

Aus der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

Auftreten und Dynamik der Entwicklung von schwerer Sepsis und  
septischem Schock bei intensivstationären Patienten mit Polymorphismen  
der Toll-like Rezeptoren 2 und 4

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

von

Andrey Tamarkin  
aus Moskau

Gutachter:

- 1.: Prof. Dr. med. C. Spies
- 2.: Prof. Dr. med. P. Gastmeier
- 3.: Priv.-Doz. Dr. med. M. Schuster

Datum der Promotion: 03.06.2012

## Vorveröffentlichungen

Teilergebnisse dieser Promotion sind vor Abschluss des Promotionsverfahrens mit Genehmigung des Promotionsausschusses der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin in folgender Originalarbeit für die Publikation eingereicht:

Nachtigall I, Tamarkin A (equal parts), Tafelski S, Weimann A, Rothbart A, Heim S, Wernecke KD and Spies C.

*Polymorphisms of Toll-like Receptor 2 and 4 are associated with faster progression and more severe course of sepsis in critically ill patients.*

Clinical Infectious Diseases 2011 (under review)

Abstracts zu diesem Studienprojekt wurden zudem veröffentlicht in:

Tamarkin A, Nachtigall I, Schaller K, Weimann A, Spies C. *Toll-like receptor 4 polymorphism is associated with increased gram-negative infection and nosocomial pneumonia in critically ill patients.* Abstract. American Thoracic Society 2008 International Conference, Toronto, Ontario. Page A584.

Tamarkin A, Tafelski S, Nachtigall I, Spies C. *Auftreten und Dynamik der Entwicklung von schwerer Sepsis und septischem Schock bei intensivstationären Patienten mit Polymorphismen der Toll-like Rezeptoren 2 und 4.* Abstract \*.

Kongress der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensivmedizin und Notfallmedizin, DIVI 2010, Hamburg. P/07/05

---

\*Das Poster zu diesem Studienprojekt wurde mit dem 1. Forschungspreis des Kongresses der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensivmedizin und Notfallmedizin 2010 honoriert.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
2.1. Stellenwert der Sepsis aus Sicht der Intensivmedizin	8
2.2. Angeborene Immunantwort	8
2.3. Rolle der Toll-like Rezeptoren	8
2.4. Studienlage	10
2.5. Haupthypothese und Ziele der Studie	10
<b>3. PATIENTEN UND METHODEN</b>	<b>11</b>
3.1. Studienbeschreibung und Erhebungszeitraum	11
3.2. Ethikvotum und Datenschutzvotum	11
3.3. Studienlokalisierung	11
3.4. Patienten	12
3.5. Ein- und Ausschlusskriterien	12
3.6. Datenerfassung	12
3.7. Genotypisierung der Toll-like Rezeptoren 2 und 4	13
3.7.1. Blutabnahme	13
3.7.2. DNA-Extraktion und Reinigung	13
3.7.3. Genotypisierung der R753Q und D299G Polymorphismen	13
3.7.4. Gruppenzuordnung	14
3.8. Outcomeparameter	15
3.8.1. Primärer Endpunkt	15
3.8.2. Sekundäre Endpunkte	15
3.9. Definition der Infektionen, Sepsis und schwer zu behandelnder Erreger	16
3.10. Statistik	17
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>19</b>
4.1. Eingeschlossene Patienten	19
4.2. Basischarakteristika	19
4.3. Verteilung der Infektionen	23
4.4. Das Auftreten von Sepsis und die Erkrankungsschwere	24

4.4.1. Häufigkeit der Sepsissyndrome	24
4.4.2. Analyse der Erkrankungsschwere	25
4.4.3. Zeit bis zur septischen Komplikation	30
4.5. Mortalität und weitere Outcome-Parameter	32
4.5.1. Sterblichkeit	32
4.5.2. Dauer der maschinellen Beatmung und der intensivstationären Behandlung	32
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>33</b>
5.1. Hauptergebnis	33
5.2. Basischarakteristika	33
5.3. Rolle der Toll-like Rezeptoren während einer Infektion	33
5.4. Einfluss von Single Nukleotid Polymorphismen der Toll-like Rezeptoren auf den Infektionsverlauf	34
5.5. TLR Single Nukleotid Polymorphismen und Schwere der Sepsis	34
5.6. Infektionsrate	35
5.6.1. Infektionsrate in der TLR4 Gruppe	35
5.6.2. Infektionsrate in der TLR2 Gruppe	36
5.7. Einfluss auf das Outcome	37
5.7.1. Sterblichkeit	37
5.7.2. Dauer der maschinellen Beatmung und der intensivstationären Behandlung	38
5.8. Einschränkungen	39
5.9. Ausblick	39
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>41</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>43</b>
<b>8. DANKSAGUNG</b>	<b>48</b>
<b>9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>49</b>
<b>10. LEBENS LAUF</b>	<b>50</b>

## 1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACCP	American College of Chest Physicians
APACHE-II	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation Score
ARDS	engl., Adult Respiratory Distress Syndrome, Atemnot-Syndrom des Erwachsenen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	engl., epidermal growth factor receptor, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ESBL	engl., Extended-Spectrum Beta-Lactamase
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ITS	Intensivstation
mRNA	engl., messenger Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MW	Mittelwert
NFκB	Nukleärer Factor kappa B
NHBE	engl., normal human bronchial epithelium, normale menschliche bronchiale Epithelzellen
PAMP	engl., pathogen-associated molecular pattern, Pathogen-assoziierte molekuläre Muster
PCR	engl., Polymerase-Kettenreaktion
PIRO	Prädisposition, Infektion, Response, Organ Dysfunktion Konzept
PRR	engl., pattern recognition receptor, Muster-erkennender Rezeptor
SAPS II	Simplified Acute Physiology Score
SCCM	Society of Critical Care Medicine
STD	engl., standard deviation, Standardabweichung
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom
SNP	engl., Single Nukleotide Polymorphism, Einzelnukleotid- Polymorphismus
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment Score
TIRAP/Mal	engl., toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein
TISS-28	Therapeutic Intervention Scoring System
TLR	Toll-like Rezeptor

VEGF engl., vascular endothelial growth factor, Wachstumsfaktor des Gefäßendothels

VRE Vancomycin-resistenter Enterokokkus

## 2. EINLEITUNG

### 2.1. Stellenwert der Sepsis aus Sicht der Intensivmedizin

Bei Patienten, die sich einer intensivmedizinischen Therapie unterziehen müssen, stellen Infektionen ein ernsthaftes Problem dar. Eine gefürchtete Komplikation der Infektion auf einer Intensivstation ist eine schwere Sepsis und ihre maximale Manifestation, septischer Schock (1). Dabei gilt die schwere Sepsis zumindest teilweise als eine maladaptive Zytokinfreisetzung von Wirtsimmunzellen im Rahmen einer Reaktion auf eine Infektion. Durch die Initiierung, Steuerung und Beendigung von proinflammatorischer Aktivität während der Infektion wird beeinflusst, ob ein bestimmter Patient eine schwere oder leichte Form der Sepsis erleidet (2).

### 2.2. Angeborene Immunantwort

Auch wenn die initiale klinische Präsentation der grampositiven, gramnegativen und der Pilzsepsis häufig ähnlich ist, verläuft die Wirtsimmunantwort in Reaktion auf diese Erreger weitgehend unterschiedlich und beruht auf der angeborenen Immunität (3). Das angeborene Immunsystem ähnelt der ersten Linie der Verteidigung im Erkennen der mikrobiellen Strukturen (4). Das zuverlässige Erkennen von Erregerkomponenten basiert auf den sogenannten pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) von pattern recognition receptors (PRR), die den Host über das Vorliegen einer Infektion warnen (5).

### 2.3. Rolle der Toll-like Rezeptoren

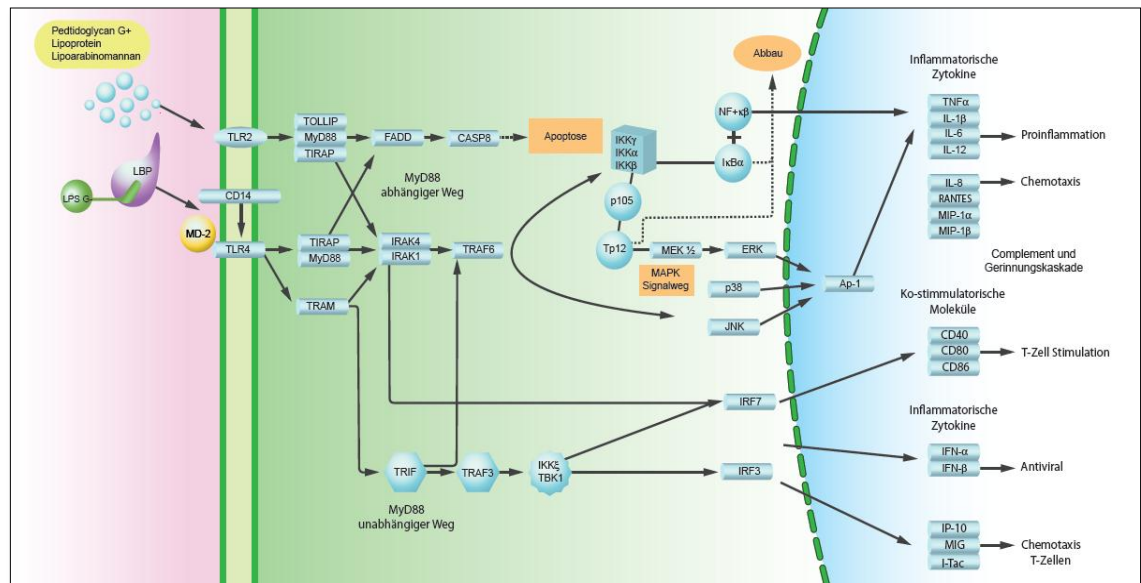
Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR) ist die am besten charakterisierte Klasse von PRRs bei Säugetierarten. Bei den Menschen sind mindestens 10 TLRs identifiziert worden, die für die Erkennung von mehreren PAMPs verantwortlich sind (6). Der TLR2, der ursprünglich von Yang et al. als Rezeptor für Lipopolysaccharid-vermittelte zelluläre Signalwege erkannt wurde (7), gilt jetzt als Rezeptor für bakterielle Lipoproteine und Lipoteichonsäuren. Im Gegensatz dazu wird der TLR4 als der ultimative Rezeptor für Lipopolysaccharid (Endotoxin) von gramnegativen Organismen bezeichnet (5).



Zur Rolle der TLRs gehört es, eine Kette von zytoplasmatischen Protein-Protein-Interaktionen zu initiieren, die zur Freisetzung von nukleären Transkriptionsfaktoren (NF $\kappa$ B) für die Förderung der proinflammatorischen Zytokinsekretion führen (s. Abbildung 1)

**Abbildung 1.**

**Schematische Darstellung der inflammatorischen TLR2- und TLR4- Kaskade**



[adaptiert von KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes© Kanehisa Laboratories (8) und (3)]

Unterschiedliche Manifestation der Infektion bei kritisch kranken Patienten legt nahe, dass die Wirtsgenetik die Schwere der Sepsis beeinflusst. Genetische Veranlagung wird als eine der grundlegenden Theorien in der Sepsisforschung akzeptiert. Sie bietet einen Schlüssel zum besseren Verständnis der Pathogenese der Infektion und ist ein Teil des sogenannten PIRO-Konzepts (9). Unterschiedliche Expression und Funktion von TLRs beeinflussen das Ausmaß der angeborenen Immunantwort und damit die Schwere der Sepsis bei Patienten mit Infektionskrankheiten (2).

Inzwischen wurden verschiedene genetische Polymorphismen von TLRs, meist sogenannte Single Nukleotid Polymorphismen identifiziert. Dies sind häufige Varianten innerhalb einer Population, die mit einer Häufigkeit von mehr als 1% gefunden werden (4).

