M, Zirn B, Flesch I, et al. Smoking Dependent Alterations in Bone Formation and Inflammation Represent Major Risk Factors for Complications Following Total Joint Arthroplasty. *J Clin Med*. 2019;8(3).
24. Sopori ML, Kozak W, Savage SM, Geng Y, Soszynski D, Kluger MJ, et al. Effect of nicotine on the immune system: possible regulation of immune responses by central and peripheral mechanisms. *Psychoneuroendocrinology*. 1998;23(2):189-204.
25. Lindström D, Sadr Azodi O, Wladis A, Tønnesen H, Linder S, Nåsell H, et al. Effects of a perioperative smoking cessation intervention on postoperative complications: a randomized trial. *Ann Surg*. 2008;248(5):739-45.
26. Boskey AL, Coleman R. Aging and bone. *J Dent Res*. 2010;89(12):1333-48.
27. Beckmann R, Tohidnezhad M, Lichte P, Wruck CJ, Jahr H, Pape HC, et al. Aus alt mach neu. *Der Orthopäde*. 2014;43(4):298-305.
28. Starostzik C. Osteoporose im hohen Alter managen. *CME*. 2015;12(1):38-9.
29. Nikolaou VS, Efsthopoulos N, Kontakis G, Kanakaris NK, Giannoudis PV. The influence of osteoporosis in femoral fracture healing time. *Injury*. 2009;40(6):663-8.
30. Haffner-Luntzer M, Ignatius A. Biologische Einflussfaktoren auf die Knochenbruchheilung. *OP-Journal*. 2019;35(01):5-10.
31. Peichl P. Knochenstoffwechsel bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen. *J MINER STOFFWECHS*. 2015;22(1):5-9.
32. LODER RT. The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*. 1988;232:210-6.

33. Kayal RA, Siqueira M, Alblowi J, McLean J, Krothapalli N, Faibish D, et al. TNF- α mediates diabetes-enhanced chondrocyte apoptosis during fracture healing and stimulates chondrocyte apoptosis Through FOXO1. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010;25(7):1604-15.
34. Kaufmann SH, Kaufmann S. T-Zellen. *Basiswissen immunologie*. 2014:63-83.
35. Reinke S, Geissler S, Taylor WR, Schmidt-Bleek K, Juelke K, Schwachmeyer V, et al. Terminally Differentiated CD8⁺ T Cells Negatively Affect Bone Regeneration in Humans. *Science Translational Medicine*. 2013;5(177):177ra36-ra36.
36. Obese H. Body mass index (BMI). *Obes Res*. 1998;6(2):51S-209S.
37. Whiting PS, White-Dzuro GA, Avilucea FR, Dodd AC, Lakomkin N, Obremesky WT, et al. Body mass index predicts perioperative complications following orthopaedic trauma surgery: an ACS-NSQIP analysis. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2017;43(2):255-64.
38. Lories RJ, Luyten FP. Bone morphogenetic protein signaling and arthritis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(5-6):467-73.
39. Tsumaki N, Yoshikawa H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(3):279-85.
40. Jacobs C, Moghaddam A, Wöfl C, von der Linden P, Wentzensen A, Zimmermann G. Wachstumshormone und BMP. *Trauma und Berufskrankheit*. 2008;10(2):226-9.
41. Moghaddam-Alvandi A, Zimmermann G, Büchler A, Elleser C, Biglari B, Grütznert PA, et al. Ergebnisse der Pseudarthrosenbehandlung mit „bone morphogenetic protein 7“ (BMP-7). *Der Unfallchirurg*. 2012;115(6):518-26.
42. Hausmann M, Ehnert S, Hofmann V, Döbele S, Freude T, Stöckle U, et al. Einsatz der Bone morphogenetic Proteins (BMPs) zur Behandlung von Pseudarthrosen—Effizienz und Therapieversagen. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*. 2014;152(02):144-51.
43. Effects of Electromagnetic Stimulation on Calcified Matrix Production by SAOS-2 Cells over a Polyurethane Porous Scaffold. *Tissue Engineering*. 2006;12(7):1985-99.
44. Seeliger C, Falldorf K, Sachtleben J, Griensven Mv. Low-frequency pulsed electromagnetic fields significantly improve time of closure and proliferation of human tendon fibroblasts. *European journal of medical research*. 2014;19:1-7.
45. Ehnert S, Falldorf K, Fentz A-K, Ziegler P, Schröter S, Freude T, et al. Primary human osteoblasts with reduced alkaline phosphatase and matrix mineralization baseline capacity are responsive to extremely low frequency pulsed electromagnetic field exposure—Clinical implication possible. *Bone Reports*. 2015;3:48-56.
46. Bassett C, Pawluk R, Pilla A. Acceleration of fracture repair by electromagnetic fields. A surgically noninvasive method. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1974;238(1):242-62.
47. Griffin XL, Costa ML, Parsons N, Smith N. Electromagnetic field stimulation for treating delayed union or non-union of long bone fractures in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011(4).

