

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zusammenhang zwischen CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 mit der  
hepatischen Dysfunktion bei Sepsis

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Navid Ahmadi

aus Mashhad

Datum der Promotion: 13.12.2019

## **Vorwort**

Die Forschung ist aus der heutigen modernen Welt nicht mehr wegzudenken. Ihr verdanken wir die ständige Erweiterung unseres Wissens in der Medizin. Es ist die Wissenschaft, die es uns ermöglicht, die Funktionsweisen des menschlichen Körpers zu verstehen, Krankheiten früher zu erkennen, diese besser zu behandeln und letztendlich Methoden zu entwickeln, um diesen vorzubeugen.

Obwohl in den vergangenen Jahrhunderten enorme Fortschritte in der Medizin gemacht worden sind, bleiben zahlreiche Fragen weiterhin unbeantwortet.

Es ist von immenser Bedeutung, Wissenschaft verantwortungsbewusst zu betreiben. Denn nur so ist es möglich, den Bedürfnissen und Anliegen der Gesellschaft sowie den Zielen der Forschung gerecht zu werden.

Aus einem Teil der Daten der vorliegenden Arbeit sind zwei Manuskripte (Kaffarnik et al. 2017 und Kaffarnik et al. 2013) in Fachzeitschriften veröffentlicht worden. Der Verfasser dieser Dissertation hat maßgeblich zur Entstehung der genannten Publikationen beigetragen. Im Folgenden wird sein Beitrag im Detail erläutert.

Anteilerklärung für 1) Kaffarnik et al. 2017:

Folgende Tätigkeiten wurden mindestens zur Hälfte von Navid Ahmadi durchgeführt:

- Vorbereitung und Verfassung des Ethikantrags sowie Organisation der Studie;
- Rekrutierung, Aufklärung und Einbeziehung der Patienten in die Studie sowie
- Durchführung sämtlicher für die Studie notwendigen Untersuchungen (z. B. Leberfunktionstest) und Blutabnahmen, Vorbereitung und Lagerung der Blutproben.

Die Durchführung des immunologischen Nachweisverfahrens für die Konzentrationsbestimmung der Zytokine in den Blutproben führte Navid Ahmadi in Zusammenarbeit mit einer Medizintechnischen Assistentin durch.

Die Auswertung der Daten und die Erstellung der Tabellen und Grafiken führte Navid Ahmadi alleine durch. Des Weiteren wirkte er maßgeblich an der Überarbeitung und Korrektur des Manuskripts mit.

Anteilerklärung für 2) Kaffarnik et al. 2013:

Folgende Tätigkeiten wurden mindestens zur Hälfte von Navid Ahmadi durchgeführt:

- Vorbereitung und Verfassung des Ethikantrags sowie Organisation der Studie;
- Rekrutierung, Aufklärung und Einbeziehung der Patienten in die Studie sowie
- Durchführung sämtlicher für die Studie notwendigen Untersuchungen (z. B. Leberfunktionstest) und Blutabnahmen, Vorbereitung und Lagerung der Blutproben, Verwaltung und Auswertung der Daten, Erstellung der Tabellen und Grafiken für die Publikation.

1) Kaffarnik MF, Ahmadi N, Lock JF, Wuensch T, Pratschke J, Stockmann M, Malinowski M. Correlation between plasma endothelin-1 levels and severity of septic liver failure quantified by maximal liver function capacity (LiMAx test). A prospective study. PloS one. 2017;12(5):e0178237.

2) Kaffarnik MF, Lock JF, Vetter H, Ahmadi N, Lojewski C, Malinowski M, Neuhaus P, Stockmann M. Early diagnosis of sepsis-related hepatic dysfunction and its prognostic impact on survival: a prospective study with the LiMAx test. Critical care (London, England). 2013;17(5):R259.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>ABSTRACT (DEUTSCH) .....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT (ENGLISH) .....</b>	<b>11</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>13</b>
1.1. TUMORNEKROSEFAKTOR- $\alpha$ .....	13
1.2. INTERLEUKIN-6 .....	14
1.3. ENDOTHELIN-1.....	14
1.4. MESSUNG DER LEBERFUNKTION .....	15
1.5. ZIELSETZUNG.....	16
<b>2. MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>18</b>
2.1. STUDIENDESIGN .....	18
2.2. PRINZIP UND DURCHFÜHRUNG DES LiMAX-TESTS.....	22
2.3. GEWINNUNG UND BEARBEITUNG DER BLUTPROBEN.....	23
2.4. LiMAX-TEST UND VERLAUF VON CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 BEI SEPSIS UND SIRS .....	28
2.5. KORRELATION ZWISCHEN DEM LiMAX-TEST UND DEN ABSOLUTWERTEN VON CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 .....	28
2.6. KORRELATION ZWISCHEN DER HEPATISCHEN DYSFUNKTION UND DEM VERLAUF VON CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 .....	28
2.7. KORRELATION ZWISCHEN DEM SCHWEREGRAD DER SEPSIS UND DEM VERLAUF DES LiMAX-TESTS, CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 .....	28
2.8. KORRELATION ZWISCHEN DEM KRANKHEITSVERLAUF UND DER HÖHE VON CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 .....	29
2.9. STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	29
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>30</b>
3.1. LiMAX-TEST UND VERLAUF VON CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 BEI SEPSIS UND SIRS .....	32
3.2. KORRELATION ZWISCHEN DEM LiMAX-TEST UND DEN ABSOLUTWERTEN VON CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 .....	35
3.3. KORRELATION ZWISCHEN DER HEPATISCHEN DYSFUNKTION UND DEM VERLAUF VON CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 .....	39
3.4. KORRELATION ZWISCHEN DEM SCHWEREGRAD DER SEPSIS UND DEM VERLAUF DES LiMAX-TESTS, CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 .....	42
3.5. KORRELATION ZWISCHEN DEM KRANKHEITSVERLAUF UND DER HÖHE VON CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 .....	45

<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>48</b>
4.1. LiMAX-TEST UND VERLAUF VON CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 BEI SEPSIS UND SIRS.....	48
4.2. KORRELATION ZWISCHEN DEM LiMAX-TEST UND DEN ABSOLUTWERTEN VON CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 .....	53
4.3. KORRELATION ZWISCHEN DER HEPATISCHEN DYSFUNKTION UND DEM VERLAUF VON CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 .....	57
4.4. KORRELATION ZWISCHEN DEM SCHWEREGRAD DER SEPSIS UND DEM VERLAUF DES LiMAX-TESTS, CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 .....	60
4.5. KORRELATION ZWISCHEN DEM KRANKHEITSVERLAUF UND DER HÖHE VON CT-PROET-1, TNF- $\alpha$ UND IL-6 .....	62
4.6. AUSBLICK .....	64
4.7. LIMITATIONEN .....	67
4.8. ZUSAMMENFASSUNG.....	67
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>69</b>
<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>78</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>80</b>
<b>PUBLIKATIONS LISTE .....</b>	<b>83</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>84</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1. Funktionsprinzip des LiMAx-Tests .....	23
Abbildung 2. Verlauf von LiMAx, CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6 in der Sepsis- und SIRS-Gruppe .....	34
Abbildung 3. Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen CT-proET-1 und LiMAx-Test.....	36
Abbildung 4. Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen TNF- $\alpha$ und LiMAx-Test .....	37
Abbildung 5. Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen IL-6 und LiMAx-Test.	38
Abbildung 6. Verlauf von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6 in Abhängigkeit der hepatischen Dysfunktion.....	41
Abbildung 7. Verlauf von LiMAx, CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6 in Abhängigkeit des Schweregrades der Sepsis .....	44
Abbildung 8. Verlauf von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6 in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf .....	47

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1. SIRS- und Sepsis-Kriterien nach der alten Definition .....	19
Tabelle 2. Sepsis-Kriterien nach der neuen Definition .....	19
Tabelle 3. Ein- und Ausschlusskriterien.....	20
Tabelle 4. Zeitlicher Studienverlauf .....	22
Tabelle 5. Basis-Charakteristika der Sepsis- und SIRS-Gruppe .....	31
Tabelle 6. Verlauf des LiMAx-Tests und der Serumkonzentration von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6 in der Sepsis- und SIRS-Gruppe .....	33
Tabelle 7. Serumkonzentrationen von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6 bei Patienten mit LiMAx <100 $\mu$ g/kg/h bzw. LiMAx $\geq$ 100 $\mu$ g/kg/h.....	40
Tabelle 8. LiMAx-Test, CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6 in Abhängigkeit des Schweregrades der Sepsis.....	43
Tabelle 9. Serumkonzentrationen von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6 bei Patienten mit negativem bzw. positivem Verlauf .....	46

**Abkürzungsverzeichnis**

ALAT.....	Alanin-Aminotransferase
APACHE-II-Score.....	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II Score
ARDS.....	Acute Respiratory Distress Syndrome
ASAT.....	Aspartat-Aminotransferase
CO <sub>2</sub> .....	Kohlenstoffdioxid
CT-proET-1.....	C-Terminal-pro-Endothelin-1
DOB.....	Delta Over Baseline
ET-1.....	Endothelin-1
GGT.....	Gamma-Glutamyltransferase
ICG.....	Indocyaningrün
IL-1.....	Interleukin-1
IL-6.....	Interleukin-6
IL-10.....	Interleukin-10
INR.....	International Normalized Ratio
IQA.....	Interquartilsabstand
LiMAx.....	Maximal Liver Function Capacity Test
LPS.....	Lipopolysaccharide
MEGX.....	Monoethylglycinexylidide
MW.....	Mittelwert
PDB.....	Pee Dee Belemnite
PTZ.....	Prothrombinzeit
SAPS-Score.....	Simplified Acute Physiology Score
SD.....	Standardabweichung
SIRS.....	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SOFA-Score.....	Sequential Organ Failure Assessment Score
TNF- $\alpha$ .....	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNFR1.....	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1
TNFR2.....	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 2
TRACE.....	Time Resolved Amplified Cryptate Emission

## **Abstract (Deutsch)**

Sepsis ist eine lebensbedrohliche Organdysfunktion als Folge einer systemisch dysregulierten Inflammationsreaktion auf eine Infektion. Im Rahmen der Sepsis kommt es innerhalb weniger Stunden zu einer Einschränkung der hepatischen Funktion. Die Leber nimmt eine zentrale Rolle ein bei der Regulierung des Immunsystems und Bekämpfung der Krankheitserreger. Durch die Aktivierung des Immunsystems im Rahmen der Sepsis kommt es zur Freisetzung zahlreicher Zytokine und Mediatoren. Hierzu gehören Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin-6 und Endothelin-1. Ziel der vorliegenden klinisch-prospektiven Studie ist es, den Zusammenhang zwischen den genannten Zytokinen und der Leberfunktion, gemessen mit dem LiMAX-Test, bei septischen Patienten zu untersuchen. Des Weiteren sind die unterschiedlichen Verläufe dieser Zytokine in Abhängigkeit des Schweregrades der Sepsis und deren Assoziation mit der Prognose der Patienten analysiert worden.

### Methode

28 Patienten wurden innerhalb von 24 Stunden nach Beginn der Sepsis in die Studie eingeschlossen. Als Kontrollgruppe dienten fünf Patienten mit einem postoperativen systemischen inflammatorischen Response-Syndrom. Der LiMAX-Test wurde unmittelbar nach Einschluss in die Studie sowie an den Tagen 2, 5 und 10 durchgeführt. Zu denselben Zeitpunkten wurde zur Bestimmung der Serumkonzentrationen von Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin-6 und C-Terminal-pro-Endothelin-1 (Spaltprodukt von Endothelin-1) Blut abgenommen. Der Verlauf der LiMAX-Werte und der Zytokine wurde bei allen Studienteilnehmern analysiert. In der Sepsis-Gruppe wurde die Höhe der Zytokine mit dem LiMAX-Wert korreliert. Zusätzlich wurden innerhalb der Sepsis-Gruppe folgende Untergruppen hinsichtlich der Konzentration der Zytokine miteinander verglichen:

- Patienten mit einem LiMAX-Wert von  $\geq 100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  und  $< 100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$
- Patienten mit einem Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II Score (APACHE-II-Score)  $\geq 20$  und  $< 20$
- Patienten mit einem positiven Verlauf und mit einem negativen Verlauf

### Ergebnisse:

Innerhalb von 24 Stunden nach Eintritt der Sepsis kam es zu einer signifikanten Einschränkung der hepatischen Funktion. Die Serumkonzentrationen von C-Terminal-pro-Endothelin-1, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Interleukin-6 waren an allen Tagen erhöht. Es konnte eine negative Korrelation zwischen der Höhe der Zytokine und der Leberfunktion nachgewiesen werden.

Patienten mit einer hochgradigen Einschränkung der Leberfunktion ( $\text{LiMAx} < 100 \mu\text{g/kg/h}$ ) zeigten vor allem im späteren Verlauf der Sepsis höhere Konzentrationen von C-Terminal-pro-Endothelin-1 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  als Patienten mit einer geringer eingeschränkten Leberfunktion. Patienten mit einem APACHE-II-Score  $\geq 20$  zeigten eine stärker eingeschränkte Leberfunktion und höhere Konzentrationen aller drei Zytokine als Patienten mit einem APACHE-II-Score  $< 20$ . Patienten mit einem negativen Verlauf zeigten höhere Werte von C-Terminal-pro-Endothelin-1, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Interleukin-6 als Patienten mit einem positiven Verlauf.

#### **Schlussfolgerung:**

Bei septischen Patienten korreliert das Ausmaß der hepatischen Dysfunktion, der Schweregrad der Sepsis und der Krankheitsverlauf mit der Höhe und dem Verlauf der Zytokine Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin-6 und Endothelin-1.

## **Abstract (English)**

Sepsis is a life-threatening organ dysfunction as a result of a dysregulated systemic inflammation response to an infection. This condition involves a hepatic dysfunction which already begins within a short time after the onset of sepsis. The liver has a crucial role in the regulation of the immune system and protection of the body against pathogens. During sepsis a great number of cytokines and mediators such as tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6 and endothelin-1 are released. The aim of the present clinical prospective study was to investigate the relationship between the abovementioned mediators and the hepatic dysfunction, measured for the first time by the LiMAX-Test, in septic patients. Furthermore, the association of these mediators with the severity of sepsis and the outcome of patients was analysed.

## **Methods**

28 Patients were admitted to the study within 24 hours after the onset of sepsis. 5 patients with a post-operative systemic inflammatory response syndrome were admitted as control group. The LiMAX-test and blood sample collection for the measurement of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6 and C-terminal-pro-endothelin-1 (precursor fragment of endothelin-1) plasma levels were performed at baseline (within 24 hours after the onset of sepsis) and on 2<sup>nd</sup>, 5<sup>th</sup>, and 10<sup>th</sup> day. The dynamic of the liver function and the cytokines was analysed. In the sepsis group a correlation between the LiMAX-value and the levels of cytokines was established. In addition, the septic patients were divided in to the following sub-groups for further analyzes: LiMAX-value of  $\geq 100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  and  $< 100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ , APACHE-II-Score of  $\geq 20$  and  $< 20$ , favorable and adverse outcome.

## **Results:**

In the sepsis group the liver function was impaired within a short time after the onset of sepsis. The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6 and C-terminal-pro-endothelin-1 were elevated on all days. There was a negative correlation between the levels of these cytokines and the liver function. Patients with a LiMAX-value of  $< 100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  revealed higher levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  and C-terminal-pro-endothelin-1. APACHE-II-Score of  $\geq 20$  and adverse outcome both were associated with higher cytokines levels. The severity of liver dysfunction was higher in patients with an APACHE-II-score of  $\geq 20$ .

Conclusion:

The Plasma levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6 and endothelin-1 during sepsis are associated with the hepatic dysfunction, outcome and the severity of illness.

## **1. Einleitung**

Die Sepsis ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, die durch eine systemische Inflammationsreaktion des Körpers auf eine Infektion hervorgerufen wird und mit einer Organdysfunktion einhergeht (1). In den Vereinigten Staaten erkranken jährlich zwischen 0,9 und 3 Millionen Menschen an einer Sepsis. Mit einer Mortalitätsrate von ca. 30 % stellt diese Erkrankung trotz weltweit intensiver Forschungsanstrengungen in den letzten 20 Jahren auch noch heute ein ernst zu nehmendes Problem dar (2).