### **2.4. Studienlage**

Lorenz et al. untersuchten Asp299Gly und Thr399Ile Polymorphismen in den menschlichen TLR4-Genen und fanden eine erhöhte Anfälligkeit für gramnegative Infektionen in einer kleinen Patientengruppe (insgesamt 11 Patienten) mit der Asp299Gly Mutation (6). Nakada et al. beabsichtigten das klinische Outcome von japanischen kritisch kranken Patienten mit TLR4-Polymorphismen zu bewerten. Allerdings wurden keine japanischen Teilnehmer mit TLR4 Asp299Gly oder Thr399Ile Polymorphismus gefunden (10). In einer großen Fall-Kontroll-Studie untersuchten Moore et al. den Zusammenhang zwischen Mikrosatelliten mit GT-Repeats im TLR2-Gen bei Arg753Gln Single Nukleotid Polymorphismus und dem Auftreten von schweren Staphylococcus aureus Infektionen. Es fanden sich keine Assoziationen mit der Erkrankung und Mortalität (11). Einige Befunde aus Tierstudien deuten jedoch darauf hin, dass die TLR4-Funktion eine TLR2-Expression induziert und umgekehrt, sodass eine enge Interaktion zwischen diesen Rezeptoren postuliert wird (12, 13).

### **2.5. Haupthypothese und Ziele der Studie**

Die Haupthypothese dieser Studie lautete, dass es einen Unterschied in der Schwere und dem Verlauf der Sepsis bei kritisch kranken Patienten mit einem SNP Arg753Gln des TLR2-Gens oder einem SNP Asp299Gly des TLR4-Gens im Vergleich zur Kontrollgruppe gibt.

### 3. PATIENTEN UND METHODEN

#### 3.1. Studienbeschreibung und Erhebungszeitraum

Die Daten für diese prospektive, kontrollierte, nicht-interventionelle klinische Beobachtungsstudie wurden an der Charité-Universitätsmedizin Berlin ermittelt. Die Datenerhebung fand während definierter Zeiträume von 3 Monaten beginnend im August 2006 statt. Nach dem jeweiligen Dreimonatsabschnitt folgte eine dreimonatige Pause. Während dieser Zeit wurden die Daten von den zuständigen Studienärzten validiert und auf Konsistenz überprüft. Der Erhebungszeitraum wurde nach einem Jahr um ein weiteres Jahr bis Dezember 2008 ausgedehnt, um den Einschluss einer größeren Stichprobe von Patienten zu ermöglichen.

#### 3.2. Ethikvotum und Datenschutzvotum

Diese Studie wurde der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin vorgelegt und genehmigt (EA 1/117/06). Des Weiteren wurde ein positives Datenschutzvotum erteilt. Die Studie wurde im Deutschen Register der klinischen Studien unter der Nummer: DRKS00003171 registriert.

#### 3.3. Studienlokalisierung

Die Studie fand am Campus Charité Mitte und Campus Virchow - Klinikum statt. Die Charité ist ein Universitätsklinikum der Maximalversorgung in Berlin, Deutschland und verfügt über 3200 Betten sowohl für die Akutversorgung als auch für tertiäre medizinische Behandlung. Drei Intensivstationen unter anästhesiologischer Leitung mit insgesamt 61 Betten waren an der Studie beteiligt. Die Stationen 101i und 103i auf dem Campus Charité Mitte mit 22 Intensivbetten behandeln Patienten mit kardiochirurgischem und allgemein postoperativem Schwerpunkt. Am Campus Virchow-Klinikum werden auf der Station K1 mit 15 Bettplätzen Patienten mit neurologischen und neurochirurgischen Erkrankungen versorgt. Die Stationen 8i und 14i bieten 24 Intensivbetten für allgemein- und unfallchirurgische Patienten inklusive Polytraumaversorgung sowie Hals-Nasen-Ohren-ärztlich versorgte Patienten. Die Station 8i ist zudem ein überregionales Referenzzentrum für Patienten mit Atemnot-Syndrom des Erwachsenen (ARDS).

### **3.4. Patienten**

Auf den oben genannten Intensivstationen werden nicht nur postoperative sondern auch Patienten mit medizinischen oder neurologischen Erkrankungen behandelt.

Die Patienten wurden der Studie nach vorangehender intensivmedizinischer Behandlung von mehr als 36 Stunden zugewiesen. Vor dem Einschluss in die Studie mussten alle Patienten beziehungsweise ihre gesetzliche Vertreter eine Einverständniserklärung unterzeichnen.

### **3.5. Ein- und Ausschlusskriterien**

Patienten beiderlei Geschlechts wurden in die Studie eingeschlossen. Das minimale Alter beim Einschluss wurde auf 18 Jahre festgelegt. Ein Altersmaximum gab es hingegen nicht. Des Weiteren mussten die Patienten länger als 36 Stunden der intensivmedizinischen Behandlung bedürfen.

Ausgeschlossen blieben schwangere Patientinnen.

### **3.6. Datenerfassung**

Die Daten der in Frage kommenden Patienten wurden in täglichen Visiten aus den Papierkrankenakten, dem zentralen Krankenhaus Informationssystem und dem Patienten Daten-Management-System (COPRA System GmbH, Sasbachwalden, Deutschland) erhoben. Die Daten wurden täglich für die letzten 24 Stunden erfasst. Die Studiendatenbank wurde unter Microsoft® Access® programmiert (Microsoft Corporation, Redmond, USA). In die Studiendatenbank wurden Aufzeichnungen der Vitalfunktionen, Laborbefunde, mikrobiologischen und radiologischen Diagnostik, Antiinfektiva, vasopressive Medikamente und Immunsuppressiva, Daten zur Beatmung, des pulmonalen Gasaustausches, sowie die Menge der Urinausscheidung und Daten zum Flüssigkeitshaushalt eingetragen. Die Daten zur Immunsuppression, Alkohol-, Drogen- oder Nikotingebrauch wurden den Patientenakten entnommen.

Als Immunsupprimierte galten die Patienten mit einer Behandlung mit Immunsuppressiva und diejenigen mit einer Leukämie, nach einer Chemotherapie oder mit einer HIV Infektion. Patienten mit einer Kortikosteroid - Behandlung mit einer Dosis oberhalb der Cushingschwelle, was einem Prednisolonäquivalent von 7,5 mg entspricht, zählten ebenfalls als immunsupprimiert. Zu den

immunsuppressiven Substanzen, die während der Studie in Gebrauch waren für Transplantierte mit soliden Organen (z.B. Leber oder Niere), zählten Tacrolimus (Prograf, Astellas Pharma, Deerfield, USA) und Mycophenolat Mofetil (CellCept, Roche, Nutley, USA).

### **3.7. Genotypisierung der Toll-like Rezeptoren 2 und 4**

#### **3.7.1. Blutabnahme**

Zwei Milliliter Vollblut der in die Studie eingeschlossenen Patienten, wurde in einem EDTA-Röhrchen (BD Vacutainer®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) abgenommen, bei Raumtemperatur gelagert und einmal pro Woche ins Zentrallabor am Charité Campus Virchow-Klinikum transportiert.

#### **3.7.2. DNA-Extraktion und Reinigung**

Genomische DNA wurde aus peripherem venösem Blut mit einem DNA-Aufreinigungs-kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gemäß dem Protokoll des Herstellers extrahiert und bei -20 °C konserviert.

#### **3.7.3. Genotypisierung der R753Q und D299G Polymorphismen**

Genotypisierung für den Polymorphismus R753Q des Toll-like Receptor 2-Gens und den Polymorphismus D299G des Toll-like Receptor 4-Gens wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in einem Biometra Trio-Block-Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die PCR-Reaktion wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt, mit einer Konzentration von 1 µM des jeweiligen Sense- und Anti-Sense-Primers, 0,2 mM von jedem dNTP, 1 U AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, USA) und 35 ng genomischer DNA in 1x AmpliTaq Gold® PCR-Puffer. Für den Toll-like Receptor 2-Gen Polymorphismus wurden die Primer 753TLR2F, 5'-TTGACTCCATTGAAAAGAGC-3' und 753TLR2R, 5'-TAAATATGGGAACCTAGGAC-3' eingesetzt. Für den Toll-like Receptor 4-Gen Polymorphismus wurden die Primer 299TLR4F, 5'-GGCTTCATAAGCTGACTTT-3' und 299TLR4R, 5'-CATCCGAAATTATAAGAAAAG-3' verwendet. Die PCR-Konditionen der beiden PCR-Reaktionen umfassten 10 min Denaturierung bei 95 °C gefolgt von 34 Zyklen á 20 s bei 95 °C, 20 s Annealingzeit bei 54 °C und 30 s Amplifikationszeit bei 72 °C. Die Reaktion wurde nach einem

einmaligen abschliessenden Inkubationsschritt von 5 Minuten bei 72 °C beendet. Die Produktgrösse waren 300 bp für den R753Q Polymorphismus und 316 bp für den D299G Polymorphismus. Nach der Amplifikation durch PCR schloss sich der Restriktionsverdau durch Endonukleasen an.

Für den R753Q Polymorphismus, wurden 10 µl der PCR-Reaktion mit 1U Pst I Restriktionsendonuklease (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) in 1x NEB Puffer 3 bei 37 °C über Nacht verdaut. Für den D299G Polymorphismus wurden 10 µl des PCR-Reaktionsgemisches mit 1U Bcc I Restriktionsendonuklease (New England Biolabs GmbH) in 1x NEB-Puffer 1 ebenso bei 37 °C über Nacht verdaut. Das endgültige Volumen der Reaktionen betrug jeweils 20 µl. Die Verdauung des PCR-Produktes des TLR 2-Amplifikates ergab eine einzelne Bande von 300 bp wenn Arginin an Position 753, sowie zwei Banden (190 und 110 bp) wenn Glutamin an Position 753 vorlag. Der Verdau des PCR-Produktes des TLR 4-Genamplifikates ergab zwei Banden (222 bzw. 94 bp) wenn Asparagin an der Position 299, sowie drei Banden (113, 109, 94 bp) wenn Glycin an Position 299 vorlag.

Im Anschluss an den Verdau wurden die Produkte auf einem 12% Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Silbernitrat angefärbt.

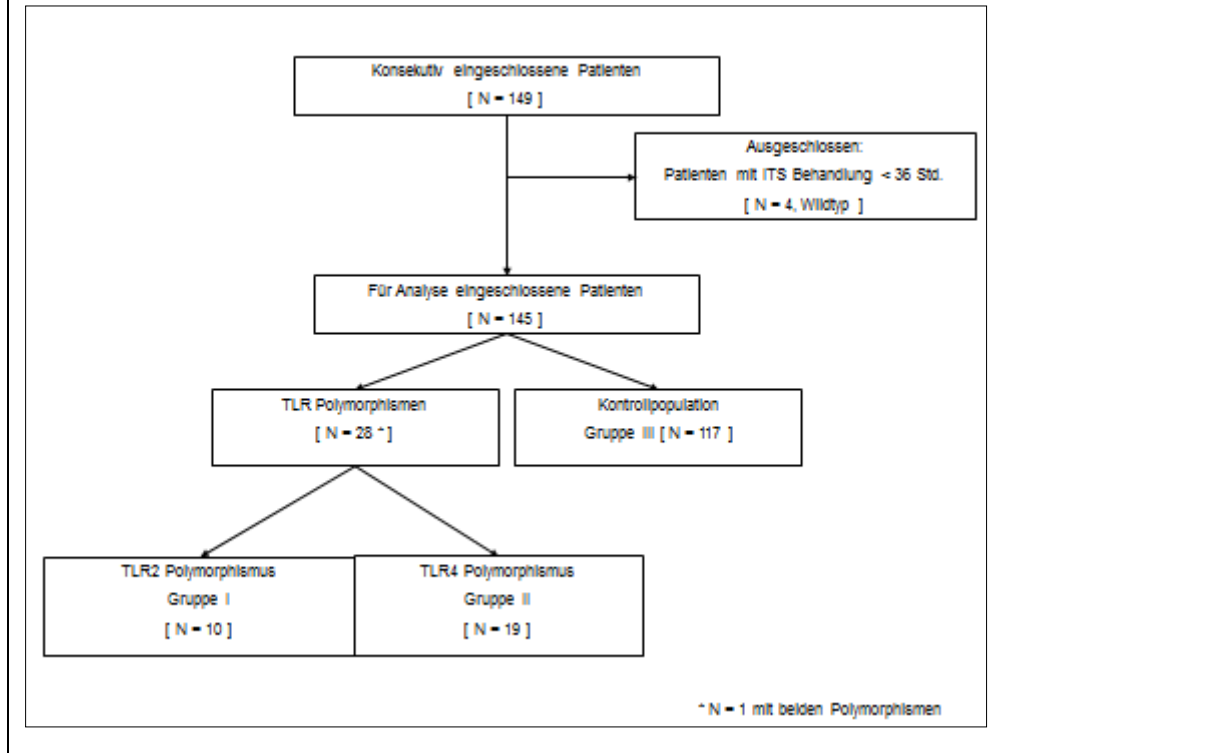
### **3.7.4. Gruppenzuordnung**

Die Genotypen wurden von unabhängigen, gegen die Phänotypen der Patienten verblindeten Labormitarbeitern zugeordnet. Nach zugeordnetem Polymorphismus wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt: Arg753Gln heterozygote Träger (Gruppe I), Asp299Gly heterozygote Träger (Gruppe II) und Wildtyp (Gruppe III). Die Patienten der Gruppe III mit Toll-like Rezeptoren vom Wildtyp stellten die Kontrollgruppe dar (s. Abbildung 2).