48. Liu Y, Hao L, Jiang L, Li H. Therapeutic effect of pulsed electromagnetic field on bone wound healing in rats. *Electromagnetic Biology and Medicine*. 2021;40(1):26-32.
49. Chiari C, Walzer S, Stelzeneder D, Schreiner M, Windhager R. Therapeutische Anwendung von Stammzellen in der Orthopädie. *Der Orthopäde*. 2017;46(12):1077-90.
50. Murena L, Canton G, Vulcano E, Surace MF, Cherubino P. Treatment of humeral shaft aseptic nonunions in elderly patients with opposite structural allograft, BMP-7, and mesenchymal stem cells. *Orthopedics*. 2014;37(2):e201-6.
51. Utsunomiya T, Zhang N, Lin T, Kohno Y, Ueno M, Maruyama M, et al. Different effects of intramedullary injection of mesenchymal stem cells during the acute vs. Chronic inflammatory phase on bone healing in the murine continuous polyethylene particle infusion model. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021;9:631063.
52. Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz. AIQNET- Medical Data Ecosystem 2020 [Available from: https://www.digitale-technologien.de/DT/Redaktion/DE/Standardartikel/KuenstlicheIntelligenzProjekt/e/KuenstlicheIntelligenz_ErsterFoerderaufruf/ki-projekt_AIQNET.html].
53. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg*. 2004;240(2):205-13.
54. Andrea Schuppenies HJ, Stefan Bornstein und Peter Egbert Herrmann Schwarz. FINDRISK: Finde das Risiko!
- Entwicklung eines Fragebogens zur Einschätzung des Diabetesrisikos. *Ernährungs-Umschau* 53 (Heft 10). 2006:386-9.
55. Navickas R, Petric VK, Feigl AB, Seychell M. Multimorbidity: What do we know? What should we do? *J Comorb*. 2016;6(1):4-11.
56. Beyene RT, Derryberry SL, Jr., Barbul A. The Effect of Comorbidities on Wound Healing. *Surg Clin North Am*. 2020;100(4):695-705.
57. Garcia P, Langer M, Raschke M. Das biologische Skalpell I– Frakturheilung und patientenbezogene Einflussfaktoren. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*. 2015;153(04):433-40.
58. Roche JJ, Wenn RT, Sahota O, Moran CG. Effect of comorbidities and postoperative complications on mortality after hip fracture in elderly people: prospective observational cohort study. *Bmj*. 2005;331(7529):1374.
59. Kruppa C, Maier C, Zahn P, Schildhauer T. Veränderung der Altersstruktur und Häufigkeit von Komorbiditäten bei Patienten im bg-lichen Heilverfahren. *Unfallchirurg*. 2019;122:626-32.
60. Alfonso AR, Kantar RS, Ramly EP, Daar DA, Rifkin WJ, Levine JP, et al. Diabetes is associated with an increased risk of wound complications and readmission in patients with surgically managed pressure ulcers. *Wound Repair Regen*. 2019;27(3):249-56.
61. Fügener S. Retrospektive Studie zu den potentiellen Risikofaktoren für Frakturheilungsstörungen an der Charité-Universitätsmedizin Berlin 2017.
62. Mostafa G, Huynh T, Sing RF, Miles WS, Norton HJ, Thomason MH. Gender-Related Outcomes in Trauma. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2002;53(3):430-5.