Einen unabhängigen und entscheidenden Faktor bezüglich der Prognose und der Mortalität der betroffenen Patienten stellt die durch den inflammatorischen Prozess entstehende hepatische Dysfunktion dar (3). Diese entsteht bereits innerhalb weniger Stunden nach Beginn der Sepsis und kann zu einem fulminanten Organversagen führen (4). Die Leber ist im Falle einer Bakteriämie ein bedeutendes Organ bei der Entwicklung und Steuerung der Immunantwort. Sie steuert die Synthese einer großen Zahl von Proteinen, die für die Aufrechterhaltung dieses Prozesses notwendig sind. Sie beherbergt ca. 70 % der körpereigenen Makrophagen (Kupferzellen) und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Krankheitserregern und deren Toxinen (5).

Im Rahmen der Sepsis kommt es neben der Freisetzung von Akut-Phase-Proteinen u. a. zu einer massiven Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren, welchen die Leber in ihrer Rolle als Wächter des Körpers selbst zum Opfer fallen kann (6). Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL-6) zählen zu den bedeutendsten proinflammatorischen Zytokinen. Des Weiteren spielt Endothelin-1 (ET-1) als einer der potentesten Vasokonstriktoren und als Regulator der hepatischen Mikrozirkulation eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Leberfunktion.

### **1.1. Tumornekrosefaktor- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  ist eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine. Es ist in seiner Funktion als Mediator des Immunsystems für den Schutz des Körpers gegenüber Krankheitserregern und für die Regulierung der Immunreaktion verantwortlich.

TNF- $\alpha$  wird alleine oder im Synergismus mit anderen Zytokinen für viele Früh- oder Spätkomplikationen bei septischen Patienten (z. B. Multiorganversagen und Schock) verantwortlich gemacht. TNF- $\alpha$  wird in einer Vielzahl von Zellen produziert, z. B. in Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, NK-Zellen sowie in B- und T-Lymphozyten. Im Rahmen

einer Sepsis kommt es zur Freisetzung von TNF- $\alpha$ , welche dann wiederum eine potenziell letale Zytokinkaskade in Gang setzen kann (7, 8).

Experimentelle Studien zeigen, dass TNF- $\alpha$  im Rahmen einer Sepsis auch die Leberfunktion beeinträchtigen kann. Ein wichtiger Mechanismus ist die Aktivierung der Apoptose in den Leberzellen. Es wird vermutet, dass TNF- $\alpha$  beim Menschen für die während der Sepsis entstehende hepatische Dysfunktion mitverantwortlich ist (9-11).

### **1.2. Interleukin-6**

IL-6, ursprünglich als B-Zell-Stimulierungsfaktor bekannt, ist ein pleiotropes multifunktionales Zytokin, das auf verschiedene Organe unterschiedliche Wirkungen entfaltet. Es hat sowohl potente proinflammatorische Eigenschaften, die zu einer Schädigung des Organismus führen können, als auch antiinflammatorische, protektiv-regenerative Eigenschaften. Des Weiteren spielt IL-6 eine wichtige Rolle bei der Regulierung verschiedener metabolischer Funktionen des Körpers, z. B. der Steuerung des hepatischen Fettstoffwechsels, des Knochenstoffwechsels oder der Entstehung verschiedener Krankheiten. Die teilweise gegensätzlichen Wirkungen von IL-6 werden über zwei verschiedene Rezeptoren vermittelt. Der membrangebundene IL-6-Rezeptor aktiviert die regenerativ antiinflammatorische Wirkung von IL-6, während die löslichen IL-6-Rezeptoren die proinflammatorische Wirkung vermitteln (12).

Produziert wird IL-6 von einem großen Spektrum an Zellen. Dazu gehören u. a. Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen sowie T- und B-Lymphozyten (12).

In den vergangenen Jahren ist gezeigt worden, dass eine hohe Serumkonzentration von IL-6 mit einer erhöhten Mortalitätsrate einhergeht und häufiger zu einem Multiorganversagen führt (13-15). Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse ist versucht worden, die Ausschüttung von IL-6 zu blockieren, was jedoch keinen Überlebensvorteil gezeigt hat und sogar mit einer eingeschränkten Regeneration der Leber einhergegangen ist (16). Neuere Studien zeigen, dass eine dauerhaft erhöhte Konzentration von IL-6 über die Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion zu einer Schädigung der Leber führen kann (17).

### **1.3. Endothelin-1**

ET-1 ist ein aus 26 Aminosäuren bestehendes Polypeptid und entsteht aus seiner inaktiven Vorstufe, C-Terminal-pro-Endothelin-1 (CT-proET-1). Es wird hauptsächlich in den Endothelzellen produziert und gehört zu den potentesten Vasokonstriktoren. Seine Freisetzung in der Leber wird unter physiologischen Bedingungen von aktivierten hepatischen Kupferzellen stimuliert (18). ET-1 entfaltet seine Wirkung im Bereich der Leber sowohl präsinusoidal durch

Erhöhung des Widerstands in den Portalgefäßen als auch intrasinusoidal. Über die hepatischen Ito-Zellen kommt es dabei ebenfalls zu einer Kontraktion dieser Gefäße. Seine Hauptaufgabe ist somit die Steuerung der hepatischen Mikrozirkulation, die beim Gesunden eine wichtige Rolle für den sinusoidalen Blutfluss spielt (19).

Im Falle einer Sepsis kommt es durch die generalisierte Aktivierung des Immunsystems sowie durch die damit einhergehende Schädigung der Endothelzellen zu einer unkontrollierten Freisetzung von ET-1 (20). Experimentelle Ergebnisse weisen darauf hin, dass es in der Sepsis zu einer gesteigerten Reaktivität der hepatischen Mikrozirkulation auf ET-1 kommt und dies in Kombination mit erhöhter Freisetzung von ET-1 zu einer hepatozellulären Schädigung führen kann (21).

#### **1.4. Messung der Leberfunktion**

Zur Messung einer Leberdysfunktion werden verschiedene Leberfunktionstests eingesetzt. Zu den am häufigsten eingesetzten Testverfahren gehören statische Leberfunktionstests wie die Bestimmung von Leberenzymen (Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT)), Serum-Albumin, Serum-Bilirubin, Ammoniak und Blutgerinnungsparametern (International Normalized Ratio (INR), Prothrombinzeit (PTZ)). Diese Tests sind Surrogat-Parameter für verschiedene StoffwechsellLeistungen der Leber. Während die Leberenzyme einen Hinweis auf den Leberzellzerfall geben können, weisen Blutgerinnungsparameter sowie Serum-Albumin und Ammoniak auf die Syntheseleistung der Leber hin. Mithilfe des Serum-Bilirubins kann eine Aussage über die Transportkapazität der Leber gemacht werden. Die genannten Testverfahren haben sich in verschiedenen Studien allerdings als ungenau erwiesen. Ein weiterer Nachteil ist, dass eine Quantifizierung der Leberfunktion mit diesen Parametern nicht möglich ist (4, 22-25).

In den vergangenen Jahrzehnten sind verschiedene dynamische Testverfahren zur Messung der Leberfunktion beschrieben worden. Ein Großteil dieser Verfahren beruht auf metabolischen Tests, bei denen eine Substanz oral oder intravenös verabreicht und deren Metabolit nach Verstoffwechsellung in der Leber analysiert wird. Hierzu gehört z. B. der MEGX-Test, der auf einer intravenösen Applikation von Lidocain und der Bildung des Metaboliten Monoethylglycinexylidide (MEGX) beruht (26). Ein wesentlicher Nachteil dieses Verfahren ist das Nebenwirkungsprofil von Lidocain wie Herzrhythmusstörungen und Blutdruckveränderungen (27). Andere Verfahren beruhen auf der Messung der Transportkapazität der Leber, bei der eine Substanz durch die Leber ausgeschieden, jedoch nicht verstoffwechselt wird. Zu diesen Verfahren gehört der Bromsulphophthalein-Test: Der Farbstoff Bromsulphophthalein wird intravenös injiziert

und anschließend in die Galle ausgeschieden. Ein Teil des Farbstoffs wird jedoch auch über die Niere eliminiert, was zu einer Ungenauigkeit des Ergebnisses führt (28). Neben diesen Testverfahren sind mehr als 20 verschiedene Ansätze zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Leber beschrieben worden (23, 29, 30). Mit keinem dieser Verfahren ist es jedoch gelungen, einen zusätzlichen Nutzen hinsichtlich der Genauigkeit der Leberfunktionsmessung zu erzielen. Verantwortlich hierfür sind unter anderem Faktoren wie eine lange Dauer des Testverfahrens, ein großes Nebenwirkungsspektrum, eine fehlende klinische Praktikabilität, fehlende Reproduzierbarkeit oder eine Abhängigkeit des Tests von anderen Organen (23, 29, 31).

Der einzige auch in der Klinik etablierte Test ist der Indocyaningrün-Test (ICG-Test). Gründe hierfür sind seine schnelle und einfache Durchführung, Reproduzierbarkeit und praktisch nicht vorhandene Nebenwirkungen. Das Prinzip des Tests beruht auf der Plasmaverschwinderate des intravenös applizierten Farbstoffs ICG, das von den Hepatozyten in die Gallenflüssigkeit ausgeschieden wird (32, 33). Die Validität des ICG-Tests wird jedoch erheblich von anderen Faktoren wie der hepatischen Perfusion, einer Hyperbilirubinämie oder einer akuten Cholestase beeinflusst (34).

Mit dem im Jahr 2003 in der Charité – Universitätsmedizin Berlin entwickelten Maximal Liver Function Capacity Test (LiMAX-Test) ist es möglich, die enzymatische Leberfunktion in Echtzeit präzise zu bestimmen. Der LiMAX-Test ist ein non-invasiver Atemtest, mit dem die maximale Stoffwechsellkapazität des Leberenzym Cytochrom P450, Untergruppe 1A2, nach intravenöser Injektion eines markierten Moleküls, Methacetin, bestimmt wird (35). Der LiMAX-Test ist in den vergangenen Jahren hinsichtlich seiner Aussagekraft und Verlässlichkeit bei Patienten mit Leberteilresektion, Lebertransplantation, Leberzirrhose, Lebertumoren und bei Patienten mit cholestase-assoziierten Leberdysfunktion evaluiert worden (35-40). Bei der Diagnostik der septischen Leberdysfunktion hat sich der LiMAX-Test dem ICG-Test ebenfalls als gleichwertig erwiesen. Er ist hinsichtlich der Vorhersage der Sterbewahrscheinlichkeit in dieser Patientengruppe sogar überlegen (4).

### **1.5. Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, im Rahmen einer klinisch-prospektiven Studie erstmalig den Zusammenhang zwischen der mit dem LiMAX-Test quantifizierten Leberdysfunktion und den Zytokinen ET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 bei septischen Patienten zu untersuchen. Es wird ebenfalls untersucht, in welchem Ausmaß sich der Verlauf der untersuchten Parameter zwischen Sepsis und dem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS) unterscheidet. Zusätzlich sind

die Zytokine mit dem Schweregrad der Sepsis und dem Krankheitsverlauf der Patienten korreliert worden.

## **2. Material und Methode**

Die vorliegende klinisch-prospektive Studie wurde vor Beginn von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin geprüft und genehmigt (EA2/069/11). Alle Patienten wurden vor Einschluss über das Studienvorhaben, seine Vor- und Nachteile sowie über eventuelle Nebenwirkungen ausführlich aufgeklärt und haben nach ausreichender Bedenkzeit ihr Einverständnis in schriftlicher Form erteilt. Bei nicht geschäftsfähigen Patienten wurde die Einwilligung des gesetzlichen Betreuers eingeholt. Die Therapie der Grunderkrankungen aller Studienteilnehmer wurde durch die Teilnahme an der vorliegenden Studie nicht beeinflusst.

### **2.1. Studiendesign**

#### Patientenkollektiv

Der Patienteneinschluss erfolgte im Zeitraum zwischen dem 01.10.2011 und dem 28.02.2013 auf der chirurgischen und anästhesiologischen Intensivstation der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum. Einschlusskriterium war eine Sepsis, deren Beginn nicht länger als 24 Stunden zurücklag (im Weiteren Sepsis-Gruppe genannt). Als Kontrollgruppe wurden Patienten mit einem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS) gewählt (im Weiteren SIRS-Gruppe genannt). Die Diagnosen Sepsis und SIRS wurden auf Grundlage der vom American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine im Jahr 2003 veröffentlichten Definition gestellt (41). Septische Patienten wurden hinsichtlich der im Jahr 2016 veröffentlichten neuen Sepsis-Definition erneut evaluiert, ohne dass es Unterschiede gab (1).

Für die SIRS-Gruppe wählten wir Patienten, die eine elektive große abdominal-chirurgische Operation erhalten hatten. Um einen Einfluss auf die Leberfunktion durch die Operation auszuschließen, wurden nur Patienten nach Ösophagusresektion oder Gastrektomie ohne Leberbeteiligung eingeschlossen. Die Aufnahme in die Studie erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach Durchführung der oben genannten Eingriffe. Durch die Auswahl dieser Kontrollgruppe sollte der Unterschied zwischen Sepsis und SIRS hinsichtlich der untersuchten Parameter verdeutlicht werden.

Tabelle 1 und Tabelle 2 geben einen Überblick über die Sepsis-Kriterien nach der alten und der neuen Definition. Die Ein- und Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie sind in Tabelle 3 aufgelistet.

---

**SIRS: 2 oder mehr der folgenden Kriterien**


---

Temperatur  $>38,3$  °C oder  $<36$  °C

Herzfrequenz  $>90$ /min

Atemfrequenz  $>20$ /min oder PaCO<sub>2</sub>  $<32$  mmHg

Leukozytenzahl  $>12000/\mu\text{l}$  oder  $<4000/\mu\text{l}$  oder Linksverschiebung mit  $>10$  % unreife Leukozyten

---

**Sepsis: zusätzlich zu den oben genannten Kriterien**


---

Infektion (nachgewiesen oder begründeter Verdacht)

---

**Schwere Sepsis: zusätzlich zu den oben genannten Kriterien mindestens 1 der folgenden Kriterien**


---

Systolischer Blutdruck  $<90$  mmHg oder Mittlerer arterieller Blutdruck  $<70$  mmHg

Diurese  $<0,5$  ml/kg/h

Kreatinin  $>2$  mg/dl

INR  $>1,5$

Thrombozyten  $<100\ 000/\mu\text{l}$

Hyperlaktatämie

---

**Septischer Schock: zusätzlich zu den oben genannten Kriterien folgendes Kriterium**


---

Systolischer Blutdruck  $<90$  mmHg oder Mittlerer arterieller Blutdruck  $<70$  mmHg

---

Tabelle 1. SIRS- und Sepsis-Kriterien nach der alten Definition

---

**Sepsis**


---

Vorhandensein einer Infektion

Akute Zunahme des SOFA-Scores um mindestens 2 Punkte

---

**Septischer Schock: zusätzlich zu den oben genannten Kriterien**


---

Persistierende Hypotonie

Notwendigkeit eines Vasopressors für einen mittleren arteriellen Druck von 65 mmHg

Serumlaktat-Konzentration von  $\geq 2$  mmol/l (18 mg/dl)

---

Tabelle 2. Sepsis-Kriterien nach der neuen Definition

---

**Einschlusskriterien**

---

Vorhandensein einer bakteriellen Sepsis, schweren Sepsis oder eines septischen Schocks

Alter >18 J, <80 J

---

**Ausschlusskriterien**

---

Beginn der Sepsis unbekannt oder seit länger als 24 Stunden bestehend

Bekannte Allergie gegen eine der injizierten Substanzen

Applikation von Medikamenten, die über Cytochrom P450 1A2 verstoffwechselt werden

Zytostatische Chemotherapie innerhalb von 8 Wochen vor dem Studieneinschluss

Immunsuppression (Cortison äquivalent >5 mg/d)

Fortgeschrittene Lebererkrankung (Leberzirrhose Child B/C, chronische Hepatitis)

Patienten, die bereits eine Organtransplantation erhalten haben

HIV-Infektion

Alter <18 J, >80 J

Schwangerschaft, stillende Frauen

Fehlende Einwilligung

Faktoren, die die Fähigkeit des Patienten einschränken, während der Studie zu kooperieren  
(z. B. mentale Funktion oder Drogenmissbrauch)

---

Tabelle 3. Ein- und Ausschlusskriterien

## Messungen

Nach Einschluss in die Studie wurde bei allen Patienten der Sepsis-Gruppe innerhalb der ersten 24 Stunden (Tag 0) sowie an den weiteren Tagen 2, 5 und 10 ein LiMAX-Test durchgeführt. An denselben Tagen wurden Blutentnahmen zur Bestimmung von CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 durchgeführt. Die SIRS-Gruppe erhielt diese Untersuchungen ab dem ersten postoperativen Tag (Tag 0) und an den Tagen 2 und 5, da die Patienten in der Regel am Tag 10 bereits entlassen waren. In beiden Gruppen erfolgte während der gesamten Untersuchungsperiode eine tägliche Blutentnahme zur Bestimmung der üblichen Routinelaborparameter, u. a. Procalcitonin (PCT), Serum-Bilirubin, C-reaktives Protein (CRP) und INR.