Ein Patient erwies sich als heterozygoter Träger von sowohl Arg753Gln als auch von Asp299Gly Single Nukleotid Polymorphismus. Daher wurde er einer separaten Analyse unterzogen, wie es speziell im Ergebnissteil beschrieben ist.

**Abbildung 2**

**Flussdiagramm der eingeschlossenen Patienten**



**3.8. Outcome-Parameter**

**3.8.1. Primärer Endpunkt**

Der Schweregrad der Sepsis, benannt *septische Komplikation* und gemessen anhand des Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (APACHE II) Score (14) als Surrogatmarker, diente als primärer Zielparameter. Unter septischer Komplikation wurden die schwere Sepsis und/oder der septische Schock subsummiert.

**3.8.2. Sekundäre Endpunkte**

Die folgenden Outcome-Parameter wurden als sekundäre Endpunkte bestimmt:

- Verlauf der septischen Komplikation
- Zeitliche Entwicklung der septischen Komplikation anhand des Sequential Organ Failure Assessment (SOFA Score) (15) und des Therapeutic Intervention Scoring System (TISS-28 Score) (16) als Surrogatparameter

- Dauer der maschinellen Beatmung
- Behandlungsdauer auf der Intensivstation
- Mortalität

Als Dauer der maschinellen Beatmung galt der Zeitraum während einer intensivstationären Behandlung, in dem eine maschinelle Beatmung über einen endotrachealen Tubus bzw. über ein Tracheostoma erforderlich war.

Die Dauer der intensivstationären Behandlung wurde als die Anzahl der Tage definiert, an denen ein Patient während eines Krankenhausaufenthaltes auf der Intensivstation behandelt wurde. Hinzu zählten die Wiederaufnahmen von Normalstationen, jedoch nicht die Wiederaufnahmen auf eine Intensivstation nach einer Entlassung aus dem Krankenhaus.

### **3.9. Definition der Infektionen, Sepsis und schwer zu behandelnder Erreger**

Infektionen wurden nach den Kriterien des US Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA) (17) definiert.

Die klinischen Bezeichnungen eines SIRS, einer Sepsis, schwerer Sepsis und septischen Schocks wurden nach den American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) Konsensuskriterien (18) und entsprechend den Richtlinien der Surviving Sepsis Campaign (19) und der Leitlinie der Deutschen Sepsis Gesellschaft (20) klassifiziert [s. Tabelle 1].

#### **Tabelle 1 – Kriterien für schwere Sepsis und septischen Schock** adaptiert nach (20)

**I: Sepsis:** Vermutete oder gesicherte Infektion plus mindestens 2 der folgenden Zeichen für ein systemisches inflammatorisches Response – Syndrom (SIRS):

- Fieber ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) oder Hypothermie ( $\leq 36^{\circ}\text{C}$ )
- Tachykardie: Herzfrequenz  $\geq 90/\text{min}$
- Tachypnoe (Frequenz  $\geq 20/\text{min}$ ) oder Hyperventilation ( $\text{PaCO}_2 \leq 33\text{mmHg}$ )
- Leukozytose ( $\geq 12000/\text{mm}^3$ ) oder Leukopenie ( $\leq 4000/\text{mm}^3$ )

**II. Schwere Sepsis:** Sepsis plus eines der folgenden Zeichen für Organdysfunktion

- absolute Thrombozytopenie von  $< 100/\text{nl}$
- arterielle Hypoxämie:  $\text{PaO}_2 \leq 75 \text{ mmHg}$  unter Raumluft oder ein  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von  $\leq 250 \text{ mmHg}$  unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.
- renale Dysfunktion: Diurese von  $\leq 840 \text{ ml}/24\text{h}$  oder Anstieg des Serumkreatinins  $\geq 2,4$



mg/dl (Männer) bzw.  $\geq 2,0$  mg/dl (Frauen)

- metabolische Azidose: Base Excess  $\leq -5$  mmol/l oder eine Laktatkonzentration  $\geq 27$  mg/dl .
- akute Enzephalopathie mit einem GCS  $< 10$  Punkte

**III. Septischer Schock:** Sepsis plus eines der folgenden Zeichen für eine Hypotension, ohne dass gleichzeitig eine Hypovolämie vorlag

- systolischer arterieller Blutdruck von  $\leq 90$  mmHg oder mittlerer arterieller Druck von  $\leq 65$  mmHg
- notwendiger Einsatz eines Katecholamins bzw. Vasopressin, um einen mittleren arteriellen Druck von 65 mmHg aufrecht zu erhalten

Die schwer zu behandelnden Krankheitserreger waren als solche definiert, die gemäß der lokalen Resistenzstatistik Träger einer potentiellen intrinsischen oder erworbenen Resistenz waren, z.B. Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* [MRSA], Extended-spectrum Beta-Lactamase- bildende Bakterien [ESBL], Vancomycin-resistenter *S. aureus*, Nonfermenter wie *Pseudomonas* Spezies, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter* Spezies, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium* und *Bacillus cereus*.

### 3.10. Statistik

Die Daten werden wie folgt dargestellt: qualitative Daten als absolute Werte und Proportionen [n,%], kontinuierliche Daten als arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung [Mittelwert  $\pm$  SD] oder Median und 25% - 75% Quartile [25 | 75], letzteres für kategoriale und nicht-normalverteilte kontinuierliche Variablen.

Zu statistischen Signifikanzprüfungen zwischen den Gruppen dienten bei fehlender Normalverteilung, kleinen sowie unterschiedlichen Stichprobenumfängen nicht-parametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests sowie für binäre Größen exakte Chi-Quadrat-Tests. Die zeitliche Analyse des Auftretens einer schweren Komplikation wurde mittels Kaplan-Meier-Analysen dargestellt und univariat mit Hilfe der Log-Rank-Statistik verglichen. Zur Ergebnisvalidierung wurde mittels Cox-Regression eine multivariate Zeitanalyse durchgeführt. Als Kofaktoren dienten Faktoren, deren Verteilung in den Basischarakteristika der Gruppen unterschiedlich war bzw. relevante Einflussgrößen für den Verlauf von Infektionen darstellten (Alter, Geschlecht und Stoffwechselerkrankungen).

Der klinische Verlauf von Erkrankungsschwere - mit Scoring-Systemen als Surrogatparameter - wurde unter Verwendung einer nicht-parametrischen longitudinalen Datenanalyse in einem zwei-faktoriellen Design (1. Faktor: Gruppe, 2. Faktor: Zeit) analysiert. Zunächst wurden alle aufeinander folgenden Tage nach ITS Aufnahme bis Tag acht verglichen, um mindestens 50% der spezifischen Studienpopulation mit Scores einzubeziehen. Danach wurde der Anfangstag einer diagnostizierten Infektion eines Patienten als Ausgangspunkt genommen. Zum Vergleich der Scores-Entwicklung während einer Infektion wurden die nachfolgenden ITS Tage nach der gleichen Methodik analysiert. Dies führte zu longitudinalen Datenanalysen von fünf aufeinander folgenden ITS Tagen ab Beginn der Infektion. In allen statistischen Tests wurde ein zweiseitiger p-Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant gewertet. Vor dem Hintergrund einer Beobachtungsstudie stellten alle Tests eine explorative Datenanalyse dar, so dass keine Anpassungen für multiples Testen vorgenommen wurden.

Alle Berechnungen wurden mit PASW, Version 18 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) und SAS Version 9.1 (SAS Institute Inc. 2003, Cary, USA) durchgeführt.

### 4. ERGEBNISSE

#### 4.1. Eingeschlossene Patienten

Insgesamt wurden 145 Patienten in diese Studie eingeschlossen. 10 Patienten wurden als heterozygote Träger der Arg753Gln (TLR2-Gruppe) und 19 Patienten als heterozygote Träger der Asp299Gly (TLR4-Gruppe) Single Nukleotid Polymorphismen identifiziert. Ein Patient trug beide heterozygote Allele der genannten Polymorphismen und wurde wie speziell angegeben jeweils in der TLR2- und der TLR4-Gruppe analysiert. 117 Patienten wurden dem Wildtyp hinsichtlich des jeweiligen SNP zugeordnet und dienten als Kontrollgruppe (s. Abbildung 2).

#### 4.2. Basischarakteristika

Die Basischarakteristika sind in der Tabelle 2 dargestellt. Neben dem häufigeren Auftreten von Diabetes mellitus [TLR2-Gruppe 90% (N = 9) vs. Wildtyp 34,2% (N = 40),  $p = 0,001$ ] unterschieden sich die Patienten nur geringfügig in ihren demografischen Merkmalen. Das weibliche Geschlecht wurde in 26,3% (N = 5) der TLR4-Gruppe, verglichen mit 51,3% (N = 60) in der Kontrollgruppe ( $p = 0,05$ ) gefunden. Tabelle 3 gibt eine Übersicht der chirurgischen Eingriffe innerhalb der Studienpopulation wieder.

**Tabelle 2 – Basischarakteristika**

Parameter*	Gesamte Studienpopulation N=145				
	TLR2 N=10	TLR4 N=19	Wildtyp N=117	p-Wert TLR2 vs. Wildtyp	p-Wert TLR4 vs. Wildtyp
Alter in Jahren <sup>†</sup>	63 [58   67]	63 [47   72]	60 [44   69]	0.241	0.673
Weibliches Geschlecht	4 (40%)	5 (26.3%)	60 (51.3%)	0.530	0.050
Gefäßkrankungen	4 (40%)	5 (26.3%)	32 (27.4 %)	0.468	1.000
Arterielle Hypertonie	3 (30%)	6 (31.6%)	47 (40.2%)	0.739	0.614
Immunsuppression	1 (10%)	1 (5.3%)	9 (7.7%)	0.573	1.000
Chronische Lungenerkrankungen	2 (20%)	5 (26.3%)	13 (11.1%)	0.335	0.135
Chronische Lebererkrankungen	3 (30%)	4 (21.1%)	14 (12%)	0.132	0.281
Chronische Nierenerkrankungen	4 (40%)	4 (21.1%)	20 (17.1%)	0.094	0.746
Diabetes mellitus	<b>9 (90%)</b>	6 (31.6%)	40 (34.2%)	<b>0.001</b>	1.000
Psychiatrische Erkrankungen	1 (10%)	5 (26.3%)	15 (12.8%)	1.000	0.158
Schädlicher Nikotingebrauch	2 (20%)	3 (15.8%)	12 (10.3%)	0.303	0.441
Schädlicher Alkoholgebrauch	2 (20%)	5 (26.3%)	15 (12.8%)	0.623	0.158
Schädlicher Drogengebrauch	0	1 (5.3%)	7 (6%)	1.000	1.000

\*Daten sind als absolute Werte oder Proportionen dargestellt (%), wenn nicht anders vermerkt; <sup>†</sup>Daten sind als Median und 25% - 75% Quartile [25|75] dargestellt