63. Marfil-Garza BA, Belaunzarán-Zamudio PF, Gulias-Herrero A, Zuñiga AC, Caro-Vega Y, Kershenovich-Stalnikowitz D, et al. Risk factors associated with prolonged hospital length-of-stay: 18-year retrospective study of hospitalizations in a tertiary healthcare center in Mexico. *PLoS One*. 2018;13(11):e0207203.
64. Weinrich J. Inzidenz, Risikofaktoren und Krankenhausverweildauer des postpunktionellen Kopfschmerzes nach Spinalanästhesie in der Unfallchirurgie und Geburtsmedizin: eine vergleichende Untersuchung 2019.
65. Mertens C, Ernst K, Körber M, Post S, Kienle P, Nowak K, et al. Assoziation zwischen Komplikationsschwere und der Krankenhausverweildauer nach Tumorresektionen am oberen Gastrointestinaltrakt. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2014;52(08):KC071.
66. De la Garza-Ramos R, Goodwin CR, Abu-Bonsrah N, Jain A, Miller EK, Neuman BJ, et al. Prolonged length of stay after posterior surgery for cervical spondylotic myelopathy in patients over 65 years of age. *J Clin Neurosci*. 2016;31:137-41.
67. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA, et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation*. 2014;129(25 Suppl 2):S102-38.
68. Ennker J, Schoeneich R, Schröder T, Schoeneich F, Ennker I. Der Einfluss von extremer Adipositas auf den peri- und postoperativen Verlauf nach aortokoronarer Bypassoperation. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2001;126(15):419-23.
69. Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;69(1):29-35.
70. Wang T, He C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018;44:38-50.
71. Hameed M, Geerling E, Pinto AK, Miraj I, Weger-Lucarelli J. Immune response to arbovirus infection in obesity. *Front Immunol*. 2022;13:968582.
72. Fontana L, Eagon JC, Colonna M, Klein S. Impaired mononuclear cell immune function in extreme obesity is corrected by weight loss. *Rejuvenation Res*. 2007;10(1):41-6.
73. Spaine LA, Bollen SR. 'The bigger they come ...': the relationship between body mass index and severity of ankle fractures. *Injury*. 1996;27(10):687-9.
74. Bushard S. Trauma in patients who are morbidly obese. *Aorn j*. 2002;76(4):585-9.
75. Kurscheid T, Lauterbach K. The cost implications of obesity for health care and society. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*. 1998;22:S3-5; discussion S6.
76. Eschbach D, Bliemel E, Aigner R, Rolfes C, Ruchholtz S, Buecking B. Mangelernährung bei geriatrischen Traumapatienten. *Osteologie*. 2014;23(01):5-10.
77. Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol*. 2007;166(5):495-505.

78. Lange C, Manz K, Kuntz B. Alkoholkonsum bei erwachsenen in deutschland: riskante trinkmengen. 2017.
79. Rosa DF, Sarandy MM, Novaes RD, Freitas MB, do Carmo Gouveia Pelúzio M, Gonçalves RV. High-Fat Diet and Alcohol Intake Promotes Inflammation and Impairs Skin Wound Healing in Wistar Rats. *Mediators of Inflammation*. 2018;2018:4658583.
80. Chakkalakal DA, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ, McVicker DL, Garvin KL, et al. Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption. *Alcohol*. 2005;36(3):201-14.
81. Gazit D, Zilberman Y, Turgeman G, Zhou S, Kahn A. Recombinant TGF-beta1 stimulates bone marrow osteoprogenitor cell activity and bone matrix synthesis in osteopenic, old male mice. *J Cell Biochem*. 1999;73(3):379-89.
82. Haubruck P, Tanner MC, Vlachopoulos W, Hagelskamp S, Miska M, Ober J, et al. Comparison of the clinical effectiveness of Bone Morphogenic Protein (BMP) -2 and -7 in the adjunct treatment of lower limb nonunions. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*. 2018;104(8):1241-8.
83. Lee J, Phong B, Egloff AM, Kane LP. TIM polymorphisms--genetics and function. *Genes Immun*. 2011;12(8):595-604.
84. Mesri M, Smithson G, Ghatpande A, Chapoval A, Shenoy S, Boldog F, et al. Inhibition of in vitro and in vivo T cell responses by recombinant human Tim-1 extracellular domain proteins. *Int Immunol*. 2006;18(3):473-84.
85. Xie X, Shi X, Chen P, Rao L. Associations of TIM-1 Genetic Polymorphisms with Asthma: A Meta-analysis. *Lung*. 2017;195(3):353-60.
86. Mori Y, Fink C, Ichimura T, Sako K, Mori M, Lee NN, et al. KIM-1/TIM-1 is a Receptor for SARS-CoV-2 in Lung and Kidney. *medRxiv*. 2022.
87. Allison JP. CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Current Opinion in Immunology*. 1994;6(3):414-9.
88. Greene JL, Leytze GM, Emswiler J, Peach R, Bajorath J, Cosand W, et al. Covalent dimerization of CD28/CTLA-4 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions. *J Biol Chem*. 1996;271(43):26762-71.
89. Nagel T, Kalden JR, Manger B. [Regulation of T-cell activation by CD28 and CTLA-4]. *Med Klin (Munich)*. 1998;93(10):592-7.
90. Nolan A, Kobayashi H, Naveed B, Kelly A, Hoshino Y, Hoshino S, et al. Differential role for CD80 and CD86 in the regulation of the innate immune response in murine polymicrobial sepsis. *PLoS One*. 2009;4(8):e6600.
91. Artlett CM. Inflammasomes in wound healing and fibrosis. *The Journal of pathology*. 2013;229(2):157-67.
92. Rapala K, editor *The effect of tumor necrosis factor-alpha on wound healing. An experimental study. Annales chirurgiae et gynaecologiae Supplementum*; 1996.
93. Grellner W, Georg T, Wilske J. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds. *Forensic Sci Int*. 2000;113(1-3):251-64.
94. Dinarello CA, van der Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Seminars in Immunology*. 2013;25(6):469-84.
95. Maes C, Coenegrachts L, Stockmans I, Daci E, Luttun A, Petryk A, et al. Placental growth factor mediates mesenchymal cell development, cartilage