Zur Einschätzung der Krankheitsschwere wurden der APACHE-II-Score, der Sepsis-related Organ Failure Assessment Score (SOFA-Score) und der Simplified Acute Physiology Score (SAPS-II-Score) berechnet. Der APACHE-II-Score ist ein Klassifizierungssystem für die Einschätzung des Schweregrades der Krankheit der Patienten auf einer Intensivstation. Dieser wird einmalig bei Aufnahme des Patienten gemessen. Die Höhe dieses Scores korreliert mit der Krankenhausmortalität (42). Der SOFA-Score beschreibt das Ausmaß der Organdysfunktion bei kritisch-kranken Patienten. Die wiederholte Bestimmung des SOFA-Scores im zeitlichen Verlauf ermöglicht es, die Entwicklung der Krankheit besser beurteilen zu können (43, 44). Der SAPS-II-Score ist ein Klassifizierungssystem, mit dessen Hilfe der Schweregrad der Krankheit von Patienten auf einer Intensivstation sowie deren Risiko, im Rahmen ihres Aufenthaltes zu sterben, ermittelt werden kann. Der SAPS-II-Score wird täglich erhoben (45).

Am Ende der Behandlung wurden Entlassung aus dem oder Tod im Krankenhaus, die Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation und die Gesamtaufenthaltsdauer im Krankenhaus dokumentiert.

Um die Überlebensrate der Patienten auch nach ihrer Entlassung aus dem Krankenhaus zu bestimmen, wurden diese 120 Tage nach Einschluss in die Studie kontaktiert.

In Tabelle 4 sind die durchgeführten Untersuchungen bezüglich der Messtage aufgelistet.

Gruppe	Tage	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Sepsis</b>	LiMAx	✓		✓			✓					✓
	Zytokine	✓		✓			✓					✓
	Routineparameter	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	APACHE-II	✓										
	SOFA	✓		✓			✓					✓
	SAPS-II	✓		✓			✓					✓
<b>SIRS</b>	LiMAx	✓		✓			✓					
	Zytokine	✓		✓			✓					
	Routineparameter	✓	✓	✓	✓	✓	✓					
	APACHE-II	✓										
	SOFA	✓		✓			✓					
	SAPS-II	✓		✓			✓					

Tabelle 4. Zeitlicher Studienverlauf

## 2.2. Prinzip und Durchführung des LiMAx-Tests

Das Prinzip des LiMAx-Tests beruht auf der ausschließlich in der Leber stattfindenden Verstoffwechslung von Methacetin. Dieses Substrat ist mit einem nicht-radioaktiven Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$  markiert.  $^{13}\text{C}$  kommt in einem natürlichen Anteil von etwa 1,1 % aller Kohlenstoffatome vor. Unter physiologischen Bedingungen liegt  $^{13}\text{CO}_2$  in der Ausatemluft in einer etwa um den Faktor 100 niedrigeren Konzentration als  $^{12}\text{CO}_2$  vor. Durch die enzymatische Verstoffwechslung mittels des Cytochrom-P450-Isoenzym CYP1A2 entstehen aus Methacetin Paracetamol und ein  $^{13}\text{C}$ -Molekül, das letztlich als  $^{13}\text{CO}_2$  abgeatmet wird (46). Cytochrom P450 CYP1A2 ist ubiquitär in der Leber vorhanden und dessen Aktivität ist bei allen Menschen annähernd stabil. Außerdem werden nur wenige andere Medikamente über diesen Enzymkomplex abgebaut und der Test wird somit nur wenig beeinflusst (47, 48).

Zunächst wurde am liegenden Patienten im nüchternen Zustand der individuelle Basalwert berechnet (Baseline). Hierzu wurde mithilfe des Messgeräts (Fast Liver Investigation Package, FLIP, Humedics GmbH, Berlin) für etwa zehn Minuten das Verhältnis von  $^{13}\text{CO}_2$  zu  $^{12}\text{CO}_2$  in der Ausatemluft gemessen. Anschließend wurde das Substrat Methacetin (Humedics GmbH, Berlin) in einer Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht über einen stammnahen venösen Zugang als Bolus

appliziert. Durch die hepatische Metabolisierung des Testsubstrates kommt es zu einem Anstieg des ausgeatmeten  $^{13}\text{CO}_2$  (Abbildung 1). Aus der Differenz zwischen der maximalen Veränderung der  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -Ratio und der Baseline (Delta Over Baseline, DOB) wurde mithilfe der folgenden Formel der LiMAX-Wert errechnet:

$$\text{LiMAX} = \frac{\text{DOB}_{\text{max}} \cdot R_{\text{PDB}} \cdot P \cdot M}{\text{BW}}$$

( $R_{\text{PDB}}$ , „Pee Dee Belemnite Limestone“-Verhältnis [ $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}=0,011237$ ]; P,  $\text{CO}_2$ -Produktionsrate [ $300 \text{ mmol/h Körperoberfläche in m}^2$ ]; M, Molekulargewicht von  $^{13}\text{C}$ -Methacetin; BW, Körpergewicht in kg)

Der LiMAX-Wert wird in  $\mu\text{g/kg/h}$  angegeben und entspricht der maximalen Leberfunktionskapazität. Normalwerte sind als  $\text{LiMAX} > 315 \mu\text{g/kg/h}$  definiert (49, 50).

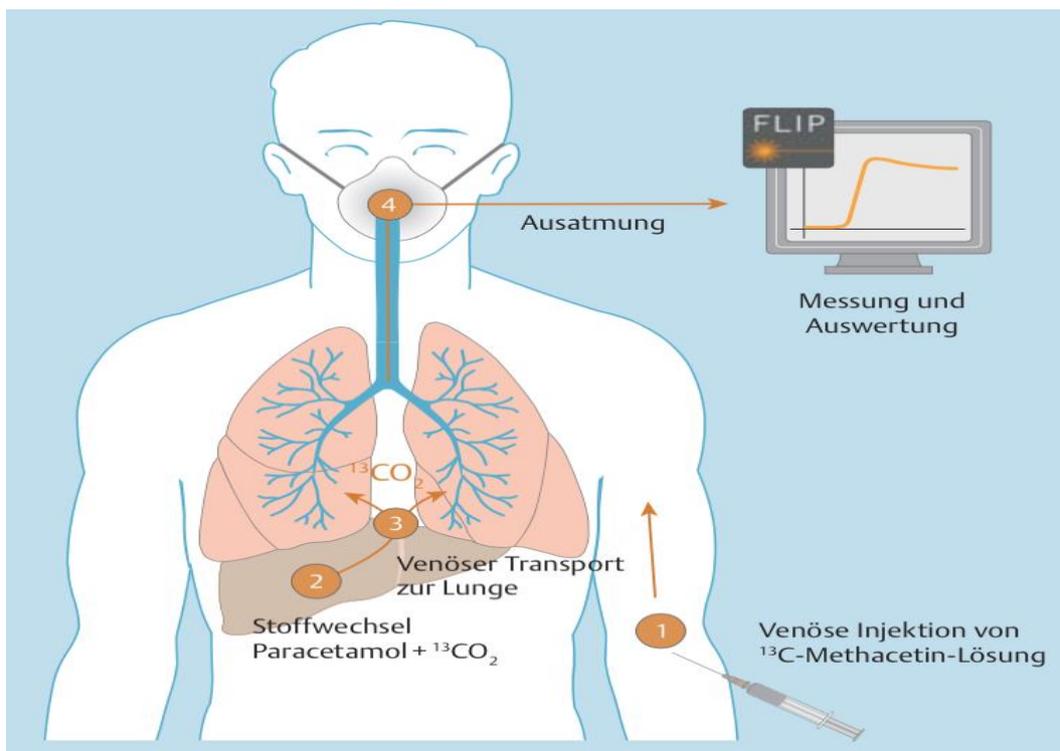


Abbildung 1. Funktionsprinzip des LiMAX-Tests (49)

### **2.3. Gewinnung und Bearbeitung der Blutproben**

Für die Bestimmung von CT-proET-1,  $\text{TNF-}\alpha$  und IL-6 wurden in Serumröhrchen (BD Vacutainer) Proben aus einem zentralen oder peripheren venösen Zugang entnommen. Diese

wurden innerhalb von 15 Minuten im gekühlten Zustand bei einer Temperatur von 4 °C mit 4000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde abpipettiert. Das Serum wurde in geeignete Reaktionsgefäße (Eppendorf Kryo-Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gefüllt und bis zum Tag der Analyse bei -80 °C gelagert. Alle Proben wurden zuvor mit einem Patienten-ID-Code versehen und anonymisiert.

Für die Bestimmung von Routineparametern wurden Blutproben entsprechend der Vorgaben des Zentrallabors in Serum-, Citrat- und EDTA-Röhrchen an das Zentrallabor der Charité – Universitätsmedizin Berlin geschickt. Die Analyse erfolgte am selben Tag.

### 2.3.1. Analyse von CT-proET-1

ET-1 verfügt über eine nur sehr geringe Halbwertszeit und ist aus diesem Grund für die Bestimmung in der klinischen Routine ungeeignet. Ein Spaltprodukt der inaktiven Vorstufe von ET-1, das CT-proET-1, ist um ein Vielfaches stabiler und zirkuliert für mehrere Stunden im Blutkreislauf. CT-proET-1 entsteht während der proteolytischen Spaltung von Pro-Endothelin-1 und entspricht der Konzentration von ET-1 (51, 52). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie CT-proET-1 für die Quantifizierung von ET-1 ausgewählt.

Die Bestimmung erfolgte im Zentrallabor der Charité durch den Einsatz eines Automated Immunofluorescent Assay (B·R·A·H·M·S CT-proET-1 KRYPTOR, Hennigsdorf, Deutschland). Das Prinzip der Bestimmung erfolgte auf Basis der TRACE-Technologie (Time Resolved Amplified Cryptate Emission). Sie beruht auf einem strahlungsfreien Energietransfer von einem Donor auf einen Akzeptor im Rahmen einer abgeschlossenen Immunreaktion.

Nach Anregung emittiert der Donor ein langlebiges Fluoreszenzsignal auf einer Wellenlänge von 620 nm. Der Akzeptor hingegen emittiert ein kurzlebigen Fluoreszenzsignal auf einer Wellenlänge von 665 nm. Sowohl der Akzeptor als auch der Donor sind jeweils an einem für CT-proET-1 spezifischen Antikörper gebunden. CT-proET-1 wird von beiden Antikörpern gebunden.

### 2.3.2. Analyse von TNF- $\alpha$ und IL-6

TNF- $\alpha$  und IL-6 wurde im eigenen Studienlabor der Charité durch den Einsatz von Human-Immunoassay-Strips bestimmt (Quantikine HS ELISA, R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, Großbritannien). Hierzu wurde die „Quantitative Sandwich Immunoassay“-Technik verwendet. Vor Beginn der Analyse wurden alle Proben sowie alle für die Analyse notwendigen Reagenzien auf Raumtemperatur (20 °C – 25 °C) gebracht. Alle Reagenzien stammten von der Firma R&D

Systems Europe, Ltd., Abingdon, Großbritannien. Aus Übersichtlichkeitsgründen wird diese Information im Folgenden nicht erneut angegeben.

### TNF- $\alpha$

Die Analyse von TNF- $\alpha$  wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

Zunächst wurden alle notwendigen Reagenzien wie folgt vorbereitet:

Herstellung einer Waschlösung: 100 ml eines Waschpuffers (Wash Buffer Concentrate, Part # 895188) wurden in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst.

Herstellung der Substratlösung: Das Substratpulver (Substrate, Part # 895884) wurde in 6 ml der Substratverdünnungslösung (Substrate Diluent, Part # 895885) gelöst und für mindestens zehn Minuten inkubiert.

Herstellung der Verstärkerlösung: Das Verstärkerpulver (Amplifier, Part # 895886) wurde in 6 ml der Verstärkerverdünnungslösung (Amplifier Diluent, Part # 895887) gelöst. Diese wurde für mindestens zehn Minuten inkubiert.

Herstellung des Standards: Das Standardpulver (TNF- $\alpha$  Standard, Part # 893154) wurde im Calibrator Diluent (Calibrator Diluent RD6-13, Part # 895491) gelöst. Die Ausgangskonzentration der so entstandenen Standardlösung betrug 32 pg/ml. Diese wurde für 15 Minuten inkubiert und durch kreisförmige Bewegungen vermischt.

Die Verdünnungsreihe wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,5 pg/ml durchgeführt. Hierzu waren sechs Röhrchen notwendig. Zunächst wurden in allen Röhrchen 500  $\mu$ L Calibrator Diluent RD6F pipettiert. Anschließend wurden nach dem Prinzip der geometrischen Verdünnungsreihe, beginnend mit der Standardlösung, 500  $\mu$ l in jedes weitere Röhrchen pipettiert. Jede Verdünnung wurde ausreichend gemischt.

Durchführung des ELISAs:

Entsprechend der Probenzahl wurden Strips in ein Halterungssystem eingelegt.

In jedes Well (Standard, Blank und Proben) wurden 100  $\mu$ l Assay Diluent (Assay Diluent RD1F, Part # 895041) pipettiert.

Entsprechend eines Belegungsprotokolls wurden jeweils 200  $\mu$ l der Proben, der Kontrolllösung und der Standardlösung in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert. Die Strips wurden mit einem Coverslip bedeckt und durch vorsichtige kreisförmige Bewegungen gemischt. Die Strips wurden anschließend für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Waschvorgang: Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Strips geöffnet und vorsichtig ausgeschlagen. Mit einer Spritzflasche wurden 400  $\mu$ l der vorbereiteten Waschlösung auf die

Wells gegeben und der Inhalt anschließend erneut ausgeschlagen. Dieser Vorgang wurde fünf Mal wiederholt (insgesamt sechs Waschvorgänge). Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Strips mit der offenen Seite nach unten sanft gegen ein trockenes Papiertuch getupft, um die restliche in den Strips befindliche Flüssigkeit herauszubefördern.

Anschließend wurden in alle Wells jeweils 200 µl eines enzymgebundenen polyklonalen Antikörpers gegen humanen TNF-α (TNF-α Conjugate, Part # 893153) hinzugegeben. Die Strips wurden mit einem Coverslip abgedeckt und für weitere zwei Stunden inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der oben beschriebene Waschvorgang wiederholt.

Anschließend wurden 50 µl der vorbereiteten Substratlösung in die Wells pipettiert und die Strips erneut im abgedeckten Zustand bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert.

50 µl der Verstärkerlösung wurden in die Wells pipettiert. Die Strips wurden mit einem neuen Coverslip abgedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden 50 µl der Stopplösung (Stop Solution, Part # 895032) hinzugegeben.

Innerhalb der nächsten 30 Minuten wurde die Extinktion mithilfe eines ELISA-Readers (FLUOSTAR OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) über eine 4-Points-Parameter-Kurve ermittelt. Anhand der Standardkurve wurde die Konzentration der Proben bestimmt.