In der TLR4-Gruppe fanden sich häufiger infektiöse Ursachen, die zur Aufnahme auf die Intensivstation führten als in der Kontrollgruppe [TLR4-Gruppe 47,4% (N = 9) vs. Wildtyp 13,7% (N = 16), p = 0,002]. Im Gegensatz zu der Kontrollgruppe fanden sich in der TLR4-Gruppe keine Patienten mit Polytrauma [TLR4-Gruppe N = 0 vs. Wildtyp 20,5% (N = 24), p = 0,025]. Die Aufnahmekategorien sind in der Tabelle 4 dargestellt. Die Erkrankungsschwere bei der ITS-Aufnahme gemessen anhand der intensivmedizinischen Scores war in allen Gruppen gleichmäßig verteilt, lediglich der Acute Physiology And Chronic Health Evaluation Score (APACHE II) war höher in der TLR4-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (TLR4-Gruppe 22,1 ± 10 vs. Wildtyp 16,6

## ERGEBNISSE

± 7,8; p = 0,008). Die Verteilung der Aufnahmescores ist in der Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 3 – Aufteilung der Patienten nach chirurgischen Kategorien**

Parameter*	Gesamte Studienpopulation N=145				
	TLR2 N=10	TLR4 N=19	Wildtyp N=117	p-Wert TLR2 vs. Wildtyp	p-Wert TLR4 vs. Wildtyp
<b>Chirurgische Patienten</b>	9 (90%)	13 (68.4%)	97 (82.9%)	1.000	0.203
<b>Neurochirurgisch</b>	1 (10%)	5 (26.3%)	19 (16.2%)	1.000	0.330
<b>Muskuloskeletal</b>	2 (20%)	3 (15.8%)	23 (19.7%)	1.000	1.000
<b>Herz- und Gefäßchirurgisch</b>	1 (10%)	1 (5.3%)	14 (12%)	1.000	0.694
<b>Abdominell und Urogenital</b>	5 (50%)	4 (21.1%)	35 (29.9%)	0.285	0.587
<b>Thoraxchirurgisch</b>	0	1 (5.3%)	6 (5.1%)	1.000	1.000
<b>Weichteile</b>	0	0	2 (1.7%)	1.000	1,000

*\*Daten sind als absolute Werte oder Proportionen dargestellt (%)*

**Tabelle 4 – Aufnahmekategorie auf Intensivstation**

Parameter*	Gesamte Studienpopulation N=145				
	TLR2 N=10	TLR4 N=19	Wildtyp N=117	p-Wert TLR2 vs. Wildtyp	p-Wert TLR4 vs. Wildtyp
<b>Infektion</b>	3 (30%)	<b>9 (47.4%)</b>	16 (13.7%)	0.172	<b>0.002</b>
<b>Maligne Grunderkrankung</b>	2 (20%)	3 (15.8%)	18 (15.4%)	0.657	1.000
<b>Neurologisch</b>	0	0	6 (5.1%)	1.000	0.595
<b>Kardiovaskulär</b>	1 (10%)	1 (5.3%)	15 (12.8%)	1.000	0.699
<b>Respiratorisch</b>	1 (10%)	0	12 (10.3%)	1.000	0.216
<b>Gastrointestinal</b>	1 (10%)	2 (10.5%)	11 (9.4%)	1.000	1.000
<b>Polytrauma</b>	1 (10%)	<b>0</b>	24 (20.5%)	0.685	<b>0.025</b>
<b>Andere</b>	1 (10%)	4 (21.1%)	15 (12.8%)	1.000	0.306

\*Daten sind als absolute Werte oder Proportionen dargestellt (%)

**Tabelle 5 – Intensivstationäre Aufnahmescores**

Parameter*	Gesamte Studienpopulation N=145				
	TLR2 N=10	TLR4 N=19	Wildtyp N=117	p-Wert TLR2 vs. Wildtyp	p-Wert TLR4 vs. Wildtyp
<b>APACHE-II</b>	21 ± 10	<b>22 ± 10</b>	17 ± 8	0.104	<b>0.008</b>
<b>SAPS-II</b>	42 ± 19	42 ± 21	34 ± 16	0.127	0.055
<b>SOFA</b>	6 ± 2	7 ± 5	6 ± 6	0.646	0.249
<b>TISS-28</b>	36 ± 9	37 ± 13	34 ± 11	0.539	0.175

\*Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt

### 4.3. Verteilung der Infektionen

Die Infektionen waren in allen Gruppen gleichmäßig verteilt. Die Anzahl der Infektionen pro Patient bezogen auf die intensivstationäre Behandlungsdauer unterschied sich nicht signifikant zwischen der TLR4- und Kontrollgruppe. Auf der anderen Seite wurden mehr Infektionen pro Patient in der TLR2- im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (TLR2-Gruppe  $2,2 \pm 1,3$  vs. Wildtyp  $1,3 \pm 1,1$ ;  $p = 0,012$ ). Die TLR2-Gruppe zeigte ebenfalls eine höhere Inzidenz von schwer zu behandelnden Erregern im Vergleich zu den Kontrollen (TLR2-Gruppe 70% (N = 7) vs. Wildtyp 35,9% (N = 42),  $p = 0,045$ ), [s. Tabelle 6].

**Tabelle 6 – Zusammenfassung der infektiologischen Ergebnisse**

Parameter*	Gesamte Studienpopulation N=145				
	TLR2 N=10	TLR4 N=19	Wildtyp N=117	p-Wert TLR2 vs. Wildtyp	p-Wert TLR4 vs. Wildtyp
Anzahl der Patienten mit Infektionen	10 (100%)	15 (78.9%)	89 (76.1%)	0.116	1.000
Anzahl der Infektionen/ Patient <sup>†</sup>	<b>2.20 ± 1.31</b>	1.79 ± 1.72	1.29 ± 1.06	<b>0.012</b>	0.233
Pneumonie	6 (60%)	7 (36.8%)	42 (35.9%)	0.176	1.000
Harnwegsinfektionen	2 (20%)	3 (15.8%)	20 (17.1%)	0.684	1.000
Knochen- und Gelenkinfektionen	<b>1 (10%)</b>	<b>1 (5.3%)</b>	<b>11 (9.4%)</b>	<b>1.000</b>	<b>1.000</b>
Endokarditis	0	<b>2 (10.5%)</b>	0	-	<b>0.019</b>
Abdominelle Infektionen	3 (30%)	3 (15.8%)	23 (19.7%)	0.426	1.000
Wund- und Weichteilinfektionen	5 (50%)	6 (31.6%)	35 (29.9%)	0.285	1.000
Meningitis	0	3 (15.8%)	4 (3.4%)	1.000	0.057
Katheterinfektionen	2 (20%)	1 (5.3%)	5 (4.3%)	0.095	1.000
Fieber unklaren Ursprungs (FUO)	0	<b>3 (15.8%)</b>	1 (0.9%)	1.000	<b>0.009</b>
Bakteriämie	3 (30%)	<b>5 (26.3%)</b>	10 (8.5%)	0.066	<b>0.038</b>

## ERGEBNISSE

<b>Pilznachweis</b>	6 (60%)	10 (52.6%)	47 (40.2%)	0.318	0.327
<b>Nachweis von gram-neg. Erregern</b>	7 (70%)	9 (47.4%)	59 (50.4%)	0.328	1.000
<b>Nachweis schwer zu behandelnder Erreger</b>	<b>7 (70%)</b>	6 (31.6%)	42 (35.9%)	<b>0.045</b>	0.8

*\*Daten sind als absolute Werte oder Proportionen dargestellt (%), wenn nicht anders vermerkt; †Daten sind als Median und 25% - 75% Quartile [25|75] dargestellt*

### 4.4. Das Auftreten von Sepsis und die Erkrankungsschwere

#### 4.4.1. Häufigkeit der Sepsissyndrome

Alle Patienten in der TLR2-Gruppe entwickelten eine Sepsis während ihrer Behandlung auf der Intensivstation. In der Kontrollgruppe waren es 64,1% (N = 75) (TLR2 vs. Wildtyp, p = 0,03). Im Vergleich dazu waren es in der TLR4-Gruppe 73,7% (N = 14) (TLR4 vs. Wildtyp, p = 0,6). In beiden TLR-Gruppen trat das Fortschreiten der Sepsis zum septischen Schock häufiger auf als in der Kontrollgruppe (23.9%, N=28), welches mehr als 50% in der TLR4- (N = 10, p = 0,014), jedoch lediglich nur 40% in der TLR2-Gruppe betraf (N = 4, p = 0,27), [s. Tabelle 7].

**Tabelle 7 – Auftreten von Sepsissyndrome**

Parameter*	Gesamte Studienpopulation N=145				
	TLR2 N=10	TLR4 N=19	Wildtyp N=117	p-Wert TLR2 vs. Wildtyp	p-Wert TLR4 vs. Wildtyp
<b>Auftreten von Sepsis</b>	<b>10 (100%)</b>	14 (73.7%)	75 (64.1%)	<b>0.030</b>	0.604
<b>Schwere Sepsis</b>	6 (60.0%)	<b>12 (63.2%)</b>	38 (32.5%)	0.094	<b>0.019</b>
<b>Septischer Shock</b>	4 (40%)	<b>10 (52.6%)</b>	28 (23.9%)	0.270	<b>0.014</b>

*\*Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt*



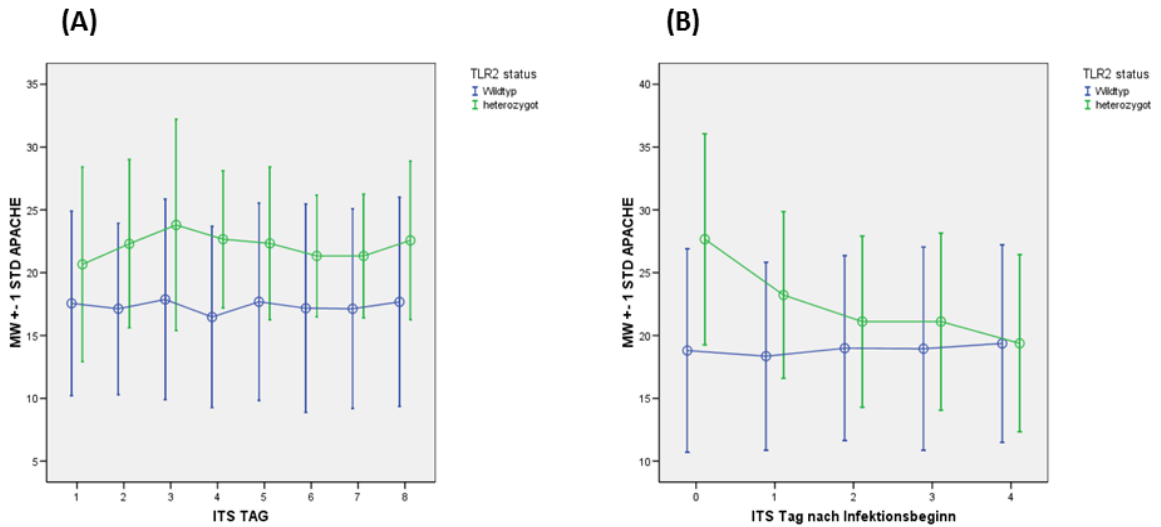
### **4.4.2. Analyse der Erkrankungsschwere**

Die Analyse der Entwicklung der APACHE II-Scores während der ersten 8 Tage auf der Intensivstation zeigte stets höhere Basiswerte in der TLR2- als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ). Jedoch unter Berücksichtigung der vier aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Auftreten einer Infektion erreichte der APACHE II-Score in diesen beiden Gruppen den gleichen Ausgangswert ( $p = 0,1$ ), [s. Abbildung 3 A und B].

Im Gegensatz dazu zeigte der APACHE II-Score in der TLR4-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe höhere Basiswerte, die auch weiterhin bis zum Tag 8 anstiegen ( $p = 0,024$ ). Nach dem Auftreten einer Infektion war der weitere Anstieg der Scores in dieser Gruppe bis Tag 4 zu verzeichnen, ( $p = 0,012$ ), [s. Abbildung 4 A und B].

