

Der Einfluss von aktiviertem Protein C und Thrombin auf die Mortalität und Morbidität nach Polytrauma: Eine geplante longitudinale Reihenuntersuchung

Karl V¹, Schäfer N¹, Müller J², Maegle M^{1,3}, Caspers M^{1,3}

¹ Universität Witten/Herdecke, Institut für Forschung in der Operativen Medizin (IFOM)

² Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin (IHT), Universitätsklinik Bonn

³ Klinik für Orthopädie, Unfallchirurgie und Sporttraumatologie, Kliniken der Stadt Köln

Hintergrund

Traumata als Unfallfolge gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Ein Viertel bis ein Drittel der Patienten mit Blutungen in Folge des Traumas leiden an einer Trauma-induzierten Koagulopathie (engl. trauma-induced coagulopathy, TIC). TIC ist das Resultat aus Gewebeerletzung und Gewebhypoperfusion infolge des Schocks. Die Aktivierung des Protein-C-Signalweges (aPC) nimmt eine Schlüsselrolle in dieser Entwicklung ein, da es unter anderem für die Regulation des Thrombins verantwortlich ist. Die direkte Messung des Thrombins war bislang aufgrund seiner geringen Konzentration und schwierigen Unterscheidung zum Vorläuferenzym Prothrombin limitiert. 2011 publizierte Müller et al. erstmals eine Methode, welche auf einem Oligonukleotid-Enzyme-Capture-Assay (OECA) basiert und eine quantitative Ermittlung der aPC- bzw. Thrombinaktivität erlaubt.

Ziel und Hypothesen

Basierend auf den pathophysiologischen Erkenntnisgewinn einer TIC sowie den fortgeschrittenen labortechnischen Methoden hat die vorliegende Studie das Ziel aPC- und Thrombinspiegel bei Traumapatienten mit unterschiedlichen Traumamechanismen sowie Traumaentitäten zu ermitteln und diese für prognostische sowie prädiagnostische Informationen für das Vorliegen einer TIC zu nutzen.

Hypothesen

- APC- und Thrombinspiegel lassen sich mittels Enzyme-Capture-Assay quantifizieren.
- Erhöhte aPC-Spiegel stellen einen ätiologischen Faktor in der Pathogenese der TIC dar.
- APC- und/oder Thrombinspiegel sind ein diagnostischer Serummarker.
- APC- und/oder Thrombinspiegel sind ein prädiagnostischer Serummarker.
- Das Markerprofil ermöglicht den optimalen Zeitpunkt für die Bestimmung von aPC- und Thrombinspiegel für diagnostische Zwecke zu ermitteln.

Material und Methoden

Es werden 20 Polytraumapatienten der Klinik für Orthopädie, Unfallchirurgie und Sporttraumatologie der Kliniken der Stadt Köln mit einer Verletzungsschwere (Injury Severity Score, ISS) ≥ 16 eingeschlossen. Im Rahmen einer longitudinalen Reihenuntersuchung wird den Patienten zu spezifischen Zeitpunkten Blut für die nachfolgende klinische Routinediagnostik sowie gerinnungsphysiologische Untersuchung entnommen (**Abb. 1**):

1. Blutbild
2. Standard Gerinnungsdiagnostik
3. Blutgasanalyse
4. ROTEM®-Thrombelastometrie
5. Thrombin-Spiegel (OLIGOBIND® Thrombin activity assay)
6. aPC-Spiegel (OLIGOBIND® APC activity assay)
7. Prothrombinfragmente 1 und 2 (F1.2)
8. Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT-Komplex)
9. Erweiterte Gerinnungsdiagnostik (FV, FVII, FVIII, FX)

Prinzip der OECA-Methodik am Beispiel von Thrombin

Aptamere sind RNA- und DNA-Oligonucleotide, die aufgrund ihrer spezifischen räumlichen Struktur eine hohe Affinität zu einem Zielmolekül besitzen. Die Mikrotiterplatte des OLIGOBIND® Thrombin activity assays ist mit dem zweiwertigen Aptamer HD1-22 beladen, welches hochaffin Thrombin bindet und beide Anionenbindungsstellen besetzt, ohne das aktive Zentrum des Enzyms zu blockieren. Letzteres spaltet mittels proteolytischer Aktivität ein fluorogenes Proteinsubstrat und ermöglicht so die quantitative Messung des gebundenen Thrombins. (**Abb.2**)