Der hier verwendete ELISA bedient sich des Sandwich-Verfahrens mit dem zusätzlichen Schritt der Amplifizierung, welche dazu dient, geringere Konzentrationen einer Substanz valide nachzuweisen. Hierfür wird nach der Entwicklung der Antigen-Antikörperbindungsreaktion nicht sofort gestoppt, sondern die Amplifizierlösung aufgetragen. Diese bewirkt eine Verstärkung der bereits vorliegenden Bindung und führt zu einer deutlicheren Messbarkeit von Substanzen, die in geringen Konzentrationen vorliegen. Dieser ELISA wird nun für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

## IL-6

Die Analyse von IL-6 wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

Zunächst wurden alle notwendigen Reagenzien wie folgt vorbereitet:

Herstellung einer Waschlösung: 20ml eines Waschpuffers (Wash Buffer Concentrate, Part # 895003) wurden in 500ml destilliertem Wasser gelöst.

Herstellung der Substratlösung: Farbreagenz A (Color Reagent A, Part # 895000), bestehend aus stabilisiertem Wasserstoffperoxid, sowie Farbreagenz B (Color Reagent B, Part # 895001), bestehend aus Chromogen, wurden 15 Minuten vor dem Einsatz im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt.

Herstellung des Standards: Das Standardpulver (IL-6 Standard, Part # 890047) wurde im Calibrator Diluent (Calibrator Diluent RD6F, Part # 895018) gelöst. Die Ausgangskonzentration der so entstandenen Standardlösung betrug 300 pg/ml. Diese wurde für 15 Minuten inkubiert und durch kreisförmige Bewegungen vermischt.

Vorbereitung der Verdünnungsreihe: Ausgangskonzentration war 100 pg/ml. Die Verdünnungsreihe wurde bis zu einer Endkonzentration von 3,12 pg/ml durchgeführt. Hierzu waren sechs Röhrchen notwendig. Im ersten Röhrchen wurden 667 µl Calibrator Diluent (Calibrator Diluent RD6F, Part # 895018) für Serum und Plasma mit 333 µl Standardlösung vermischt. In allen anderen Röhrchen wurden 500 µL Calibrator Diluent (Calibrator Diluent RD6F, Part # 895018) pipettiert. Anschließend wurden nach dem Prinzip der geometrischen Verdünnungsreihe 500 µL pro Röhrchen pipettiert. Jede Verdünnung wurde ausreichend gemischt.

#### Durchführung des ELISAs:

Entsprechend der Probenzahl wurden Strips in ein Halterungssystem eingelegt.

In jedes Well (Standard, Blank und Proben) wurden 100 µl Assay Diluent (Assay Diluent RD1W, Part # 895117) pipettiert.

Entsprechend eines Belegungsprotokolls wurden jeweils 100 µl von Proben, Blank und Standard in die Wells pipettiert. Diese wurden anschließend mit einem Coverslip bedeckt und durch vorsichtige kreisförmige Bewegungen gemischt.

Die Wells wurden danach für zwei Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert.

Waschvorgang: Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Strips geöffnet und vorsichtig ausgeschlagen. Mit einer Spritzflasche wurden 400 µl der vorbereiteten Waschlösung auf die Wells gegeben und der Inhalt anschließend erneut ausgeschlagen. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt (insgesamt vier Waschvorgänge). Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Strips mit der offenen Seite nach unten sanft gegen ein trockenes Papiertuch getupft, um die restliche in den Strips befindliche Flüssigkeit herauszubefördern.

Anschließend wurden in alle Wells jeweils 200 µl eines enzymgebundenen polyklonalen Antikörpers gegen humanen IL-6 (IL-6 Conjugate, Part # 890046) hinzugegeben. Die Strips wurden mit einem sauberen Deckel verschlossen und für weitere zwei Stunden inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der oben beschriebene Waschvorgang wiederholt.

Danach wurden 200 µl der vorbereiteten Substratlösung aus Farbreagenz A (Color Reagent A, Part # 895000) und Farbreagenz B (Color Reagent B, Part # 895001) in die Wells pipettiert und die Strips erneut im geschlossenen Zustand bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert.

Dann wurden 50 µl der Stopplösung (Stop Solution, Part # 895032) hinzugegeben.

Innerhalb der nächsten 30 Minuten wurde die Extinktion mithilfe eines ELISA-Readers (FLUOSTAR OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) über eine 4-Points-Parameter-Kurve ermittelt. Anhand der Standardkurve wurde die Konzentration der Proben bestimmt.

#### **2.4. LiMAX-Test und Verlauf von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6 bei Sepsis und SIRS**

Der LiMAX-Test und die Verläufe der Zytokine CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 wurden in der Sepsis-Gruppe und in der SIRS-Gruppe untersucht und miteinander verglichen.

#### **2.5. Korrelation zwischen dem LiMAX-Test und den Absolutwerten von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6**

In der Sepsis-Gruppe wurden die Werte der Zytokine mit dem Ergebnis des LiMAX-Tests an den jeweiligen Tagen korreliert und in Streudiagrammen dargestellt.

#### **2.6. Korrelation zwischen der hepatischen Dysfunktion und dem Verlauf von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6**

Für die Untersuchung einer Korrelation der Zytokine mit der hepatischen Dysfunktion bei septischen Patienten wurde ein LiMAX-Wert von 100 µg/kg/h als Cut-Off-Wert ausgewählt. Unterschieden wurde zwischen Patienten, die an mindestens einem Untersuchungstag einen LiMAX-Wert von <100 µg/kg/h aufwiesen, und Patienten, die an allen Untersuchungstagen einen LiMAX-Wert von  $\geq$ 100 µg/kg/h aufwiesen. Der Verlauf der Konzentrationen von CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 wurde in beiden Untergruppen miteinander verglichen.

#### **2.7. Korrelation zwischen dem Schweregrad der Sepsis und dem Verlauf des LiMAX-Tests, CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6**

Zum Vergleich der untersuchten Parameter in Abhängigkeit des Schweregrades der Sepsis wurde ein APACHE-II-Score von 20 als Cut-Off-Wert festgelegt. Dementsprechend wurde die Sepsis-Gruppe in eine Gruppe bestehend aus Patienten mit einem APACHE-II-Score  $\geq$ 20 und in eine Gruppe bestehend aus Patienten mit einem APACHE-II-Score <20 unterteilt.

Der Verlauf der Konzentrationen von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 und des LiMAX-Tests wurde zwischen diesen beiden Untergruppen verglichen.

## **2.8. Korrelation zwischen dem Krankheitsverlauf und der Höhe von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6**

Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen den Zytokinen und dem Krankheitsverlauf gibt, wurde die Sepsis-Gruppe in zwei Untergruppen unterteilt:

- (i) Negativer Verlauf (Aufenthaltsdauer von  $\geq 30$  Tagen auf der Intensivstation oder Tod während des Klinikaufenthaltes)
- (ii) Positiver Verlauf (Aufenthaltsdauer von  $< 30$  Tage und Überleben)

Der Verlauf der Konzentrationen von CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 wurde zwischen diesen beiden Untergruppen verglichen.

## **2.9. Statistische Auswertung**

Die Daten werden als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) sowie in den Boxplots als Mediane dargestellt. Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mittels Histogrammen und Shapiro-Wilk-Test. Mittelwertvergleiche erfolgten entsprechend der Datenskalisierung und -verteilung univariat mittels Mann-Whitney-U-Test. Korrelationen wurden entsprechend der Datenskalisierung mittels Spearmans Rang-Korrelation analysiert. Zur Analyse von Häufigkeiten kategorialer Variablen wurde der Chi-Square-Test angewendet. Statistische zweiseitige P-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Die statistische Auswertung erfolgte nach Rücksprache mit dem Institut für Biometrie und Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Alle Berechnungen wurden mithilfe eines statistischen Computerprogramms (IBM SPSS Statistics, Version 25, Armonk, USA) durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

Innerhalb der 17-monatigen Rekrutierungsphase wurden sämtliche an der chirurgischen und anästhesiologischen Intensivstation der Charité, Campus Virchow-Klinikum, behandelten Patienten mit einer Sepsis (n = 185) auf einen Einschluss in die Studie hin überprüft. 157 Patienten wurden von der Teilnahme ausgeschlossen. Hauptausschlusskriterien waren bestehende Lebererkrankungen, eine vorherige Chemotherapie, ein Zustand nach Lebertransplantation, eine tägliche Kortison-Einnahme von mehr als 5 mg, eine Ablehnung der Teilnahme an der Studie und ein nicht exakt definierbarer Zeitpunkt des Beginns der Sepsis. Somit konnten 28 Patienten in die Studie aufgenommen werden.

Die häufigsten Ätiologien der Sepsis waren eine sekundäre Peritonitis (n = 15) und eine Pneumonie (n = 9). Zwei Patienten hatten eine Bypass-Prothesen-Infektion. Ein Patient hatte eine Portinfektion und ein Patient ein Unterschenkel-Gangrän. Laut der im Jahr 2016 veröffentlichten neuen Sepsis-Definition hatten 17 Patienten einen septischen Schock und elf Patienten eine Sepsis. Das Alter der Patienten betrug  $67 \pm 10$  Jahre. Insgesamt wurden 20 männliche und acht weibliche Patienten eingeschlossen. Die SIRS-Gruppe bestand aus fünf männlichen Patienten. Das Alter dieser Patienten betrug  $64 \pm 4,7$  Jahre.

Die mittlere Aufenthaltsdauer der Sepsis-Gruppe auf der Intensivstation betrug  $27 \pm 26$  Tage. Die mittlere Aufenthaltsdauer im Krankenhaus betrug  $38 \pm 30$  Tage. Sechs Patienten starben innerhalb von sieben bis 106 Tagen nach Einschluss in die Studie an den Folgen der Sepsis. Die überlebenden Patienten wurden innerhalb von neun bis 102 Tagen entlassen.

Die mittlere Aufenthaltsdauer der SIRS-Gruppe auf der Intensivstation betrug  $2 \pm 2$  Tage. Die mittlere Aufenthaltsdauer im Krankenhaus betrug  $10 \pm 4$  Tage. Alle Patienten dieser Gruppe überlebten. Tabelle 5 zeigt die Charakteristika der Sepsis- und SIRS-Gruppe am Tag der Aufnahme.

	<b>Sepsis-Gruppe (n = 28)</b>	<b>SIRS-Gruppe (n = 5)</b>	<b>P</b>
<b>Geschlecht (m/w)</b>	20/8	5/-	n. s.
<b>Alter (Jahre)</b>	67 ± 10#	64 ± 4,7	n. s.
<b>Septischer Fokus</b>			
<b>Abdomen</b>	15	-	-
<b>Lunge</b>	9	-	-
<b>Sonstige</b>	4	-	-
<b>Schweregerad [26]</b>			
<b>Sepsis</b>	2	-	-
<b>Schwere Sepsis</b>	2	-	-
<b>Septischer Schock</b>	24	-	-
<b>APACHE-II-Score</b>	26 ± 11#	13 ± 3,6	<0,027
<b>SOFA</b>	9 ± 5#	2 ± 1,8	<0,013
<b>SAPS-II</b>	52 ± 19#	25 ± 3	<0,014
<b>PCT [ng/ml]</b>	23 ± 26	0,3 ± 0,3	<0,001
<b>CRP [mg/l]</b>	162 ± 84#	75 ± 48	<0,021
<b>Leukozyten [Anzahl/nl]</b>	15 ± 14	11 ± 2	n. s.
<b>Bilirubin [mg/dl]</b>	1 ± 1	0,58 ± 0,27	n. s.
<b>INR</b>	1,5 ± 0,3#	1,2 ± 0,1	<0,023
<b>LOS-ICU [Tage]</b>	27 ± 26	2 ± 2	<0,001
<b>LOS-Hospital [Tage]</b>	38 ± 30	10 ± 4	<0,01
<b>Mortalität n (%)</b>	6 (21)	0 (0)	n. s.

Tabelle 5. Basis-Charakteristika der Sepsis- und SIRS-Gruppe: Die Daten sind, soweit in der Tabelle nicht anders bezeichnet, als MW ± SD angegeben. LOS-ICU, Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation; LOS-Hospital, Aufenthaltsdauer im Krankenhaus; #, Normalverteilung liegt vor; n. s., nicht signifikant.

### **3.1. LiMAx-Test und Verlauf von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6 bei Sepsis und SIRS**

#### LiMAx

92 % der septischen Patienten (n = 26) entwickelten an mindestens einem Tag eine hepatische Dysfunktion. Die Patienten der Sepsis-Gruppe hatten am Tag 0 einen mittleren LiMAx von  $208 \pm 130 \mu\text{g/kg/h}$ . Dieser Wert fiel bis zum Tag 2 auf  $165 \pm 93 \mu\text{g/kg/h}$  ab und stieg am Tag 5 auf  $290 \pm 190 \mu\text{g/kg/h}$  an. Am Tag 10 lag der LiMAx mit  $357 \pm 179 \mu\text{g/kg/h}$  im Normbereich ( $\geq 315 \mu\text{g/kg/h}$ ). Auch die SIRS-Gruppe hatte initial mit  $302 \pm 115 \mu\text{g/kg/h}$  eine geringfügig verminderte Leberfunktion. Diese erholte sich bis Tag 2 auf  $311 \pm 72 \mu\text{g/kg/h}$  und lag am Tag 5 mit  $355 \pm 0 \mu\text{g/kg/h}$  im Normbereich. Der Unterschied zur Sepsis-Gruppe war am Tag 2 ( $p < 0,011$ ) signifikant (Abbildung 2A).

#### CT-proET-1

Die Patienten der Sepsis-Gruppe hatten am Tag 0 eine mittlere Serumkonzentration von CT-proET-1 von  $247 \pm 143 \text{ pmol/l}$ . Am Tag 2 lag die mittlere Serumkonzentration bei  $233 \pm 144 \text{ pmol/l}$  und am Tag 5 bei  $167 \pm 90 \text{ pmol/l}$ . Am Tag 10 fiel die mittlere Serumkonzentration auf  $143 \pm 86 \text{ pmol/l}$  ab. Die SIRS-Gruppe zeigte zu allen Messzeitpunkten Werte im Normbereich. Diese lagen am Tag 0 bei  $70 \pm 32 \text{ pmol/l}$ , am Tag 2 bei  $70 \pm 30 \text{ pmol/l}$  und am Tag 5 bei  $66 \pm 30 \text{ pmol/l}$ . Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen gab es an Tag 0 ( $p < 0,001$ ), Tag 2 ( $p < 0,002$ ) und Tag 5 ( $p < 0,024$ ) (Abbildung 2B).

#### TNF- $\alpha$

Die Serumkonzentration von TNF- $\alpha$  in der Sepsis-Gruppe lag am Tag 0 bei  $11 \pm 5 \text{ pg/ml}$ , am Tag 2 bei  $8 \pm 5 \text{ pg/ml}$ , am Tag 5 bei  $6 \pm 3 \text{ pg/ml}$  und am Tag 10 bei  $6 \pm 5 \text{ pg/ml}$ . Die Serumkonzentration in der SIRS-Gruppe lag am Tag 0 bei  $2 \pm 2 \text{ pg/ml}$ , am Tag 2 bei  $2 \pm 2 \text{ pg/ml}$  und am Tag 5 bei  $3 \pm 2 \text{ pg/ml}$  und war an allen Messtagen im physiologischen Bereich. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen gab es an Tag 0 ( $p < 0,001$ ) und Tag 2 ( $p < 0,004$ ) (Abbildung 2C).

#### IL-6

Die Serumkonzentration von IL-6 lag in der Sepsis-Gruppe am Tag 0 bei  $362 \pm 144 \text{ pg/ml}$ , am Tag 2 bei  $218 \pm 165 \text{ pg/ml}$ , am Tag 5 bei  $135 \pm 142 \text{ pg/ml}$  und am Tag 10 bei  $118 \pm 135 \text{ pg/ml}$ . In der SIRS-Gruppe wurde am Tag 0 eine Serumkonzentration von  $130 \pm 160 \text{ pg/ml}$ , am Tag 2 von  $31 \pm 28 \text{ pg/ml}$  und am Tag 5 von  $61 \pm 83 \text{ pg/ml}$  gemessen. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen gab es an Tag 0 ( $p < 0,004$ ) und Tag 2 ( $p < 0,004$ ) (Abbildung 2D).

Tabelle 6 zeigt die Verläufe des LiMAx-Tests und der Zytokine in beiden Gruppen.