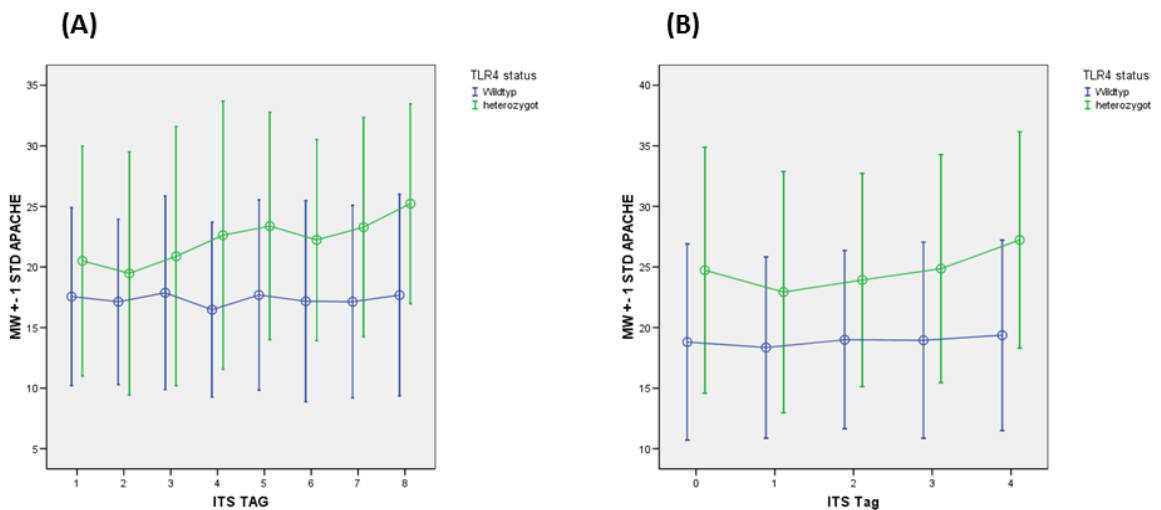
**Abbildung 3 A/B**

Progression des APACHE II Score in der TLR2 Gruppe während der intensivstationären Behandlung (**A**,  $p < 0,001$ ) und nach Infektionsbeginn (**B**,  $p = 0,1$ )



**Abbildung 4 A/B**

Progression des APACHE II Score in der TLR4 Gruppe während der intensivstationären Behandlung (**A**,  $p = 0,024$ ) und nach Infektionsbeginn (**B**,  $p = 0,012$ )



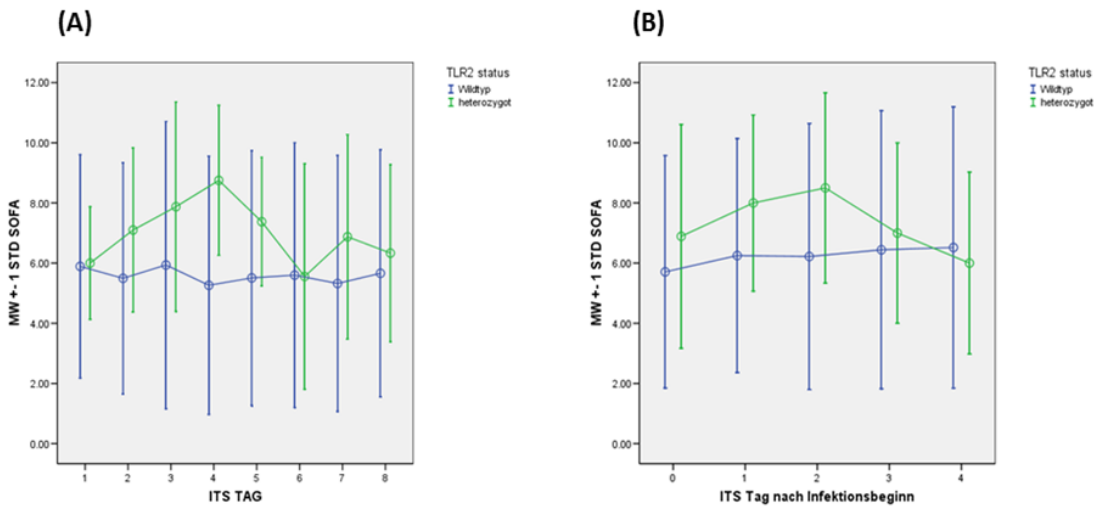
Die Betrachtung der Entwicklung der SOFA Scores in der TLR2-Gruppe verdeutlicht eine initiale Progression der Erkrankungsschwere mit Abfall zwischen dem 4. und 6. ITS Tag. Dem gegenüber zeigt die Kontrollgruppe weiterhin eine nahezu konstante Erkrankungsschwere ( $p = 0.006$ ). Die basal höheren SOFA Score-Werte in der TLR2-Gruppe setzen sich nach dem Infektionsbeginn fort, klingen jedoch nach 4 Tagen auf das Ausgangsniveau ab ( $p = 0.156$ ) (s. Abbildung 5 A und B).

Dagegen ist in der TLR4-Gruppe sowohl zu Beginn der ITS Behandlung ( $p = 0.010$ ) als auch post infectionem eine kontinuierliche Progression der Erkrankungsschwere bzw. der SOFA Scores zu verzeichnen ( $p < 0.001$ ) (s. Abbildung 6 A und B).

Abbildungen 7 und 8 illustrieren den Verlauf der TISS Scores in der TLR2- bzw. TLR4-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe. Auch hier kommen initial höhere TISS-Werte in der TLR2-Gruppe zum Vorschein ( $p = 0.044$ ), die dann eine abklingende Tendenz erfahren ( $p = 0.47$ ). Die TLR4-Gruppe zeichnet sich durch die höhere Erkrankungsschwere zu Beginn der ITS Behandlung und durch einen Trend zur weiteren Progression des TISS Score bis zum Tag 8 ( $p = 0.056$ ). Nach Infektionsbeginn wird ein signifikanter Anstieg bis zum Tag 4 manifest ( $p = 0.025$ ). Die Kontrollgruppe zeigt auch hier eine niedrige und konstant verlaufende Erkrankungsschwere.

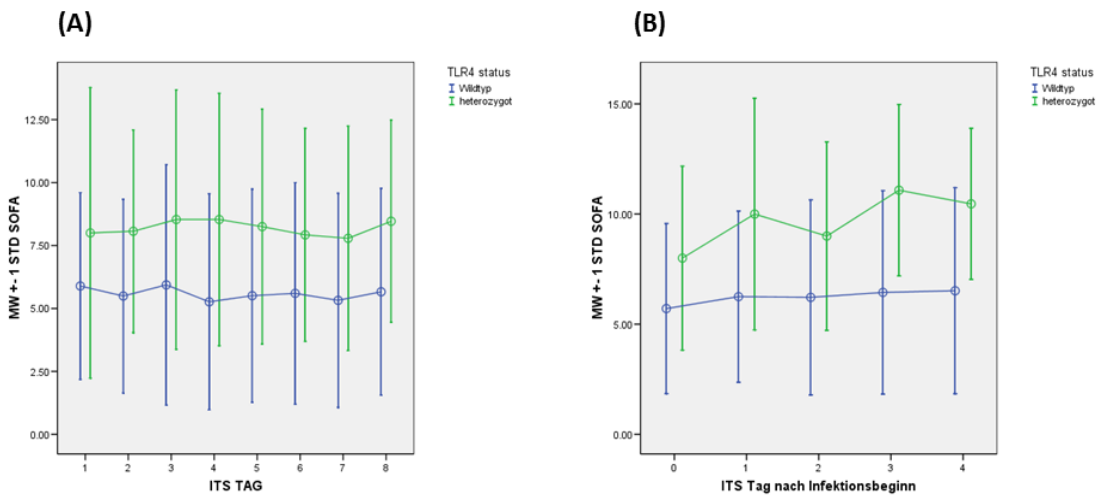
**Abbildung 5 A/B**

Progression des SOFA Score in der TLR2 Gruppe während der intensivstationären Behandlung (**A**,  $p = 0.006$ ) und nach Infektionsbeginn (**B**,  $p = 0.156$ )



**Abbildung 6 A/B**

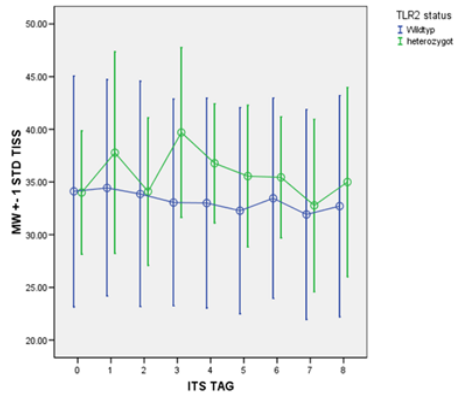
Progression des SOFA Score in der TLR4 Gruppe während der intensivstationären Behandlung (**A**,  $p = 0.010$ ) und nach Infektionsbeginn (**B**,  $p < 0.001$ )



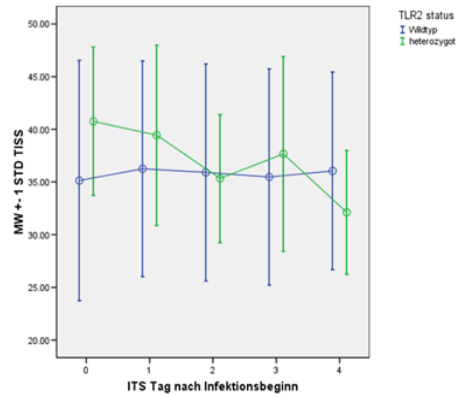
**Abbildung 7 A/B**

Progression des TISS Score in der TLR2 Gruppe während der intensivstationären Behandlung (**A**,  $p = 0.044$ ) und nach Infektionsbeginn (**B**,  $p = 0.47$ )

(A)



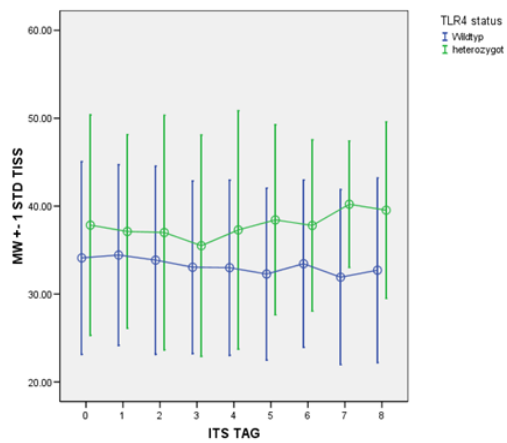
(B)



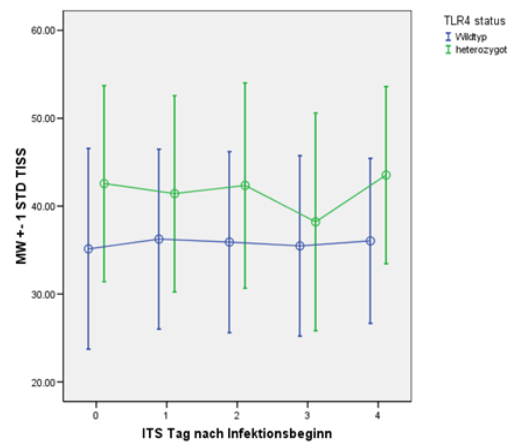
**Abbildung 8 A/B**

Progression des TISS Score in der TLR4 Gruppe während der intensivstationären Behandlung (**A**,  $p = 0.056$ ) und nach Infektionsbeginn (**B**,  $p = 0.025$ )

(A)



(B)

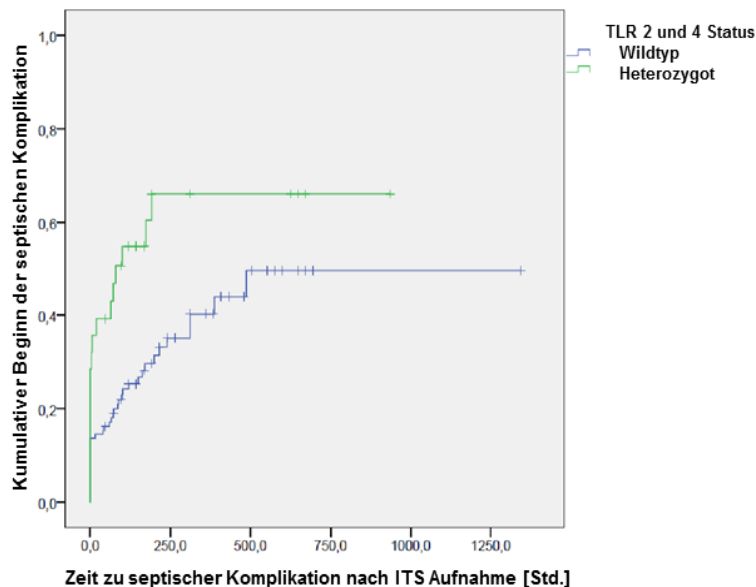


#### 4.4.3. Zeit bis zur septischen Komplikation

Um das dynamische Fortschreiten der Infektion darzustellen, wurden die Kaplan-Meier-Analysen der Zeit bis zum Auftreten einer septischen Komplikation im Sinne von einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks durchgeführt. Bei den beiden TLR-Polymorphismen Gruppen (N = 28) wurde ein kürzerer Verlauf bis zum Auftreten einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock als bei den Kontrollen (N = 117) beobachtet; (Log Rank-Test,  $p = 0,004$ ), [s. Abbildung 9].