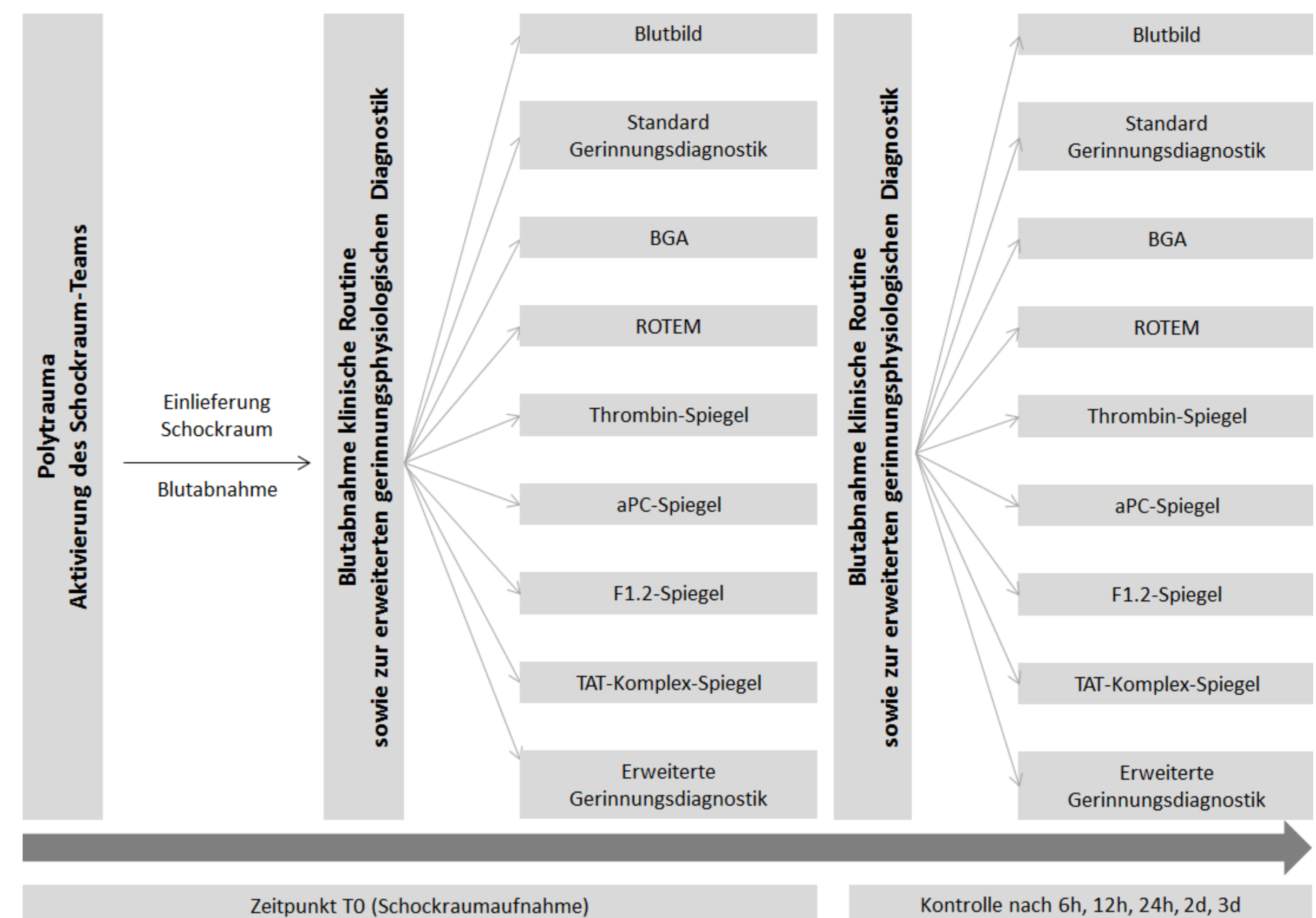


Abb. 1: Skizziert der Untersuchungsablauf der longitudinalen Reihenuntersuchung bei 20 Polytraumapatienten mit ISS ≥ 16 .