	<b>Zeit [Tag]</b>	<b>Sepsis</b>	<b>SIRS</b>	<b>P</b>
<b>LiMAx</b> [µg/kg/h]	0	208 ± 130	302 ± 115#	n. s.
	2	165 ± 93	311 ± 72#	<0,011
	5	290 ± 190	355	n. s.
	10	357 ± 179#	-	
<b>CT-proET-1</b> [pmol/l]	0	247 ± 143	70 ± 32#	<0,001
	2	233 ± 144	70 ± 30	<0,002
	5	167 ± 90	66 ± 30#	<0,024
	10	143 ± 86	-	
<b>TNF-α</b> [pg/ml]	0	11 ± 5	2 ± 2	<0,001
	2	8 ± 5	2 ± 2	<0,004
	5	6 ± 3	3 ± 2#	n. s.
	10	6 ± 5	-	
<b>IL-6</b> [pg/ml]	0	362 ± 144	130 ± 160	<0,004
	2	218 ± 165	31 ± 28#	<0,004
	5	135 ± 142	61 ± 83	n. s.
	10	118 ± 135	-	

Tabelle 6. Verlauf des LiMAx-Tests und der Serumkonzentration von CT-proET-1, TNF-α und IL-6 in der Sepsis- und SIRS-Gruppe: Angegeben sind MW ± SD; #, Normalverteilung liegt vor; n. s., nicht signifikant.

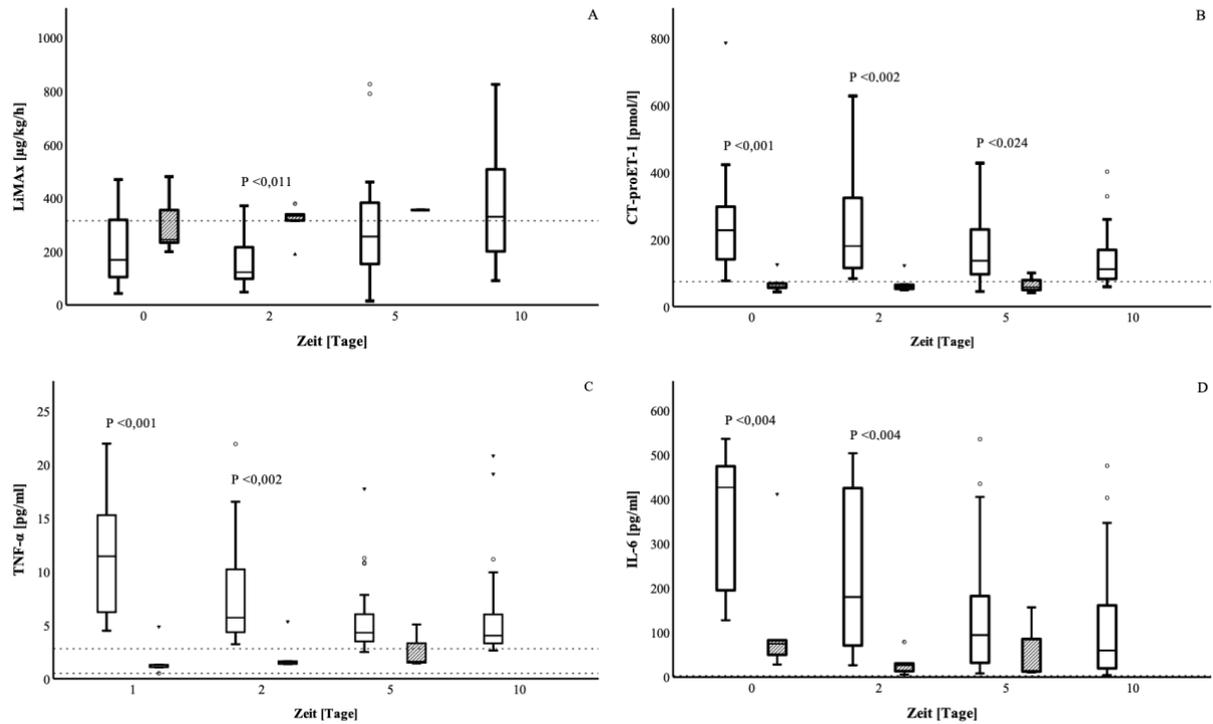


Abbildung 2. Verlauf von LiMAX, CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 in der Sepsis- und SIRS-Gruppe: (A) LiMAX, (B) CT-proET-1, (C) TNF- $\alpha$ , (D) IL-6. Boxplots mit Angabe der Mediane. Whisker sind auf das 1,5-Fache des Interquartilsabstands (IQA) beschränkt. Weiße Box: Sepsis-Gruppe, schraffierte Box: SIRS-Gruppe, weiße bzw. schraffierte Kreise: milde Ausreißer (1,5 bis 3-Fache des IQA), Dreiecke: extreme Ausreißer (>3-Fache des IQA), gestrichelte Linie: Normbereich.

### **3.2. Korrelation zwischen dem LiMAX-Test und den Absolutwerten von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6**

#### **CT-proET-1**

Am Tag 0 lag der Korrelationskoeffizient bei -0,04, am Tag 2 bei -0,44, am Tag 5 bei -0,44 und am Tag 10 bei -0,50. Die Korrelationen waren an den Tagen 2 ( $p < 0,019$ ), 5 ( $p < 0,019$ ) und 10 ( $p < 0,013$ ) signifikant (Abbildung 3).

#### **TNF- $\alpha$**

Am Tag 0 lag der Korrelationskoeffizient bei -0,23, am Tag 2 bei -0,53, am Tag 5 bei -0,35 und am Tag 10 bei -0,46. Die Korrelationen waren an den Tagen 2 ( $p < 0,004$ ) und 10 ( $p < 0,028$ ) signifikant (Abbildung 4).

#### **IL-6**

Am Tag 0 lag der Korrelationskoeffizient bei -0,34, am Tag 2 bei -0,61, am Tag 5 bei -0,55 und am Tag 10 bei -0,67. Die Korrelationen waren an den Tagen 2 ( $p < 0,001$ ), 5 ( $p < 0,004$ ) und 10 ( $p < 0,001$ ) signifikant (Abbildung 5).

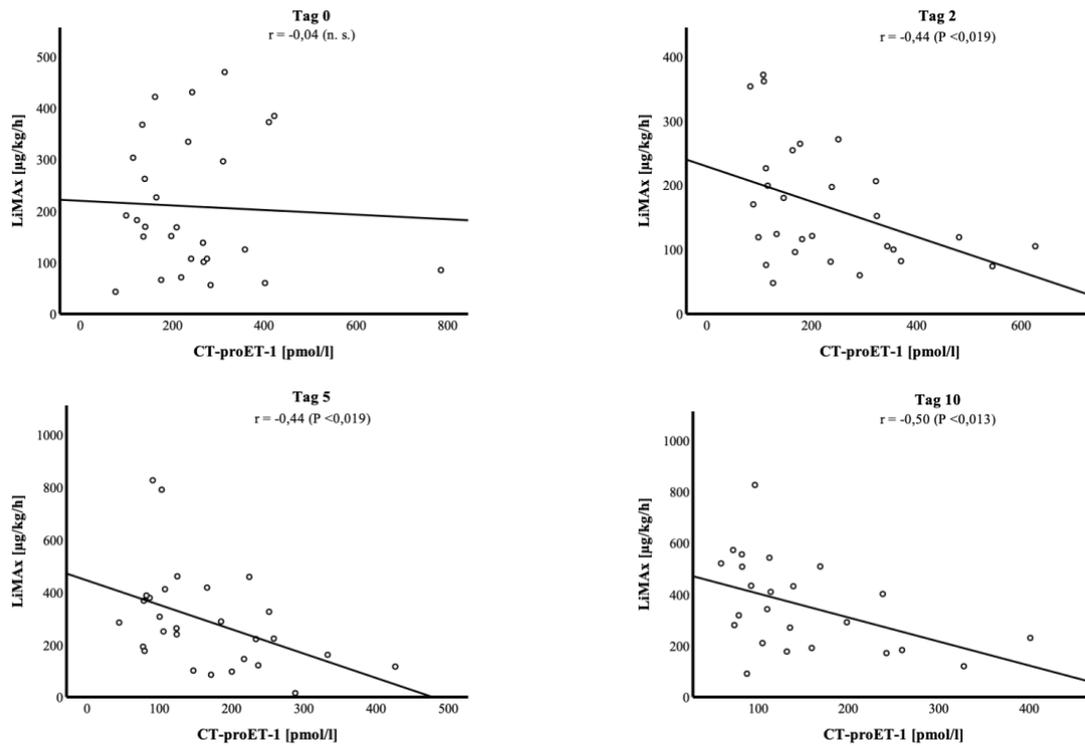


Abbildung 3. Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen CT-proET-1 und LiMAX-Test in der Sepsis-Gruppe an Tag 0, Tag 2, Tag 5 und Tag 10.  $r$ , Spearman-Korrelationskoeffizient; n. s., nicht signifikant.

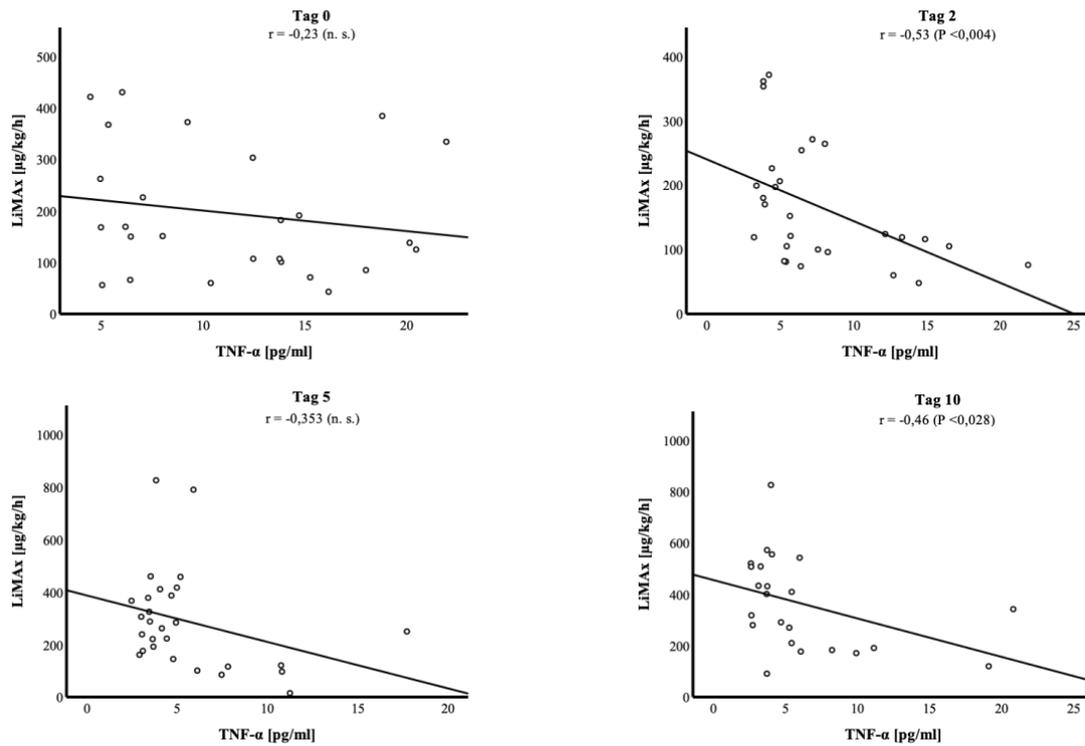


Abbildung 4. Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen TNF- $\alpha$  und LiMAX-Test in der Sepsis-Gruppe an Tag 0, Tag 2, Tag 5 und Tag 10.  $r$ , Spearman-Korrelationskoeffizient; n. s., nicht signifikant.

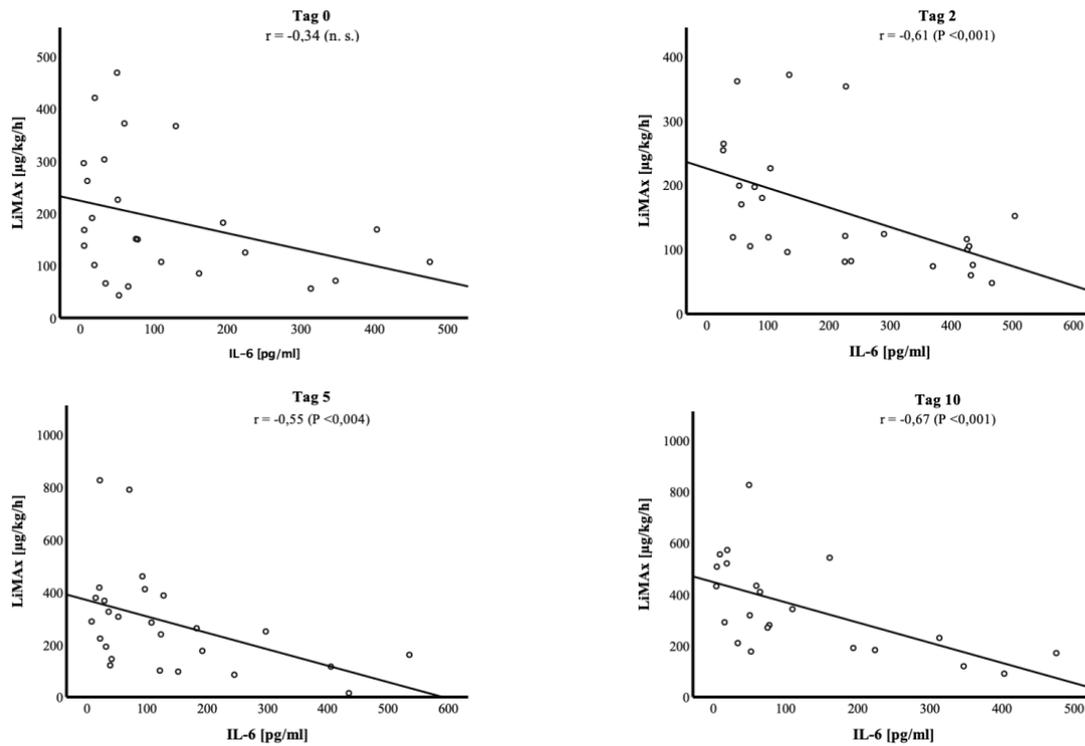


Abbildung 5. Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen IL-6 und LiMAX-Test in der Sepsis-Gruppe an Tag 0, Tag 2, Tag 5 und Tag 10.  $r$ , Spearman-Korrelationskoeffizient; n. s., nicht signifikant.

### **3.3. Korrelation zwischen der hepatischen Dysfunktion und dem Verlauf von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6**

Von den 28 Patienten der Sepsis-Gruppe hatten elf Patienten (40 %) an mindestens einem Tag einen LiMAx von  $<100 \mu\text{g/kg/h}$  (Gruppe LiMAx  $<100$ ). 17 Patienten (60%) hatten an jedem Messtag einen LiMAx von  $\geq 100 \mu\text{g/kg/h}$  (Gruppe LiMAx  $\geq 100$ ).

#### CT-proET-1

Die Serumkonzentration von CT-proET-1 lag bei Patienten der Gruppe LiMAx  $\geq 100$  an Tag 0 bei  $239 \pm 96 \text{ pmol/l}$ , an Tag 2 bei  $213 \pm 137 \text{ pmol/l}$ , an Tag 5 bei  $139 \pm 91 \text{ pmol/l}$  und an Tag 10 bei  $116 \pm 60 \text{ pmol/l}$ . Bei Patienten der Gruppe LiMAx  $<100$  lag die Serumkonzentration von CT-proET-1 an Tag 0 bei  $259 \pm 199 \text{ pmol/l}$ , an Tag 2 bei  $264 \pm 156 \text{ pmol/l}$ , an Tag 5 bei  $210 \pm 75 \text{ pmol/l}$  und an Tag 10 bei  $188 \pm 106 \text{ pmol/l}$ . Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war an den Tagen 5 ( $p < 0,011$ ) und 10 ( $p < 0,021$ ) signifikant (Abbildung 6A).