**Abbildung 9**

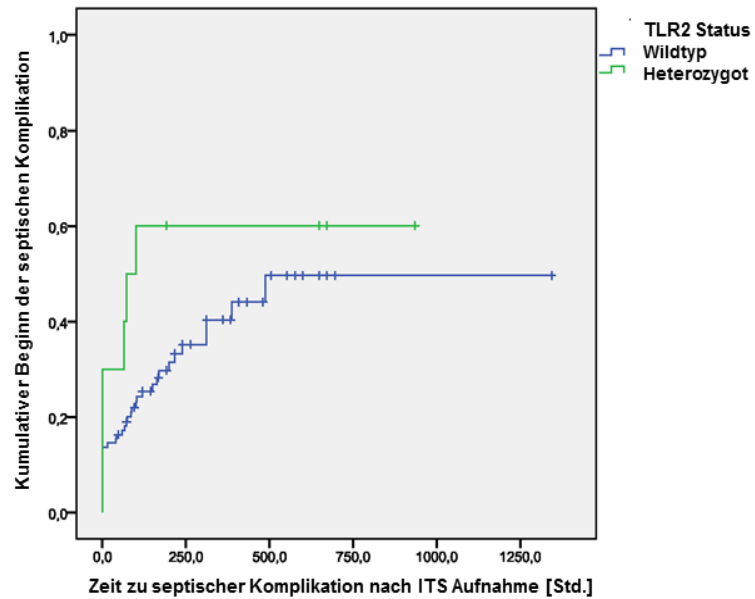
Kumulative Kaplan-Meier-Analyse für beide TLR-Gruppen (N = 28) verglichen mit der Kontrollgruppe (N = 117), [Log Rank-Test,  $p = 0,004$ ]



Anschließend wurden die Kaplan-Meier-Analysen für die jeweils einzelne TLR-Gruppe durchgeführt. Sowohl die TLR2- als auch die TLR4-Gruppe zeigten eine kürzere Zeit bis zu einer schweren Komplikation als die Kontrollen [Log Rank-Test,  $p = 0,24$ ] bzw. [Log Rank-Test,  $p = 0,003$ ], (s. Abbildung 10 und 11).

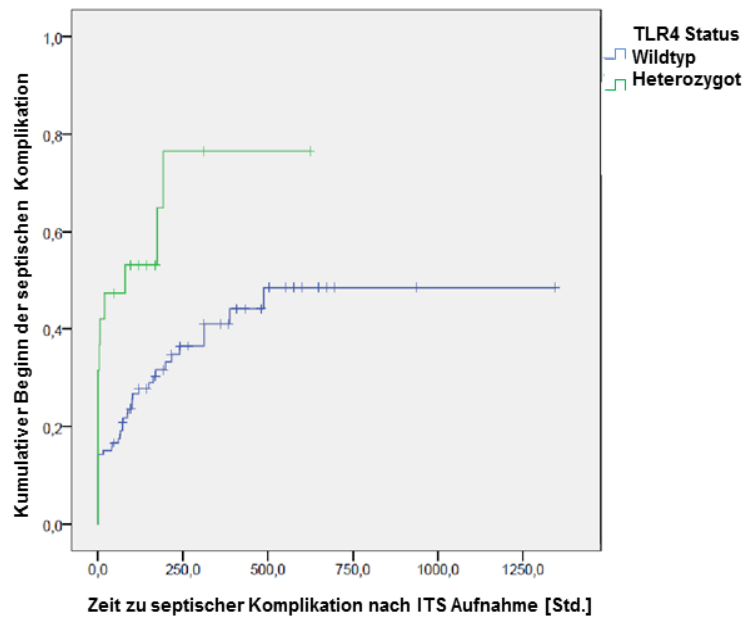
**Abbildung 10**

Kumulative Kaplan-Meier-Analyse für TLR2-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe, [Log Rank-Test,  $p = 0,24$ ]



**Abbildung 11**

Kumulative Kaplan-Meier-Analyse für TLR4-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe, [Log Rank-Test,  $p = 0,003$ ]



Wie oben erwähnt, waren bei einem Patienten beide Single Nukleotid Polymorphismen nachgewiesen. Aus diesem Grund wurden speziell die Kaplan-Meier-Analysen der TLR2-Gruppe gegenüber der TLR4-Gruppe ohne diesen einzelnen Patienten ausgeführt. Ein Einfluss auf die Ergebnisse wurde jedoch nicht beobachtet.

Darüber hinaus wurde eine Cox-Regression berechnet. Als Kovariaten für die Regressionsanalyse dienten:

- TLR-Status
- Alter
- Geschlecht
- Stoffwechselerkrankungen

Unter Erfüllung der Voraussetzungen der Cox-Regression wurden keine signifikanten zeitabhängigen Wechselwirkungen für jedweden TLR-Status ( $p = 0,130$ ) gefunden. Dies weist darauf hin, dass in dieser Untersuchung TLR-Status als Faktor über die gesamte Beobachtungszeit einen konstanten Effekt aufwies.

### **4.5. Mortalität und weitere Outcome-Parameter**

#### **4.5.1. Sterblichkeit**

Zwischen den Gruppen ergab sich kein Unterschied in der Mortalität. Ein Patient starb in der TLR2-Gruppe (10%) und 3 in der TLR4-Gruppe (15,8%) im Vergleich zu 8 Patienten (6,8%) in der Kontrollgruppe. ( $p = 0,53$  bzw.  $p = 0,18$ ).

#### **4.5.2. Dauer der maschinellen Beatmung und der intensivstationären Behandlung**

Die Dauer der maschinellen Beatmung war signifikant länger in der TLR4-Gruppe ( $18,8 \pm 22,1$  vs.  $6,3 \pm 11,6$  Tage;  $p = 0,027$ ). Für die TLR2-Gruppe war lediglich eine Tendenz zu beobachten ( $10,6 \pm 11,5$  Tage,  $p = 0,085$ ).

Die Behandlungsdauer auf der Intensivstation war signifikant länger in der TLR4-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (24 [7 | 40] vs. 10 [5 | 23] Tage,  $p = 0,047$ ). Der Vergleich von der TLR2-Gruppe zur Kontrollgruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Behandlungsdauer (23 [8 | 28] vs 10 [5 | 23] Tage,  $p = 0,129$ ).



### 5. DISKUSSION

#### 5.1. Hauptergebnis

Das Hauptergebnis der vorliegenden Studienarbeit ist, dass zwei häufige Single Nukleotid Polymorphismen von TLR2 und TLR4 - Arg753Gln bzw. Asp299Gly - mit einer kürzeren Zeit bis zum Auftreten einer schweren Sepsis oder septischen Schocks assoziiert sind.

Im Rahmen dieser Studie wurde die Hypothese geprüft, inwiefern das Fortschreiten einer Sepsis in der speziellen Population von intensivmedizinischen Patienten einen anderen Verlauf nimmt als in der Kontrollpopulation.

#### 5.2. Basischarakteristika

In der TLR2 Gruppe war Diabetes mellitus häufiger vertreten. Vor kurzem wurden TLR2 SNPs unter anderem mit der Pathogenese von Diabetes mellitus Typ 1 assoziiert (21). Devaraj et al. zeigten eine höhere Expression von TLR2 in Monozyten der Patienten mit diabetischer Erkrankung (22). Darüber hinaus zeigte eine tierexperimentelle Studie, dass die verstärkte Signaltransduktion über TLR2 zur länger unterhaltenen Entzündungsprozessen in den diabetischen Wunden beiträgt (23). Inwiefern die SNPs das häufigere Auftreten vom Diabetes mellitus und demzufolge die Verantwortung für eine signifikant höhere Rate an Infektionen pro Patient in der TLR2-Gruppe tragen könnten, bleibt zu diesem Zeitpunkt ungewiss. Auf der anderen Seite tragen die Toll-like Rezeptoren 2 zur Hyperinflammation bei und ihre Hemmung verbessert die Heilung diabetischer Wunden. Somit könnte die Abwesenheit von TLR2 Funktionalität zu einer verminderten Entzündung und einer verbesserten Wundheilung führen (23).

#### 5.3. Rolle der Toll-like Rezeptoren während einer Infektion

Salomao et al. testeten, ob ein Unterschied in der Zytokin-Produktion während des Fortschreitens der Sepsis zu beobachten war. Sowohl bei den septischen Patienten als auch beim Kontrollkollektiv fand sich vergleichbare monozytäre TLR2- und TLR4-Genexpression (24).

Ferner zeigten einige Studien, dass es möglicherweise einen sogenannten funktionellen Cross-talk zwischen den verschiedenen Toll-like Rezeptoren gibt (25, 26). Somit käme

es zusätzlich zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Toll-like Rezeptoren und konsekutiven Unterhaltung einer Infektion.

### **5.4. Einfluss von Single Nukleotid Polymorphismen der Toll-like Rezeptoren auf den Infektionsverlauf**

Frühere Studien konnten zeigen, dass genetische Variationen die Häufigkeit und den Verlauf von Infektionskrankheiten beeinflussen bzw. verändern können. Lorenz et al. untersuchten 91 Patienten mit septischem Schock und 73 gesunde Probanden (6). Hierbei zeigte sich, dass die Mutationen im TLR4-Gen mit einem erhöhten Risiko für septischen Schock und einer höheren Inzidenz von gramnegativen bakteriellen Infektionen assoziiert waren.

Zu neueren Einsichten führten größere Studien mit Single Nukleotid Polymorphismen (27, 28). Sie konnten die geografische Verteilung und Pathogenese von Infektionskrankheiten als Ausdruck der Unterschiede in der angeborenen Immunität aufdecken. Kiechl et al. zeigten, dass eine verminderte angeborene Immunabwehr bei Patienten mit Asp299Gly TLR4-Polymorphismen zur reduzierten intravasalen Entzündungsreaktion führte und ein erhöhtes Risiko für schwere bakterielle Infektionen darstellte (28). Beides entspricht den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit.

### **5.5. TLR Single Nukleotid Polymorphismen und Schwere der Sepsis**

Eine tierexperimentelle Studie legte nahe, dass der TLR-Signalweg zudem in der Stress-Hormon-Achse beteiligt sein könnte (29). In ihrer Studie konnten Zacharowski et al. unter anderem zeigen, dass bei TLR4-defizienten Mäusen eine veränderte Steroidogenese als Reaktion auf die Lipopolysaccharid-Aktivierung (Challenge) zu verzeichnen war. Diese Art von modifizierter Stress-Reaktion stellt eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Schwere der Sepsis bei Patienten der vorliegenden Studie dar.

Eine andere Erklärung beruht auf der Fähigkeit von TLR4 zur pro-inflammatorischen Signaltransduktion mithilfe von reaktiven Sauerstoff-Metaboliten. Unter verschiedenen Voraussetzungen konnte in Studien gezeigt werden, dass die TLR4 Rezeptoren auf diese Weise die intrazellulären Signalwege unabhängig von Lipopolysaccharid-Aktivierung regulieren (30–32). Patienten, denen die Rezeptor-Aktivität fehlt, wie im

Falle von SNP, werden möglicherweise durch den Mangel dieser pro-inflammatorischen Eigenschaften anfälliger für eine schwere Sepsis.