- turnover, and bone remodeling during fracture repair. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1230-42.
96. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1994;1(5):405-13.
97. Serwas NK, Hoeger B, Ardy RC, Stulz SV, Sui Z, Memaran N, et al. Human DEF6 deficiency underlies an immunodeficiency syndrome with systemic autoimmunity and aberrant CTLA-4 homeostasis. *Nature Communications.* 2019;10(1):3106.
98. Gaber T, Schönbeck K, Hoff H, Tran CL, Strehl C, Lang A, et al. CTLA-4 Mediates Inhibitory Function of Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018;19(8):2312.
99. Jiang H, Ti Y, Wang Y, Wang J, Chang M, Zhao J, et al. Downregulation of regulatory T cell function in patients with delayed fracture healing. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018;45(5):430-6.
100. Bozec A, Zaiss MM, Kagwiria R, Voll R, Rauh M, Chen Z, et al. T cell costimulation molecules CD80/86 inhibit osteoclast differentiation by inducing the IDO/tryptophan pathway. *Sci Transl Med.* 2014;6(235):235ra60.
101. Kvistborg P, Philips D, Kelderman S, Hageman L, Ottensmeier C, Joseph-Pietras D, et al. Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. *Sci Transl Med.* 2014;6(254):254ra128.
102. Zander H, Müller-Egert S, Zwiewka M, Groß S, van Zandbergen G, Engelbergs J. Checkpointinhibitoren in der Tumorthherapie. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 2020;63(11):1322-30.
103. Körmندی D, Hoff H, Hoff P, Bröker BM, Burmester GR, Brunner-Weinzierl MC. Impact of the CTLA-4/CD28 axis on the processes of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):81-7.
104. Krüger K, Gaubitz Mu, DGRh KPd. Empfehlungen zum Einsatz von Abatacept bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. *Zeitschrift für Rheumatologie.* 2008;67(7):614-6.
105. Clavien PA, Sanabria JR, Strasberg SM. Proposed classification of complications of surgery with examples of utility in cholecystectomy. *Surgery.* 1992;111(5):518-26.
106. Clavien PA, Barkun J, de Oliveira ML, Vauthey JN, Dindo D, Schulick RD, et al. The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. *Ann Surg.* 2009;250(2):187-96.
107. Suda AJ, Winkler KA, Grützner PA, Thoele PC, Heppert VG, Franke J. High complication rate after septic orthopaedic implant removal of the lower leg. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2014;134(12):1655-60.
108. Halvachizadeh S, Teuber H, Cinelli P, Allemann F, Pape H, Neuhaus V. Does the time of day in orthopedic trauma surgery affect mortality and complication rates? *Patient Safety in Surgery.* 2019;13.
109. Anderson BR, Wallace AS, Hill KD, Gulack BC, Matsouaka R, Jacobs JP, et al. Association of Surgeon Age and Experience With Congenital Heart Surgery Outcomes. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2017;10(7).

110. Zhang X, Wang G, Sun Y, Ding P, Yang X, Zhao Z. The Z-plasty contributes to the coalescence of a chronic non-healing wound. *Int Wound J*. 2021;18(6):796-804.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Siegfried-Weller-Institut für unfallmedizinische Forschung (SWI) unter Betreuung von Prof. Dr. Andreas Nüssler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Andreas Nüssler.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Mit-Betreuerin Regina Breinbauer von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen nach Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Blumenstock durch mich.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Michelle Mäling

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas Nüssler für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit und die professionelle, wissenschaftliche Unterstützung während der gesamten Promotion bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Regina Breinbauer, die mit ihrer konstanten Geduld, ausführlichen, fachlichen Erklärungen und zielführenden Struktur maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Weiterhin danke ich dem gesamten Team des Siegfried-Weller-Instituts für die professionelle Beantwortung sämtlicher Fragen und natürlich für die schöne gemeinschaftliche Zeit.

Zudem möchte ich den Mitarbeitern des klinischen Studienzentrums der BG Klinik Tübingen danken, mit deren engagierten Hilfe und strukturierten Arbeitsweise die Aufnahme der Patienten für diese Studie ermöglicht wurde.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie für die liebevolle und motivierende Unterstützung.