#### TNF- $\alpha$

Die Serumkonzentration von TNF- $\alpha$  lag bei Patienten der Gruppe LiMAx  $\geq 100$  an Tag 0 bei  $10 \pm 6 \text{ pg/ml}$ , an Tag 2 bei  $6 \pm 4 \text{ pg/ml}$ , an Tag 5 bei  $5 \pm 3 \text{ pg/ml}$  und an Tag 10 bei  $5 \pm 4 \text{ pg/ml}$ . Bei Patienten der Gruppe LiMAx  $<100$  lag die Serumkonzentration von TNF- $\alpha$  an Tag 0 bei  $13 \pm 5 \text{ pg/ml}$ , an Tag 2 bei  $10 \pm 5 \text{ pg/ml}$ , an Tag 5 bei  $6 \pm 3 \text{ pg/ml}$  und an Tag 10 bei  $8 \pm 5 \text{ pg/ml}$ . Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war am Tag 10 ( $p < 0,005$ ) signifikant (Abbildung 6B).

#### IL-6

Die Serumkonzentration von IL-6 lag bei Patienten der Gruppe LiMAx  $\geq 100$  an Tag 0 bei  $332 \pm 153 \text{ pg/ml}$ , an Tag 2 bei  $194 \pm 170 \text{ pg/ml}$ , an Tag 5 bei  $106 \pm 113 \text{ pg/ml}$  und an Tag 10 bei  $62 \pm 61 \text{ pg/ml}$ . Bei Patienten der Gruppe LiMAx  $<100$  lag die Serumkonzentration von IL-6 an Tag 0 bei  $403 \pm 127 \text{ pg/ml}$ , an Tag 2 bei  $251 \pm 160 \text{ pg/ml}$ , an Tag 5 bei  $174 \pm 171 \text{ pg/ml}$  und an Tag 10 bei  $188 \pm 171 \text{ pg/ml}$ . Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war zu keinem Zeitpunkt signifikant (Abbildung 6C).

Tabelle 7 zeigt die Verläufe der Zytokine in beiden Gruppen.

	<b>Zeit [Tag]</b>	<b>LiMAx &lt;100</b>	<b>LiMAx ≥100</b>	<b>p</b>
<b>CT-proET-1</b> <b>[pmol/l]</b>	0	259 ± 199	239 ± 96#	n. s.
	2	264 ± 156#	213 ± 137	n. s.
	5	210 ± 75#	139 ± 91	<0,011
	10	188 ± 106#	116 ± 60	<0,021
<b>TNF-α</b> <b>[pg/ml]</b>	0	13 ± 5#	10 ± 6	n. s.
	2	10 ± 5#	6 ± 4	n. s.
	5	6 ± 3	5 ± 3	n. s.
	10	8 ± 5	5 ± 4	<0,005
<b>IL-6</b> <b>[pg/ml]</b>	0	403 ± 127	332 ± 153	n. s.
	2	251 ± 160#	194 ± 170	n. s.
	5	174 ± 171	106 ± 113	n. s.
	10	188 ± 171#	62 ± 61	n. s.

Tabelle 7. Serumkonzentrationen von CT-proET-1, TNF-α und IL-6 bei Patienten mit LiMAx <100µg/kg/h bzw. LiMAx ≥100µg/kg/h: angegeben sind MW ± SD; #, Normalverteilung liegt vor; n. s., nicht signifikant.

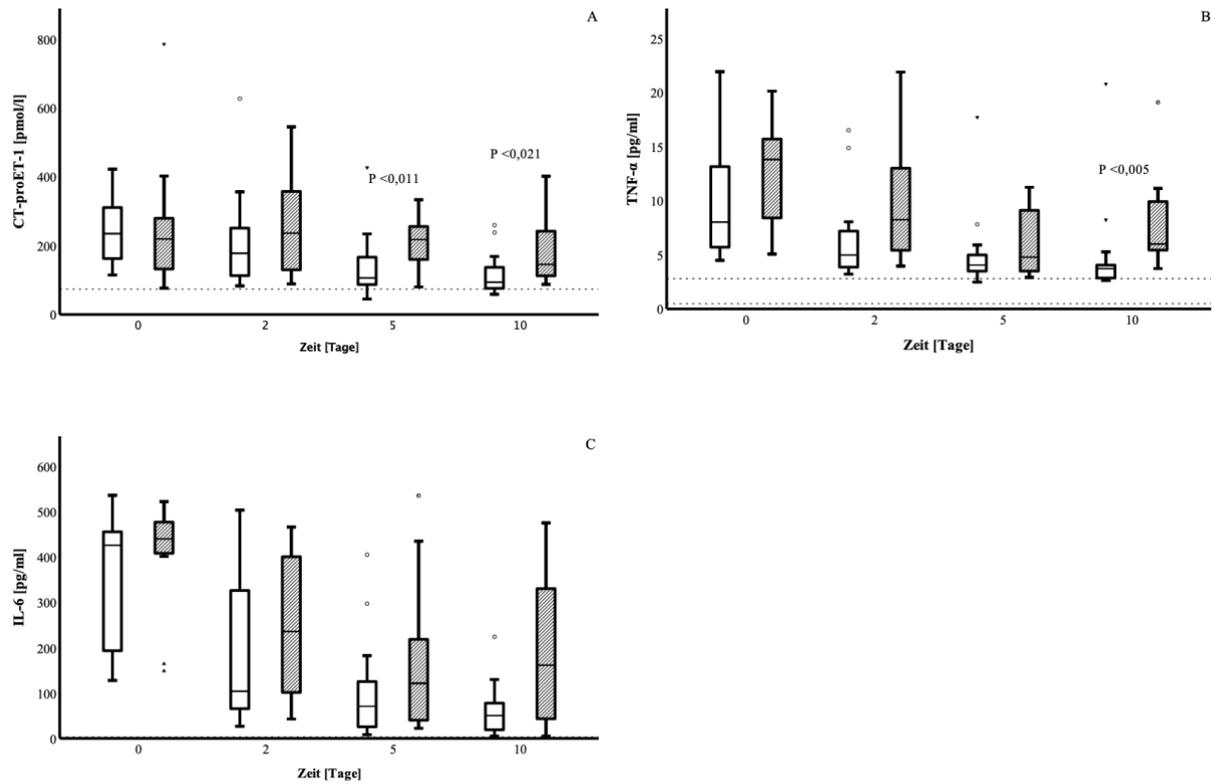


Abbildung 6. Verlauf von CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 in Abhängigkeit der hepatischen Dysfunktion in der Sepsis-Gruppe. (A) CT-proET-1, (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-6. Boxplots mit Angabe der Mediane. Whisker sind auf das 1,5-Fache des IQA beschränkt. Weiße Box: LiMAX  $\geq 100$   $\mu\text{g}/\text{h}/\text{kg}$ , schraffierte Box: LiMAX  $< 100$   $\mu\text{g}/\text{h}/\text{kg}$ , weiße bzw. schraffierte Kreise: milde Ausreißer (1,5 bis 3-Fache des IQA), Dreiecke: extreme Ausreißer ( $> 3$ -Fache des IQA), gestrichelte Linien: Normbereich.

### **3.4. Korrelation zwischen dem Schweregrad der Sepsis und dem Verlauf des LiMAx-Tests, CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6**

Von den 28 Patienten der Sepsis-Gruppe wurde bei 20 Patienten (72 %) ein APACHE-II-Score von  $\geq 20$  ermittelt. Acht Patienten (28 %) hatten einen Score von  $< 20$ .

#### **LiMAx**

Der LiMAx lag bei Patienten mit einem APACHE-II-Score  $\geq 20$  an Tag 0 bei  $193 \pm 138$   $\mu\text{g/kg/h}$ , an Tag 2 bei  $134 \pm 78$   $\mu\text{g/kg/h}$ , an Tag 5 bei  $246 \pm 180$   $\mu\text{g/kg/h}$  und an Tag 10 bei  $324 \pm 191$   $\mu\text{g/kg/h}$ . Bei Patienten mit einem APACHE-II-Score von  $< 20$  lag der LiMAx an Tag 0 bei  $222 \pm 107$   $\mu\text{g/kg/h}$ , an Tag 2 bei  $227 \pm 96$   $\mu\text{g/kg/h}$ , an Tag 5 bei  $400 \pm 189$   $\mu\text{g/kg/h}$  und an Tag 10 bei  $427 \pm 128$   $\mu\text{g/kg/h}$ . Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war an den Tagen 2 ( $p < 0,017$ ) und 5 ( $p < 0,023$ ) signifikant (Abbildung 7A).

#### **CT-proET-1**

Die Serumkonzentration von CT-proET-1 lag bei Patienten mit einem APACHE-II-Score  $\geq 20$  an Tag 0 bei  $256 \pm 160$  pmol/l, an Tag 2 bei  $254 \pm 158$  pmol/l, an Tag 5 bei  $190 \pm 96$  pmol/l und an Tag 10 bei  $150 \pm 75$  pmol/l. Bei Patienten mit einem APACHE-II-Score von  $< 20$  lag die Serumkonzentration von CT-proET-1 an Tag 0 bei  $203 \pm 75$  pmol/l, an Tag 2 bei  $180 \pm 107$  pmol/l, an Tag 5 bei  $104 \pm 36$  pmol/l und an Tag 10 bei  $126 \pm 114$  pmol/l. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war an Tag 5 ( $p < 0,01$ ) signifikant (Abbildung 7B).

#### **TNF- $\alpha$**

Die Serumkonzentration von TNF- $\alpha$  lag bei Patienten mit einem APACHE-II-Score  $\geq 20$  an Tag 0 bei  $12 \pm 5$  pg/ml, an Tag 2 bei  $9 \pm 5$  pg/ml, an Tag 5 bei  $6 \pm 3$  pg/ml und an Tag 10 bei  $7 \pm 5$  pg/ml. Bei Patienten mit einem APACHE-II-Score von  $< 20$  lag die Serumkonzentration von TNF- $\alpha$  an Tag 0 bei  $8 \pm 3$  pg/ml, an Tag 2 bei  $5 \pm 1$  pg/ml, an Tag 5 bei  $4 \pm 1$  pg/ml und an Tag 10 bei  $3 \pm 1$  pg/ml. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war an Tag 0 ( $p < 0,035$ ), an Tag 2 ( $p < 0,015$ ), an Tag 5 ( $p < 0,01$ ) sowie an Tag 10 ( $p < 0,009$ ) signifikant (Abbildung 7C).

#### **IL-6**

Die Serumkonzentration von IL-6 lag bei Patienten mit einem APACHE-II-Score  $\geq 20$  an Tag 0 bei  $380 \pm 138$  pg/ml, an Tag 2 bei  $243 \pm 165$  pg/ml, an Tag 5 bei  $173 \pm 154$  pg/ml und an Tag 10 bei  $140 \pm 144$  pg/ml. Bei Patienten mit einem APACHE-II-Score von  $< 20$  lag die Serumkonzentration von IL-6 an Tag 0 bei  $321 \pm 159$  pg/ml, an Tag 2 bei  $161 \pm 160$  pg/ml, an

Tag 5 bei  $47 \pm 42$  pg/ml und an Tag 10 bei  $70 \pm 106$  pg/ml. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war an Tag 5 ( $p < 0,011$ ) signifikant (Abbildung 7D).

Tabelle 8 zeigt die Verläufe des LiMAx-Tests und der Zytokine in beiden Gruppen.

	<b>Zeit [Tag]</b>	<b>APACHE <math>\geq 20</math></b>	<b>APACHE <math>&lt; 20</math></b>	<b>P</b>
<b>LiMAx</b> [ $\mu\text{g/kg/h}$ ]	0	$193 \pm 138$	$222 \pm 107\#$	n. s.
	2	$134 \pm 78$	$227 \pm 96\#$	$< 0,017$
	5	$246 \pm 180$	$400 \pm 189$	$< 0,023$
	10	$324 \pm 191\#$	$427 \pm 128\#$	n. s.
<b>CT-proET-1</b> [pmol/l]	0	$256 \pm 160$	$203 \pm 75\#$	n. s.
	2	$254 \pm 158$	$180 \pm 107$	n. s.
	5	$190 \pm 96\#$	$104 \pm 36$	$< 0,01$
	10	$150 \pm 75$	$126 \pm 114$	n. s.
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> [pg/ml]	0	$12 \pm 5\#$	$8 \pm 3$	$< 0,035$
	2	$9 \pm 5$	$5 \pm 1\#$	$< 0,015$
	5	$6 \pm 3$	$4 \pm 1\#$	$< 0,01$
	10	$7 \pm 5$	$3 \pm 1$	$< 0,009$
<b>IL-6</b> [pg/ml]	0	$380 \pm 138$	$321 \pm 159\#$	n. s.
	2	$243 \pm 165$	$161 \pm 160$	n. s.
	5	$173 \pm 154$	$47 \pm 42\#$	$< 0,011$
	10	$140 \pm 144$	$70 \pm 106$	n. s.

Tabelle 8. LiMAx-Test, CT-proET-1, TNF-  $\alpha$  und IL-6 in Abhängigkeit des Schweregrades der Sepsis: Angegeben sind MW  $\pm$  SD; #, Normalverteilung liegt vor; n. s., nicht signifikant.

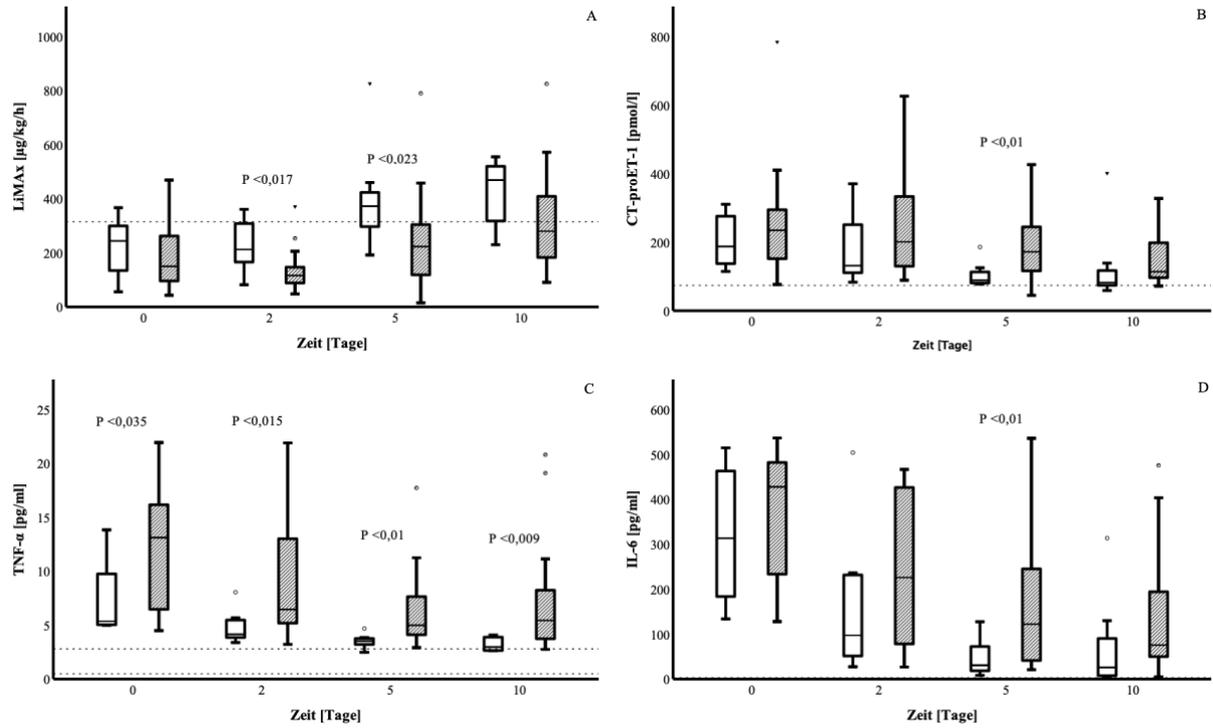


Abbildung 7. Verlauf von LiMAX, CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 in Abhängigkeit des Schweregrades der Sepsis, definiert durch den APACHE-II-score. (A) LiMAX, (B) CT-proET-1, (C) TNF- $\alpha$ , (D) IL-6. Boxplots mit Angabe der Mediane. Whisker sind auf das 1,5-Fache des IQA beschränkt. Weiße Box: APACHE-II-score <20, schraffierte Box: APACHE-II-score  $\geq 20$ , weiße bzw. schraffierte Kreise: milde Ausreißer (1,5 bis 3-Fache des IQA), Dreiecke: extreme Ausreißer (>3-Fache des IQA), gestrichelte Linie: Normbereich.