In der Zusammenschau der Score-Analyse wird ersichtlich, dass die Patienten der TLR-Gruppen eine unterschiedliche Dynamik der Entwicklung von schwerer Sepsis und septischem Schock zeigen als die Kontrollpatienten. Die intensivmedizinischen Scores weisen einen verschiedenen prognostischen Wert hinsichtlich der Mortalität der Patienten auf (33). Im Falle des SOFA-Score hatten die Patienten mit einer Infektion Organdysfunktionen mit einem höheren Score als nichtinfektiöse Patienten, was den Zusammenhang zwischen septischer Komplikation und einem Multiorgandysfunktionssyndrom verdeutlicht (15, 33). Die in dieser Studie präsentierten Score-Analysen decken auf, dass vor allem bei den Patienten mit TLR4 SNP eine frühere und im Verlauf höhere Morbidität der Sepsis zu verzeichnen ist. Dies entspricht den Erkenntnissen der bereits erwähnten Studien.

### **5.6. Infektionsrate**

#### **5.6.1. Infektionsrate in der TLR4 Gruppe**

Lorenz et al. demonstrierten, dass die Inzidenz von polymikrobiellen gramnegativen Infektionen je nach Genotyp anstieg und 100% bei Patienten mit TLR4 Asp299Gly Allel, im Vergleich zu 50% beim Wildtyp und 33,3% bei Patienten mit TLR4 Allel betrug (6). Darüber hinaus untersuchte die Studie von Agnese et al. Patienten mit TLR4/CD14 SNPs auf einer chirurgischen Intensivstation und gesunde Probanden (34). In dieser Studie zeigten 14 von 77 Patienten mit TLR4- defizienten Allelen eine signifikant höhere Rate an gramnegativen Infektionen.

In Übereinstimmung mit der vorliegenden Studienarbeit fanden Kumpf et al. keinen Zusammenhang zwischen Asp299Gly/Thr399Ile TLR4-Polymorphismen und der Häufigkeit bzw. Art der Mikroorganismen bei chirurgischen Infektionen (35).

Die Anzahl der Infektionen pro Patient unterschied sich nicht signifikant zwischen der TLR4- und der Kontrollgruppe in der vorliegenden Arbeit. Feterowski et al. führten eine Studie an Patienten nach größeren viszeralchirurgischen Eingriffen durch und fanden keinen Zusammenhang zwischen Asp299Gly TLR4 Polymorphismus und der Entwicklung, dem Zytokin-Niveau zu Beginn einer Sepsis und dem Outcome (36).

Auch in der hier vorgestellten Studie wurde kein Unterschied in der Verteilung der abdominalen Infektionen zwischen allen Gruppen beobachtet. Abhängig von der Anwesenheit von Thr399Ile – einem zusätzlichen kosegregierendem SNP von TLR4– zeigte sich jedoch bei Kiechl et al. eine unterschiedliche Anfälligkeit für bakterielle Infektionen (28). Der zuletzt erwähnte SNP wurde allerdings im Rahmen der vorliegenden Studie nicht untersucht.

### **5.6.2. Infektionsrate in der TLR2 Gruppe**

Im Gegensatz zu TLR4 Patienten ließen sich in der TLR2-Gruppe sowohl eine signifikant höhere Anzahl von Infektionen pro Patient als auch das häufigere Auftreten von schwer zu behandelnden Erregern erkennen. Dieses Ergebnis ist insofern nicht überraschend, da TLR2 reichlich im respiratorischen Epithel exprimiert werden (37, 38) und Lungeninfektionen die wichtigste Infektionen in dieser Studie waren.

Studien zu normalen menschlichen bronchialen Epithelzellen (NHBE-Zellen) zeigten, dass die Stimulation von TLR2 zu einer erhöhten Aktivierung der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)-Kaskade, die folglich zu stärkerer Interleukin-8 und vascular endothelial growth factor (VEGF)-Produktion führte (39). Folglich wäre bei Patienten mit TLR2 SNP die Rekrutierung und Stimulation der neutrophilen Granulozyten sowie die Reparatur von verletztem Gewebe unzureichend.

Im Vergleich dazu fand eine Fall-Kontroll-Studie keinen Zusammenhang zwischen verschiedenen TLR2-Polymorphismen und Sterblichkeit bzw. ernsthafter Morbidität nach einer schweren Staphylokokkeninfektion (11). Tatsächlich konnte zumindest in einer in-vitro-Studie gezeigt werden, dass ein heterozygoten TLR2 Allel in Stande wäre die komplette Zytokinantwort auf Staphylococcus aureus Liganden zu produzieren (40). Jedoch schließen Moore et al. einen großen Anteil der Patienten mit ambulant erworbenen Staphylokokkeninfektionen ein. Im Gegensatz dazu waren die TLR2 Patienten der vorliegenden Studie meist von schwer zu behandelnden nosokomialen Infektionen betroffen. Diese hier untersuchte Patientengruppe war mehr von anderen Erregerarten als Staphylococcus aureus kompromittiert, da der Einschluss in die Studie nicht alleine auf Staphylokokkeninfektionen beschränkt war.

Darüber hinaus werden die Lipoteichonsäuren - als Haupt-Ligand der grampositiven Bakterien, Lipide und Proteine des respiratorischen Syncytium Virus sowie Mykobakterien zugleich durch TLR4 erkannt (41). Dieselbe Arbeitsgruppe fand in einer

weiteren Studie heraus, dass TLR2-Knockout-Mäuse insgesamt anfälliger für Infektionen waren als Wildtypen (42). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit.

### **5.7. Einfluss auf das Outcome**

#### **5.7.1. Sterblichkeit**

Insgesamt wurde die höchste Sterberate in der TLR4-Gruppe beobachtet, gefolgt von der TLR2-Gruppe und war in der Kontrollpopulation am niedrigsten. Die Mortalität bei intensivstationären und insbesondere bei septischen Patienten wird durch verschiedenste Faktoren u.a. Alter, Geschlecht, zeitnahe und adäquate antimikrobielle Therapie, Einhaltung der krankenhausinternen Therapiestandards sowie Leitlinien der Sepsisbehandlung (Sepsis Bundles) beeinflusst. Nachtigall et al. untersuchten die Standardeinhaltung für Antiinfektiva Therapie bei älteren intensivmedizinischen Patienten. Die bessere Standardeinhaltung war mit einer niedrigeren Mortalitätsrate assoziiert (43). Des Weiteren konnten die selben Autoren in einer späteren Studie zeigen, dass die intensivstationäre Sterblichkeitsrate bei septischen Patientinnen höher war als bei männlichen Patienten (44). Kumar et al. demonstrierten den Stellenwert einer zeitnahen antimikrobiellen Therapie bei intensivstationären Patienten innerhalb einer multizentrischen Studie. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Verzögerung der Antibiotikatherapie nach Beginn der sepsis-bedingten Hypotonie bereits 1 Stunde später mit einer Mortalitätsrate von ca. 8% vergesellschaftet war (45).

Die vorliegende Observationsstudie beinhaltete die Mortalität in ihren sekundären Zielen. Allerdings war die Studie dafür statistisch nicht ausreichend gepowert. Sowohl die oben erwähnten als auch weiteren Faktoren, die einen Einfluss auf die Mortalität haben konnten, waren außerhalb des Fokus dieser Studie. Lorenz et al. fanden keine Assoziation zwischen TLR4-Genotyp, SAPS II-Werten und Mortalität (6). Jedoch hatten die Patienten der TLR4-Gruppe der vorliegenden Studie bereits bei der ITS Aufnahme im Trend höheren SAPS-II Score. In der Subgruppenanalyse konnten Kumpf et al. eine Mortalität von 22% (n=2) bei den Patienten mit TLR4 SNP vorweisen (35). Feterowski et al. stellten keine Korrelation der Sterblichkeitsrate bei septischen chirurgischen Patienten mit TLR4 SNP und der Wildtyp-Gruppe fest (36). Im Einklang mit anderen klinischen Studien an Toll-like Rezeptor Polymorphismen ließ sich hier lediglich eine erhöhte Sterberate bei TLR4-Patienten dokumentieren.

Hinsichtlich der Patienten mit TLR2 SNP konnten Lorenz et al. nur 2 Patienten mit Arg753Gln Mutation von 22 Patienten mit gram-positiven septischen Schock identifizieren (12). Allerdings wurde die Mortalität im Rahmen dieser Studie nicht berichtet. Moore et al. konnten keine Unterschiede in Mortalität bei Patienten mit schweren Staphylokokkeninfektionen verglichen mit der Wildtyp-Gruppe feststellen (11). Dies entspricht auch den Resultaten der vorliegenden Studienarbeit.

Im Hinblick auf den deskriptiven Charakter der Studie sollten die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden.

### **5.7.2. Dauer der maschinellen Beatmung und der intensivstationären Behandlung**

Sowohl die Dauer der maschinellen Beatmung als auch der intensivstationären Behandlung waren bei den TLR Patienten verlängert. In der TLR4-Gruppe erreichten sie das Signifikanzniveau, bei der TLR2-Gruppe wurde nur ein Trend beobachtet. Hall et al. fanden heraus, dass eine erhöhte mRNA-Produktion für TLR2 und TLR4-Gene mit einer längeren Dauer der maschinellen Beatmung und der intensivstationären Behandlung bei pädiatrischen Patienten assoziiert waren (46). Im Vergleich dazu zeigten die TLR-Patienten der vorliegenden Studienarbeit bereits am Anfang eine ungleiche klinische Manifestation der Erkrankungsschwere mit höheren APACHE II Scores in der TLR4-Gruppe.

Kumpf et al. untersuchten intensivmedizinische Patienten mit TLR4-Wildtyp, Asp299Gly und Thr399Ile SNP für TLR4 und TIRAP/Mal SNP-Allelen (35). Im Falle einer Ventilator-assoziierten Pneumonie trat der septische Schock am häufigsten bei solchen Patienten auf (67%, N= 9), die Träger von TLR4 SNP waren. Kumpf et al. postulierten, dass ein Mangel im TLR4-Gen bzw. Genprodukt mit einem höheren Risiko für septische Komplikationen nach einem operativen Eingriff vergesellschaftet sein könnte. Dies entspricht auch den Erkenntnissen der vorliegenden Studie.

### **5.8. Einschränkungen**

Die vorliegende Studie weist einige Limitationen auf, die an dieser Stelle erwähnt werden sollen.

Wie die meisten Studien zu genetischen Polymorphismen umfasst diese Studie nur eine relativ kleine Anzahl von Patienten aufgrund der Seltenheit der SNPs in der allgemeinen Bevölkerung. Dies beschränkt die Schlussfolgerungen auf die gegebene Evidenz.

Die vorliegende klinische Studie wurde initial als Pilotprojekt konzipiert und so wurden keine den TLR-nachgeschalteten Signal-Metaboliten untersucht. Letztere hätten zusätzliche Informationen über die Pathogenese der Sepsisentwicklung bei Patienten mit TLR-Polymorphismen liefern können.

Darüber hinaus, wie bereits oben erwähnt existieren auch weitere Single Nukleotid Polymorphismen der Toll-like Rezeptoren, die in dieser Studie nicht mituntersucht wurden. Es ist nicht auszuschließen, dass das Vorhandensein von weiteren SNPs einen zusätzlichen Einfluss auf das Wirkungsprofil der TLRs hat.

Ferner sind mehrere Mediatoren bekannt, die zur Modulierung der TLR-Signalkaskade beitragen. Dazu gehören Opioide, Protonenpumpenhemmer, Statine, Vitamin-D-Komplex und andere weit verbreitete Medikamente (47). Die Interaktion mit diesen Medikamenten könnte unterschiedliche Effekte bei septischen Patienten mit Toll-like Rezeptor Polymorphismen aufweisen.

### **5.9. Ausblick**

In Anbetracht der Rolle der Toll-like Rezeptoren während einer schweren Sepsis bzw. eines septischen Schocks mit Multiorganversagen werden in wissenschaftlichen Kreisen verschiedene Ansätze diskutiert (47). Dies beinhaltet die Einführung von neuen Medikamenten, wie z.B. E5564 (Eritoran), welches - als Endotoxinantagonist - modulierend am TLR4/MD2- Rezeptorkomplex dienen sollte (48). Des Weiteren steht die Entwicklung von spezifischen Antikörper gegen den TLR4 zur Diskussion (49, 50).