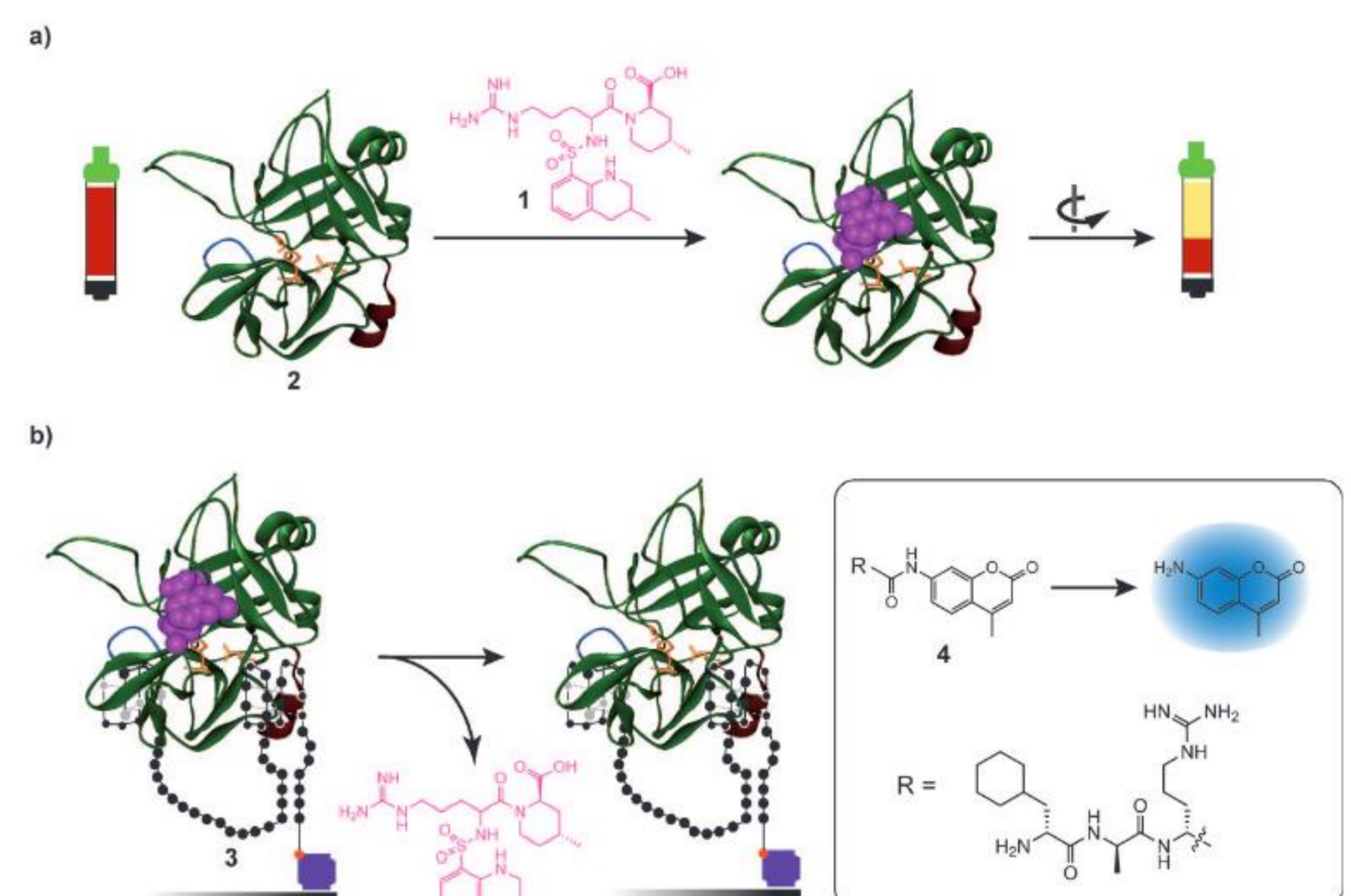


Abb. 2: Prinzip des OECA zur Thrombinbestimmung. a) Der Blutprobe, welche Thrombin (2) enthält, wird ein Antikoagulans (Citrat) und ein reversibler Inhibitor des aktiven Zentrums (Argatroban, 1) zugesetzt. Die Komplexbildung zwischen Argatroban und Thrombin verhindert die irreversible Hemmung von Thrombin durch endogene Thrombininhibitoren. b) HD1-22 beladene Mikrotiterplatte wird mit Plasma überlagert (3). Nach Inkubation werden die Vertiefungen gewaschen, um Plasmareste und reversibel gebundenes Argatroban zu entfernen. Anschließend wird ein Thrombin-spezifisches Peptidsubstrat (H-D-CHA-Ala-Arg-AMC, 4) mit fluorogenem 7-Amino-4-methylcumarin-Rest (AMC) zugegeben, um die Menge an funktionell aktivem Thrombin quantitativ zu bestimmen.

Erwartete Ergebnisse

Unsere Studie komplementiert einen ersten Versuchsteil mit 73 Traumapatienten, denen einmalig im Zuge der Schockraumdiagnostik Blut entnommen und analog untersucht wurde. Deren bislang noch nicht publizierten Ergebnisse bestätigen eine positive Korrelation zwischen steigenden Thrombin- bzw. aPC-Werten und dem Schweregrad der Verletzung. Unsere Daten liefern insbesondere Hinweise auf einen ISS-, Zeit- und lokoregionär-abhängigen aPC-ausgelösten Mechanismus. Überdies fallen die Berechnungen zur prognostischen Aussagekraft der aPC-Spiegel für eine Koagulopathie positiv aus.

Für den hier vorgestellten zweiten Studienarm wird erwartet, dass sich die Plasmakonzentrationen der untersuchten Serummarker zeitabhängig vom Unfallzeitpunkt verändern. Es wird ein Markerprofil erstellt, anhand dessen der optimale Zeitpunkt für Blutabnahmen zur Diagnostik einer TIC bestimmt wird. Im Zuge dessen wird davon ausgegangen, dass der aPC- und/oder der Thrombinspiegel sowohl einen diagnostischen als auch prädiagnostischen Wert für das Vorliegen einer TIC hat.

Literatur

Müller J, Becher T, Braunstein J, et al. (2011) Profiling of active thrombin in human blood by supramolecular complexes. *Angew Chemie - Int Ed.* <https://doi.org/10.1002/anie.201007032>