### **3.5. Korrelation zwischen dem Krankheitsverlauf und der Höhe von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6**

Von den 28 Patienten der Sepsis-Gruppe hatten 14 Patienten (50 %) einen negativen Verlauf. Von diesen 14 Patienten sind sechs Patienten während ihres Klinikaufenthaltes gestorben. 14 Patienten (50 %) hatten einen positiven Verlauf.

#### **CT-proET-1**

Die Serumkonzentration von CT-proET-1 lag bei Patienten mit einem positiven Verlauf an Tag 0 bei  $217 \pm 85$  pmol/l, an Tag 2 bei  $182 \pm 93$  pmol/l, an Tag 5 bei  $115 \pm 48$  pmol/l und an Tag 10 bei  $101 \pm 47$  pmol/l. Bei Patienten mit einem negativen Verlauf lag die Serumkonzentration von CT-proET-1 an Tag 0 bei  $277 \pm 182$  pmol/l, an Tag 2 bei  $283 \pm 171$  pmol/l, an Tag 5 bei  $220 \pm 93$  pmol/l und an Tag 10 bei  $186 \pm 97$  pmol/l. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war an den Tagen 5 ( $p < 0,002$ ) und 10 ( $p < 0,002$ ) signifikant (Abbildung 8A).

#### **TNF- $\alpha$**

Die Serumkonzentration von TNF- $\alpha$  lag bei Patienten mit einem positiven Verlauf an Tag 0 bei  $9 \pm 5$  pg/ml, an Tag 2 bei  $5 \pm 1$  pg/ml, an Tag 5 bei  $4 \pm 1$  pg/ml und an Tag 10 bei  $3 \pm 1$  pg/ml. Bei Patienten mit einem negativen Verlauf lag die Serumkonzentration von TNF- $\alpha$  an Tag 0 bei  $14 \pm 5$  pg/ml, an Tag 2 bei  $11 \pm 5$  pg/ml, an Tag 5 bei  $7 \pm 4$  pg/ml und an Tag 10 bei  $9 \pm 6$  pg/ml. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war an den Tagen 0 ( $p < 0,021$ ), 2 ( $p < 0,002$ ) und 10 ( $p < 0,001$ ) signifikant (Abbildung 8B).

#### **IL-6**

Die Serumkonzentration von IL-6 lag bei Patienten mit einem positiven Verlauf an Tag 0 bei  $317 \pm 159$  pg/ml, an Tag 2 bei  $157 \pm 151$  pg/ml, an Tag 5 bei  $68 \pm 55$  pg/ml und an Tag 10 bei  $44 \pm 37$  pg/ml. Bei Patienten mit einem negativen Verlauf lag die Serumkonzentration von IL-6 an Tag 0 bei  $407 \pm 116$  pg/ml, an Tag 2 bei  $278 \pm 161$  pg/ml, an Tag 5 bei  $201 \pm 171$  pg/ml und an Tag 10 bei  $185 \pm 156$  pg/ml. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war an den Tagen 5 ( $p < 0,02$ ) und 10 ( $p < 0,017$ ) signifikant (Abbildung 8C).

Tabelle 9 zeigt die Verläufe der Zytokine in beiden Gruppen.

	<b>Zeit [Tag]</b>	<b>Negativer Verlauf</b>	<b>Positiver Verlauf</b>	<b>P</b>
<b>CT-proET-1</b> <b>[pmol/l]</b>	0	277 ± 182	217 ± 85#	n. s.
	2	283 ± 171#	182 ± 93	n. s.
	5	220 ± 93#	115 ± 48#	<0,002
	10	186 ± 97#	101 ± 47	<0,002
<b>TNF-α</b> <b>[pg/ml]</b>	0	14 ± 5#	9 ± 5	<0,021
	2	11 ± 5#	5 ± 1#	<0,002
	5	7 ± 4	4 ± 1#	n. s.
	10	9 ± 6	3 ± 1#	<0,001
<b>IL-6</b> <b>[pg/ml]</b>	0	407 ± 116	317 ± 159	n. s.
	2	278 ± 161#	157 ± 151	n. s.
	5	201 ± 171#	68 ± 55#	<0,02
	10	185 ± 156#	44 ± 37#	<0,017

Tabelle 9. Serumkonzentrationen von CT-proET-1, TNF-α und IL-6 bei Patienten mit negativem bzw. positivem Verlauf: Angegeben sind MW ± SD; #, Normalverteilung liegt vor; n. s., nicht signifikant.

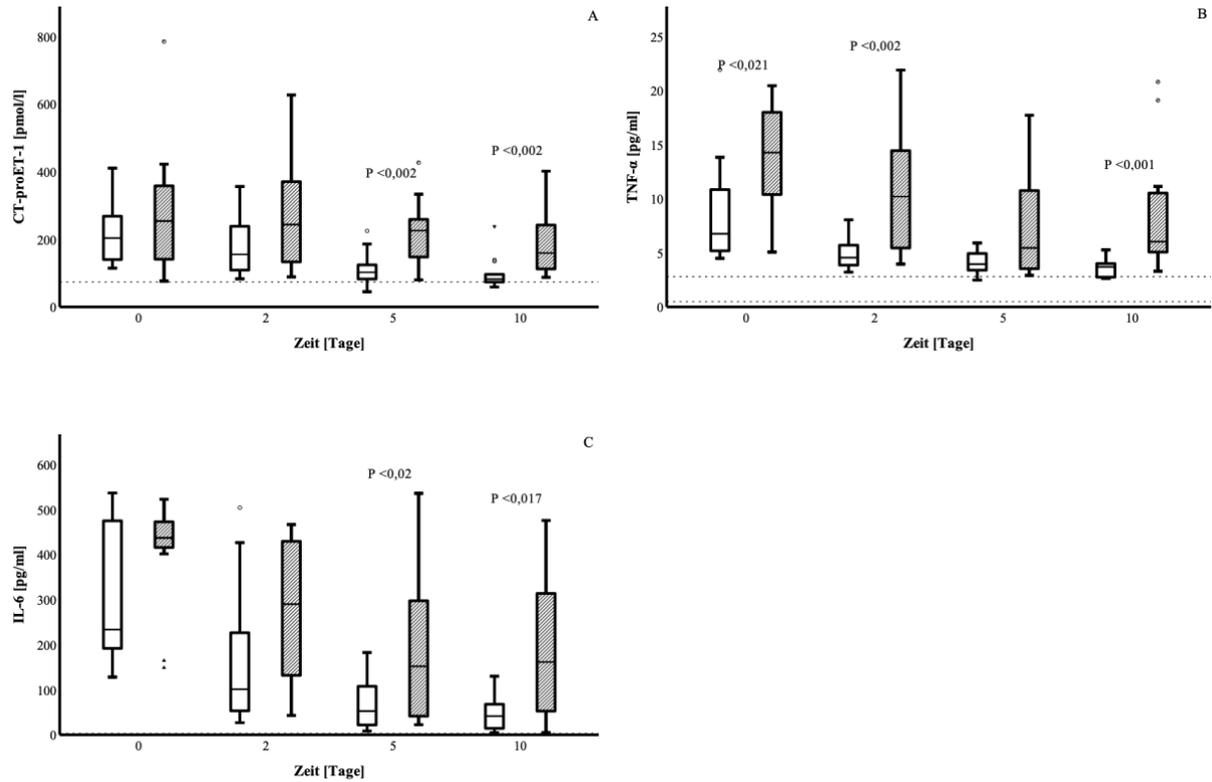


Abbildung 8. Verlauf von CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf. (A) CT-proET-1, (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-6. Boxplots mit Angabe der Mediane. Whisker sind auf das 1,5-Fache des IQA beschränkt. Weiße Box: positiver Verlauf, schraffierte Box: negativer Verlauf, weiße bzw. schraffierte Kreise: milde Ausreißer (1,5 bis 3-Fache des IQA), Dreiecke: extreme Ausreißer (>3-Fache des IQA), gestrichelte Linie: Normbereich.

#### **4. Diskussion**

Ziel dieser Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen den inflammatorischen Zytokinen ET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 und dem Ausmaß einer Leberdysfunktion bei septischen Patienten zu untersuchen. Dafür sind die LiMAx-Werte mit den korrespondierenden Zytokinspiegeln korreliert worden. Ein LiMAx-Wert  $<100 \mu\text{g/kg/h}$  bei septischen Patienten ist ein valider Parameter für einen schlechten Verlauf (4). Deshalb sind die Patienten in Gruppen unterteilt und die Verläufe der Zytokine untersucht worden. Auch das Ausmaß der Sepsis, definiert durch den APACHE-II-Score, wird dabei berücksichtigt, indem die Zytokinverläufe und der LiMAx-Test bei einem APACHE-II-Score  $\geq 20$  einerseits und  $< 20$  andererseits gemessen worden sind. Zuletzt ist der Zusammenhang zwischen dem Krankheitsverlauf und der Höhe der Zytokinspiegel untersucht worden. Als Kontrollgruppe sind Patienten nach großen abdominalchirurgischen Operationen ohne Leberbeteiligung herangezogen worden, bei denen ein postoperatives SIRS hat vermutet werden können. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen im Einzelnen diskutiert.

##### **4.1. LiMAx-Test und Verlauf von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6 bei Sepsis und SIRS**

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass 90 % der septischen Patienten in den ersten 24 Stunden nach Sepsisbeginn eine Leberdysfunktion entwickeln. Der Nadir der Leberfunktion ist nach 48 Stunden erreicht. Die Inzidenz der hepatischen Dysfunktion im Rahmen einer Sepsis wird in der Literatur geringer angegeben. Ein Grund ist, dass in diesen Studien die Leberfunktion mittels statischer (biochemischer) Laborparameter wie Bilirubin, Transaminasen, Gerinnungsparameter, Albumin und LDH gemessen worden ist. In der vorliegenden Studie wird erstmalig bei septischen Patienten ein dynamischer Test, der LiMAx-Test, verwendet, welcher die maximale Leberfunktionskapazität zum Zeitpunkt der Durchführung misst (35). In einem Review von Nesseler et al. wird die Inzidenz für die hepatische Dysfunktion bei Sepsis je nach Studiendesign mit 20 bis 50 % angegeben (53). In den meisten der in diesem Review analysierten Studien wird zur Beurteilung der Leberfunktion die Höhe eines oder mehrerer der oben genannten biochemischen Parameter untersucht. Kobashi et al. stellen in einer retrospektiven Analyse bei 58 % von 400 septischen Patienten eine Leberdysfunktion innerhalb von einem Tag nach Aufnahme auf die Intensivstation fest (54). Als Leberdysfunktion haben die Autoren eine Erhöhung von mindestens einem der folgenden Parameter definiert: Bilirubin, AST, ALT oder GGT.

Es ist bekannt, dass die statischen Leberfunktionstests die aktuelle Leberfunktion nicht ausreichend genau darstellen können. So befinden sich beispielsweise die statischen Parameter im

frühen Zirrhose-Stadium Child-Turcotte-Pugh A typischerweise im Normbereich (25). Die Transaminasen ALT und AST können zwar bei der Unterscheidung zwischen chronischem und akutem Leberschaden nützlich sein, sie korrelieren jedoch nicht mit dem Ausmaß des Leberschadens. Eine Normalisierung der Aktivität von ALT und AST im Serum kann ein Hinweis sowohl auf eine Leberzellregeneration als auch auf eine Leberzellnekrose sein (55). Brun-Buisson et al. haben durch die Berechnung des SOFA-Scores bei 541 septischen Patienten eine Inzidenz von 46 % bezüglich einer hepatischen Dysfunktion (Leber-Score >0) festgestellt (56). Für die Beurteilung der Leberfunktion innerhalb des SOFA-Scores wird nur das Serum-Bilirubin verwendet (44). Das führt zu einer Ungenauigkeit, weil nicht jede Schädigung der Leber zwingend mit einer Erhöhung des Serum-Bilirubins einhergehen muss (25). Des Weiteren ändert sich die Höhe des Bilirubins je nach Ausmaß der Leberschädigung mit einer zeitlichen Latenz von mehreren Stunden bis mehreren Tagen, wodurch die Bestimmung der aktuellen Leberfunktion zusätzlich erschwert wird (35). Dies kann dazu führen, dass die tatsächliche Anzahl der septischen Patienten mit einer Leberdysfunktion nicht detektiert und eine falsche niedrige Inzidenz errechnet wird. Lock et al. haben den LiMax-Test mit dem ICG-Test sowie anderen klinischen Laborparametern wie AST, ALT, Bilirubin, Ammoniak, Albumin, PTZ, INR hinsichtlich seiner diagnostischen und prognostischen Aussagekraft bei der Messung der initialen Transplantatfunktion bei Patienten nach einer Lebertransplantation (57) verglichen. Der LiMax-Test zeigt sich im Gegensatz zu anderen Testverfahren dabei als ein verlässlicher und genauer Test zur Identifizierung der Patienten mit einer eingeschränkten Transplantatfunktion. In der vorliegenden Studie hat sich der LiMax-Test ebenfalls als eine verlässliche Methode gezeigt, um eine frühzeitige Leberdysfunktion bei septischen Patienten zu detektieren und zu quantifizieren. Erstmals wird gezeigt, dass der Anteil der septischen Patienten, die eine frühe Funktionsstörung der Leber erleiden, höher sein kann als bis jetzt bekannt. Dies verdeutlicht einerseits die Anfälligkeit der Leber für eine Sepsis, andererseits bedeutet es, dass der Einsatz des LiMax-Tests bei der rechtzeitigen Erkennung dieser Krankheit hilfreich sein könnte. Sepsis ist grundsätzlich ein Notfall und bedarf schnellstmöglich einer Einleitung der adäquaten Therapie (58). Bei jeder akuten Organdysfunktion ist eine Sepsis als Differentialdiagnose in Betracht zu ziehen. Obwohl laut der aktuellen Sepsis-Definition Bilirubin im Rahmen der Berechnung des SOFA-Scores als einziger Leberfunktionsparameter vorgeschlagen wird, könnte der LiMax-Test bereits zu einem früheren Zeitpunkt einen wichtigen Hinweis auf eine beginnende Sepsis geben.

Die Serum-Spiegel von CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 ist in der Sepsis-Gruppe initial deutlich erhöht gewesen und im Laufe der darauffolgenden Tage kontinuierlich abgefallen. Die Werte sind

jedoch bis Tag 10 weiterhin oberhalb des Normbereichs geblieben. Es existieren verschiedene Studien, in denen ebenfalls erhöhte Spiegel dieser Zytokine bei Sepsis beschrieben werden (10, 20, 59-61). So haben Schuetz et al. im Rahmen einer klinisch-prospektiven Studie gezeigt, dass es innerhalb von 24 Stunden nach Beginn der Sepsis zu einer signifikanten Erhöhung von ET-1 kommt (20). Ein ähnliches Ergebnis haben Wang et al. im Rahmen einer experimentellen Studie mit septischen Ratten gezeigt. Sie haben beobachtet, dass es bereits eine Stunde nach Induktion einer Peritonitis zu einer vermehrten Genexpression von TNF- $\alpha$  und IL-6 mit konsekutiver Spiegelerhöhung im Serum kommt (10).

Um die hohen Serum-Spiegel dieser Zytokine zu erklären, muss auf die besondere Rolle der Leber bei der Beseitigung von Krankheitserregern und deren Bestandteilen hingewiesen werden.

Die Leber beherbergt einen Großteil der Makrophagen. Diese machen etwa 80 % des gesamten retikuloendothelialen Systems des Körpers aus (62). Zusammen mit den Hepatozyten sind die leberspezifischen Makrophagen, die Kupferzellen, für die Beseitigung eines Großteils der Bakterien und ihrer Bestandteile aus dem systemischen Kreislauf verantwortlich (53). Injiziert man Bakterien intravenös in Ratten, so werden innerhalb weniger Minuten über 60 % der Bakterien in den Kupferzellen wiedergefunden (63). Durch die Phagozytose der Bakterien bzw. ihrer Bestandteile wie der Lipopolysaccharide (LPS) kommt es über den Weg mehrerer komplexer Mechanismen zur Aktivierung dieser Zellen. Das führt zur erhöhten Genexpression und Produktion einer großen Anzahl von Mediatoren wie der proinflammatorischen Zytokine, Stickstoffmonoxid, reaktiven Sauerstoffprodukten sowie Eicosanoiden. Diese sind für eine angemessene Immunreaktion und Verteidigung des Organismus gegenüber Krankheitserregern unerlässlich (53). Zu den proinflammatorischen Zytokinen gehören TNF- $\alpha$  und IL-6. Über die Aktivierung der Kupferzellen und sinusoidalen Endothelzellen kommt es ebenfalls zu einer enormen Freisetzung von ET-1 (64). Obwohl die Kupferzellen und die Hepatozyten im gesunden Menschen regelmäßig bakteriellen Bestandteilen aus den Portalgefäßen ausgesetzt sind, ist die Expression der Gene der proinflammatorischen Zytokine in diesen Zellen kaum nachweisbar. Eine Überflutung dieser Zellen mit Endotoxinen führt jedoch zu einer hochgradigen Expression der genannten Gene und zur Freisetzung ihrer Produkte (65).