Bis dato konnten aufgrund der gravierenden Nebenwirkungen oder nicht nachgewiesenes Nutzens keine bahnbrechenden Therapeutika auf den Markt gebracht werden (51). Jedoch ist die endgültige Aufschlüsselung der TLR-Signaltransduktion mit immer neu zu erforschenden Modulationsmöglichkeiten noch

## DISKUSSION

---

nicht vollendet. Eine abschließende Beurteilung bleibt es zu diesem Zeitpunkt abzuwarten.



### 6. Zusammenfassung

Eine beachtliche Menge an experimenteller und klinischer Forschung wurde in den letzten Jahren dem Zusammenhang von Single Nukleotid Polymorphismen der Toll-like Rezeptoren bei Säugetieren und verschiedenen Krankheitsmanifestationen gewidmet. Dennoch bleibt die komplexe Interaktion zwischen dem Wirt und den eindringenden Krankheitserregern, die von lokaler bis zu systemischer inflammatorischer Reaktion und zu schwerer Sepsis bzw. septischen Schock mit Multiorganversagen führt, ein spannendes Forschungsthema.

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob sich Unterschiede im Auftreten und Dynamik septischer Komplikationen bei Intensivpatienten mit Arg753Gln TLR2- und Asp299Gly TLR4- Single Nukleotid Polymorphismus nachweisen lassen. Dies konnte in einer prospektiven kontrollierten nicht-interventionellen klinischen Beobachtungsstudie auf drei multidisziplinären Intensivstationen der Charité-Universitätsmedizin Berlin anhand von Surrogatmarkern wie Krankheitsschwerescores untersucht werden. Insgesamt wurden 145 Patienten in die Studie eingeschlossen. Zehn Patienten waren Träger einer heterozygoten Mutation Arg753Gln im TLR2- Gen, neunzehn einer heterozygoten Mutation Asp299Gly im TLR4- Gen und 117 Patienten wurden als Wildtyp identifiziert. Daraus entstanden drei Gruppen, die anhand von Surrogatparametern miteinander verglichen wurden.

Die Inzidenz der schweren Sepsis lag bei 33% in der Wildtyp-Gruppe (N = 38). In der TLR2-Gruppe betrug sie 60% (N = 6, p = 0,094 vs. Wildtyp). In der TLR4-Gruppe war eine signifikant höhere Häufigkeit von 63% (N = 12, p = 0,019 vs. Wildtyp) zu verzeichnen. Der septische Schock entwickelte sich in 24% der Wildtyp-Patienten (N = 28), 40% der TLR2 (N = 4, p = 0,27) und 52% der TLR4-Patienten (N = 10, p = 0,014). In den Kaplan-Meier-Analysen der intensivmedizinischen Scores zeigte sich ein progredienter Verlauf einer Sepsis bei TLR2- und TLR4-Patienten. Außerdem wiesen die TLR4-Patienten bereits am Anfang eine höhere Erkrankungsschwere auf (p = 0,008 vs. Wildtyp). Darüber hinaus war die intensivstationäre Behandlungsdauer in der TLR4- im Vergleich zur Kontrollgruppe verlängert (p = 0,047).

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass die Patienten mit Single Nukleotid Polymorphismen der Toll-like Rezeptoren zum einen eine andere Ausprägung, zum anderen eine unterschiedliche Dynamik der Infektion aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass TLR2- und TLR4-Polymorphismen mit einer rascher Progression und einem komplizierten Verlauf von schwerer Sepsis und septischem Schock assoziiert sind.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone H-G, et al.: Diagnose und Therapie der Sepsis. *Clinical Research in Cardiology* 2006; 95:429-454
2. Read RC, Wyllie DH: Toll receptors and sepsis. *Curr Opin Crit Care* 2001; 7:371-375
3. Medzhitov R, Janeway C: Innate immunity. *N. Engl. J. Med* 2000; 343:338-344
4. Schröder NWJ, Schumann RR: Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:156-164
5. Iwasaki A, Medzhitov R: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol* 2004; 5:987-995
6. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, et al.: Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch. Intern. Med* 2002; 162:1028-1032
7. Yang RB, Mark MR, Gray A, et al.: Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 1998; 395:284-288
8. KEGG PATHWAY: Toll-like receptor signaling pathway - Homo sapiens (human) [Internet]. [cited 2011 Dec 10] Available from: <http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04620.html>
9. Angus DC, Burgner D, Wunderink R, et al.: The PIRO concept: P is for predisposition. *Crit Care* 2003; 7:248-251
10. Nakada T, Hirasawa H, Oda S, et al.: Influence of Toll-Like Receptor 4, CD14, Tumor Necrosis Factor, and Interleukine-10 Gene Polymorphisms on Clinical Outcome in Japanese Critically Ill Patients. *Journal of Surgical Research* 2005; 129:322-328
11. Moore CE, Segal S, Berendt AR, et al.: Lack of association between Toll-like receptor 2 polymorphisms and susceptibility to severe disease caused by *Staphylococcus aureus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 2004; 11:1194-1197
12. Lorenz E, Chemotti DC, Jiang AL, et al.: Differential involvement of toll-like receptors 2 and 4 in the host response to acute respiratory infections with wild-type and mutant *Haemophilus influenzae* strains. *Infect. Immun* 2005; 73:2075-2082
13. Williams DL, Ha T, Li C, et al.: Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality\*. *Critical Care Medicine* 2003; 31:1808-1818

14. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, et al.: APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit. Care Med* 1985; 13:818-829
15. Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, et al.: Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit. Care Med.* 1998; 26:1793-1800
16. Miranda DR, de Rijk A, Schaufeli W: Simplified Therapeutic Intervention Scoring System: the TISS-28 items--results from a multicenter study. *Crit. Care Med* 1996; 24:64-73
17. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, et al.: CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988; 16:128-140
18. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al.: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101:1644-1655
19. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al.: Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med* 2008; 34:17-60
20. Reinhart K, Brunkhorst F, Bone H, et al.: [Diagnosis and therapy of sepsis: guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine]. *Anaesthetist* 2006; 55 Suppl 1:43-56
21. Bjørnvold M, Munthe-Kaas MC, Egeland T, et al.: A TLR2 polymorphism is associated with type 1 diabetes and allergic asthma. *Genes Immun* 2009; 10:181-187
22. Devaraj S, Jialal I, Yun J-M, et al.: Demonstration of increased toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in monocytes of type 1 diabetes mellitus patients with microvascular complications. *Metab. Clin. Exp* 2011; 60:256-259
23. Dasu MR, Thangappan RK, Bourgette A, et al.: TLR2 expression and signaling-dependent inflammation impair wound healing in diabetic mice. *Lab. Invest* 2010; 90:1628-1636
24. Salomao R, Brunialti MKC, Gomes NE, et al.: Toll-like receptor pathway signaling is differently regulated in neutrophils and peripheral mononuclear cells of patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Crit. Care Med* 2009; 37:132-139

25. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al.: The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2000; 97:13766-13771
26. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, et al.: Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol* 2000; 1:398-401
27. Ferwerda B, McCall MBB, Alonso S, et al.: TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2007; 104:16645-16650
28. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al.: Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N. Engl. J. Med* 2002; 347:185-192
29. Zacharowski K, Zacharowski PA, Koch A, et al.: Toll-like receptor 4 plays a crucial role in the immune-adrenal response to systemic inflammatory response syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2006; 103:6392-6397
30. Barsness KA, Arcaroli J, Harken AH, et al.: Hemorrhage-induced acute lung injury is TLR-4 dependent. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 2004; 287:R592-599
31. Oyama J-ichi, Blais C, Liu X, et al.: Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 2004; 109:784-789
32. Wu H, Chen G, Wyburn KR, et al.: TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest* 2007; 117:2847-2859
33. Lewandowski K, Lewandowski M: Scoring-Systeme auf der Intensivtherapiestation. *Der Anaesthetist* 2003; 52:965-990
34. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, et al.: Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J. Infect. Dis* 2002; 186:1522-1525
35. Kumpf O, Giamarellos-Bourboulis EJ, Koch A, et al.: Influence of genetic variations in TLR4 and TIRAP/Mal on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts. *Crit Care* 2010; 14:R103
36. Feterowski C, Emmanuilidis K, Miethke T, et al.: Effects of functional Toll-like receptor-4 mutations on the immune response to human and experimental sepsis. *Immunology* 2003; 109:426-431
37. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783-801

38. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, et al.: Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 2004; 31:358-364
39. Koff JL, Shao MXG, Ueki IF, et al.: Multiple TLRs activate EGFR via a signaling cascade to produce innate immune responses in airway epithelium. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 2008; 294:L1068-1075
40. von Aulock S, Schroder NWJ, Traub S, et al.: Heterozygous Toll-Like Receptor 2 Polymorphism Does Not Affect Lipoteichoic Acid-Induced Chemokine and Inflammatory Responses. *Infection and Immunity* 2004; 72:1828-1831
41. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al.: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11:443-451
42. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S: Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol* 2000; 165:5392-5396
43. Nachtigall I, Deja M, Tafelski S, et al.: Adherence to standard operating procedures is crucial for intensive care unit survival of elderly patients. *J. Int. Med. Res.* 2008; 36:438-459
44. Nachtigall I, Tafelski S, Rothbart A, et al.: Gender-related outcome difference is related to course of sepsis on mixed ICUs: a prospective, observational clinical study. *Critical Care* 2011; 15:R151
45. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al.: Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock\*. *Critical Care Medicine* 2006; 34:1589-1596
46. Hall MW, Gavrilin MA, Knatz NL, et al.: Monocyte mRNA phenotype and adverse outcomes from pediatric multiple organ dysfunction syndrome. *Pediatr. Res* 2007; 62:597-603
47. Wittebole X, Castanares-Zapatero D, Laterre PF: Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis. *Mediators Inflamm* 2010; 2010:568396
48. Kim HM, Park BS, Kim J-I, et al.: Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 2007; 130:906-917
49. Gross P, Brandl K, Dierkes C, et al.: Lipopolysaccharide-trap-Fc, a multifunctional agent to battle gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* 2009; 77:2925-2931

50. Roger T, Froidevaux C, Le Roy D, et al.: Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106:2348-2352
51. Rice TW, Wheeler AP, Bernard GR, et al.: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis\*. *Critical Care Medicine* 2010; 38:1685-1694

## **8. Danksagung**

Mein großer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Claudia Spies, die mir das vorliegende hochinteressante Thema zur Verfügung stellte. Ihre Betreuung war außergewöhnlich, stand sie mir doch jederzeit mit konstruktiver Kritik zur Seite, begleitete mich mit Sorgfalt und erschloss mir, nicht zuletzt durch lehrreiche und anregende Diskussionen, die große Freude und den Erfolg am wissenschaftlichen Arbeiten.

Frau Dr. med. Nachtigall gilt für ihren stets engagierten Einsatz mein besonderer Dank. Ohne ihre engmaschige Begleitung, Geduld und außerordentliche Motivation wäre diese Studienarbeit nicht entstanden.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Wernecke und den Mitarbeitern von Sostana GmbH für die hilfreiche Ausarbeitung von statistischen Analysen und die ausgezeichnete Beratung.

Insbesondere fühle ich mich meinem Mitdoktoranden und Kollegen Dr. med. Sascha Tafelski für die Hilfe bei der Dateninterpretation und für seine unermüdliche Unterstützung herzlich zu Dank verpflichtet. Den Doktoranden des ABx Team 2006-2007 sei für ihre Mitwirkung bei der Datenerhebung und –verarbeitung gedankt.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Patientinnen und Patienten für ihre Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mir mit großer Hilfsbereitschaft, Geduld und Liebe stets zur Seite stand und vieles hierdurch ermöglichte.

Das Poster zu diesem Studienprojekt wurde mit dem 1. Forschungspreis des Kongresses der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensivmedizin und Notfallmedizin 2010 honoriert. Für solch eine hohe Anerkennung möchte ich mich bei dem zuständigen Ausschuss der DIVI 2010 herzlich bedanken.



## 9. Eidesstattliche Erklärung

Ich, *Andrey Tamarkin*, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

**„Auftreten und Dynamik der Entwicklung von schwerer Sepsis und septischem Schock bei intensivstationären Patienten mit Polymorphismen der Toll-like Rezeptoren 2 und 4“**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den .....

Unterschrift .....

## **10. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.