In der vorliegenden Studie kann ein kontinuierlicher Abfall von CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 im Verlauf beobachtet werden. Das kann sowohl auf eine erfolgreiche Therapie der Sepsis zurückgeführt werden als auch auf die im Verlauf der Sepsis stattfindende körpereigene Immunsuppression. Ziel des Letztgenannten ist es, die Balance zwischen der pro- und antiinflammatorischen immunologischen Reaktion wiederherzustellen. In Studien mit Injektion von Endotoxinen in Menschen ist es etwa zwei Stunden nach dem Anstieg der Serumspiegel

proinflammatorischer Zytokine zu einem reaktiven Anstieg des antiinflammatorischen Interleukin-10 (IL-10) (65) gekommen. Neben IL-10 kommt es außerdem zu einer vermehrten Ausschüttung weiterer antiinflammatorischer Mediatoren wie Interleukin-4, Interleukin-13, Transforming-Growth-Factor- $\beta$ , Glucocorticoide und Prostaglandin-E<sub>2</sub>. Der Anstieg der antiinflammatorisch wirkenden Substanzen führt in der Folge zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und letztlich zu ihrer Neutralisation durch lösliche Rezeptoren (65). Eine zu starke antiinflammatorische Gegenregulierung des Körpers kann jedoch auch zu einer vollständigen Immunparalyse führen, die eine erfolgreiche antimikrobielle Therapie erheblich erschweren kann. Der kontinuierliche Abfall von CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 in dieser Studie steht im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten und könnte in Zukunft zur Etablierung von Methoden beitragen, mit deren Hilfe eine bessere Überwachung des Fortschreitens dieser Erkrankung und des Erfolgs der durchgeführten Behandlung ermöglicht werden kann.

Hinsichtlich des Verlaufs der Serumspiegel der Zytokine und der Leberfunktion zeigt sich in der vorliegenden Studie eine deutliche Verzögerung des Abfalls der Zytokine verglichen mit dem LiMAX-Test. Nachdem sich die Leberfunktion bis zu Tag 10 weitestgehend normalisiert hat, liegen die Spiegel der Zytokine noch oberhalb des Normbereichs. Daraus könnte geschlossen werden, dass insbesondere eine massive Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine zu einer Leberdysfunktion führt. Auf diese Zusammenhänge wird in den Kapiteln 4.2. und 4.3. im Detail eingegangen.

Um den Einfluss der Sepsis besser darstellen zu können, sind als Kontrollgruppe Patienten, die nach ausgedehnten chirurgischen Eingriffen im oberen Gastrointestinaltrakt ein SIRS entwickelt haben, untersucht worden. SIRS ist eine immunologische Reaktion des Körpers auf einen äußeren oder inneren Reiz. Sie ist grundsätzlich vergleichbar mit der Reaktion des Körpers bei einer Sepsis. Der entscheidende Unterschied ist, dass die Ursache nicht eine Infektion ist, sondern wie im vorliegenden Fall eine ausgedehnte abdominelle Operation. Interessanterweise zeigt der LiMAX-Test bei den SIRS-Patienten nur an Tag 2 einen geringfügigen Abfall unterhalb des Normbereiches. An Tag 5 liegt der LiMAX wieder im Normbereich. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der prospektiven Studie von Wiezer et al. Die Autoren haben bei Patienten nach einer großen abdominellen Operation keinen Hinweis auf eine Leberzellschädigung festgestellt (66). Auch die Serumspiegel von CT-proET-1 und TNF- $\alpha$  lagen in der vorliegenden Studie bei den SIRS-Patienten an allen Messtagen im Mittel im Normbereich. Dies unterstreicht wiederum die Annahme, dass das Ausmaß der Leberdysfunktion mit der Höhe der proinflammatorischen Zytokine korreliert. Diese Zusammenhänge sind schon in anderen Untersuchungen hergestellt

worden (67). Die Autoren, die eine Erhöhung von CT-proET-1 nach großen Operationen festgestellt haben, führen dies auf eine Verletzung größerer Gefäßen zurück (68). TNF- $\alpha$  ist in verschiedenen Studien untersucht worden. Bei Patienten mit einem Trauma ist darin keine signifikante Erhöhung beobachtet worden (69).

IL-6 ist in der vorliegenden Studie als einziges Zytokin auch bei SIRS-Patienten erhöht. Frühere Studien haben bereits einen Zusammenhang zwischen IL-6 und den SIRS-Scores bei Patienten nach ausgedehnten Operationen feststellen können. IL-6 ist postoperativ regelmäßig erhöht gewesen und hat mit dem Ausmaß des operativen Eingriffs korreliert (70, 71). Giannoudis et al. schließen daraus, dass IL-6 einen Marker für die Gewebsverletzung darstellen könnte (70). Auch bei polytraumatisierten Patienten sind erhöhte IL-6-Spiegel nachgewiesen worden. Die Höhe der Spiegel hat mit dem Ausmaß der Verletzung korreliert (69). Die erhöhten IL-6-Serumspiegel könnten auf die bidirektionalen Funktionen von IL-6 zurückgeführt werden. IL-6 hat einerseits potente proinflammatorische Eigenschaften, die als wichtiger Teil der Immunkaskade zur Aktivierung des Immunsystems führen, und andererseits auch antiinflammatorisch-regeneratives Potenzial, das zu einer Eindämmung der Immunantwort und Regeneration des verletzten Gewebes beitragen kann (12). IL-6 kann demnach unabhängig von einer bakteriellen Infektion bei verschiedenen Formen einer Gewebsverletzung erhöht sein. In der vorliegenden Studie ist die Konzentration von IL-6 in der SIRS-Gruppe über den Normbereich hinaus erhöht. Dennoch liegt sie signifikant unterhalb der Konzentrationen in der Sepsis-Gruppe.

Eine der größten Herausforderungen im Umgang mit septischen Patienten ist die frühzeitige Erkennung einer Infektion. Eine solche Erkenntnis hat maßgeblichen Einfluss auf die Entscheidung im klinischen Alltag hinsichtlich eines rechtzeitigen Beginns der antibiotischen Therapie sowie der intensivmedizinischen Maßnahmen wie hämodynamischer Überwachung, Flüssigkeitssubstitution und Einsatz von Vasopressoren. Der späte oder unzureichende Einsatz dieser Maßnahmen durch z. B. verspätetes Erkennen eines lebensbedrohlichen Zustands hat einen beträchtlichen Einfluss auf die Überlebensrate der Patienten (58). Die hohe Mortalität und der hohe Anteil der Funktionsstörung unterschiedlicher Organe in der Sepsis verdeutlichen, wie wichtig es ist, unser Wissen über die einzelnen Prozesse dieser Krankheit zu erweitern. Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse über die Konzentration der drei Zytokine stehen im Einklang mit den bereits veröffentlichten klinischen Studien und könnten zur Erweiterung unseres Verständnisses über die Immunantwort während der Sepsis beitragen (72-74). Während einige Autoren die Höhe der Zytokine lediglich zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Sepsis beschreiben, wird in dieser Studie der Verlauf der Zytokine über mehrere Tage hinweg untersucht,

was signifikant hinsichtlich der hepatischen Funktion, des Verlaufs der Krankheit und letztendlich der Prognose des Patienten ist. Diese Erkenntnisse können dazu beitragen, im Rahmen weiterer Studien Marker zu identifizieren, mit denen eine Sepsis verlässlicher und vor allem früher identifiziert werden kann. Dass sich die Medizin in Zukunft in Richtung einer markerorientierten Diagnose bewegen könnte, legen zudem die noch unveröffentlichten Daten von Grueb et al. nahe: Die Autoren haben festgestellt, dass Sepsis ab einer bestimmten Höhe von IL-6 bereits vor Beginn der Symptome vorhergesagt werden kann (United States Patent: US 20160305957). Dolin et al. sehen das ebenfalls so: Sie schlagen eine Kombination aus IL-6, sTREM-1 (einem löslichen Rezeptor auf der Zellmembran der myeloischen Zellen) und PCT als potenzielle Biomarker zur frühzeitigen Erkennung einer Sepsis vor (75).

Septische Patienten zu identifizieren, schließt ihre korrekte Unterscheidung von SIRS-Patienten ohne Infektion mit ein. Hierdurch können im klinischen Alltag u. a. der ungerechtfertigte Einsatz von Antibiotika und die damit einhergehende zusätzliche Belastung für die Patienten reduziert, die Entwicklung von Resistenzen vermieden sowie Ressourcen geschont werden. Obwohl in der vorliegenden Studie lediglich fünf Patienten der SIRS-Gruppe angehört haben, stehen die Ergebnisse im Einklang mit anderen Studien und verdeutlichen den wichtigen Unterschied zwischen der Dynamik der untersuchten Zytokine bei Sepsis- und SIRS-Patienten.

#### **4.2. Korrelation zwischen dem LiMAx-Test und den Absolutwerten von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6**

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass bei septischen Patienten eine negative Korrelation zwischen den in dieser Studie untersuchten Zytokinen und der Leberfunktion besteht. Hohe Konzentrationen von CT-proET-1, TNF- $\alpha$  oder IL-6 sind mit niedrigen LiMAx-Werten, also einer eingeschränkten Leberfunktion, assoziiert.

ET-1 gehört zu den potentesten Vasokonstriktoren und wird hauptsächlich von den Endothelzellen freigesetzt (19). Andere Zellen wie Makrophagen, glatte Muskelzellen und Neuronen sind ebenfalls an der Produktion und Freisetzung dieses Peptids beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen wird ET-1 streng reguliert und je nach Bedarf kontinuierlich in bestimmten Mengen freigesetzt. Es nimmt an der Regulierung des Gefäßtonus im Körper teil und spielt eine wichtige Rolle für den sinusoidalen Blutfluss in der Leber (19, 64, 76, 77). ET-1 entfaltet seine Wirkung in der Leber sowohl im präsinusoidalen Bereich, indem es zu einem erhöhten Widerstand in den Portalgefäßen führt, als auch intrasinusoidal, wo es durch die hepatischen Ito-Zellen zu einer Kontraktion dieser Gefäße kommt (78).

In den ersten Stunden nach Beginn der Sepsis kommt es durch die Aktivierung der Kupferzellen, Migration der Granulozyten und der T-Zellen sowie durch die Freisetzung großer Mengen Zytokine zu einer starken Stimulierung der ET-1-Freisetzung. Durch die in diesem Zusammenhang entstehenden Sauerstoffradikale kommt es zu einer Schädigung der Endothelzellen (76). Diese Schädigung führt zu einer zusätzlichen und unkontrollierten Freisetzung von ET-1.

Die Ergebnisse verschiedener Studien deuten darauf hin, dass ET-1 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer hepatozellulären Schädigung spielt (19, 59, 77). Bauer et al. haben im Tierversuch durch intraportale Injektion verschiedener Konzentrationen von ET-1 in die Leber beobachtet, dass bereits geringe Mengen ET-1 (0,5 pmol/ 100 g/min) zu einer Einschränkung der hepatischen Mikrozirkulation führen. Höhere Dosen verschlechtern die hepatische Mikrozirkulation zunehmend und führen zusätzlich zu einer Einschränkung der Gallensekretion (19). Baveja et al. zeigen eine Hypersensibilisierung der hepatischen Mikrozirkulation gegenüber ET-1 bei septischen Ratten auf. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wird bei septischen Ratten nach Injektion von ET-1 eine signifikant höhere Kontraktion der Sinusoidalfäße und eine erhöhte Aktivität von ALT im Serum gemessen (21). Die erhöhte ALT-Konzentration kann ein Hinweis auf eine hepatozelluläre Schädigung durch die Minderdurchblutung sein. Die Autoren postulieren, dass im Rahmen einer Sepsis eine stärkere Reaktion auf ET-1 stattfindet als unter physiologischen Bedingungen.

Neben der starken Vasokonstriktion und der damit einhergehenden hypoxischen Schädigung der Leberzellen verstärkt ET-1 durch weitere Faktoren zusätzlich eine hepatische Dysfunktion während der Sepsis. ET-1 triggert eine inflammatorische Antwort, die zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 (IL-1) und IL-6 führt. Daneben wird die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen erhöht und die Einwanderung neutrophiler Granulozyten ins Gewebe stimuliert. Zusammen führt dies zu einer weiteren Schädigung hepatischer Endothelzellen. Daneben kommt es zusätzlich zu einer vermehrten Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikaler, was über eine Schädigung zellulärer Strukturen zu einer Verstärkung der Organdysfunktion beiträgt (64, 68, 76, 77).

TNF- $\alpha$  ist eines der potentesten proinflammatorischen Zytokine. Es ist als wichtiger Mediator des Immunsystems für den Schutz des Körpers gegenüber Krankheitserregern und für die Regulierung der Immunreaktion von großer Bedeutung (8). In den vergangenen Jahrzehnten sind verschiedene Studien publiziert worden, die eine mögliche schädigende Wirkung von hohen Konzentrationen dieses Zytokins auf die Leber beschreiben. Wang et al. haben mittels des ICG-Tests die Wirkung unterschiedlicher Dosen von TNF- $\alpha$  auf die Leberfunktion von gesunden Ratten untersucht (11).

Die intravenöse Injektion von 0,05 mg/kg führte dabei noch zu keinerlei Änderung in der gemessenen Leberfunktion. Die Erhöhung der Dosis um den Faktor 5 führte hingegen bereits nach einer Stunde zu einer deutlichen Einschränkung der Leberfunktion. Dieses Modell hat später auch auf die Sepsis übertragen werden können. 90 Minuten nach Induktion der Sepsis kann im Tierversuch eine Erhöhung von TNF- $\alpha$  und IL-6 sowie eine Verschlechterung der Leberfunktion beobachtet werden. Zu einer systemischen hämodynamischen Veränderung kommt es nach 120 Minuten (10). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die frühe hepatozelluläre Schädigung nicht nur auf eine Störung der Mikrozirkulation und Organperfusion zurückgeführt werden kann, sondern möglicherweise auch auf einer direkten Schädigung durch Freisetzung großer Mengen proinflammatorischer Zytokine wie dem TNF- $\alpha$  beruhen könnte.

Andere Autoren haben TNF- $\alpha$  als Induktor einer hepatozellulären Apoptose in der ischämischen Leber identifiziert (9). Im Tierversuch resultiert eine Inhibition von TNF- $\alpha$  in einem verminderten Anstieg des AST, in einer verminderten Apoptose und in einer höheren Überlebensrate. Auf der anderen Seite wurde eine verminderte Leberzellregeneration festgestellt. Diese gegensätzliche Wirkung von TNF- $\alpha$  ist von der Wissenschaft noch nicht in allen Einzelheiten verstanden worden. Eine Erklärung könnte sein, dass TNF- $\alpha$  seine Wirkung über zwei verschiedene Rezeptoren, Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1 (TNFR1) und Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 2 (TNFR2), entfaltet. TNFR1 führt zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren inklusive TNF- $\alpha$  selbst. TNFR2 wird eine protektive Funktion zugeschrieben und führt unter anderem zu einer Hemmung der TNF- $\alpha$ -Produktion (79). Hohe TNF- $\alpha$ -Spiegel im Blut führen zu einer verstärkten Freisetzung weiterer Zytokine, die sich gegenseitig hochregulieren und ebenfalls zu einer hepatischen Dysfunktion beitragen können. Daneben aktiviert TNF- $\alpha$  die Endothelzellen. Durch die Expression und Bildung von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche dieser Zellen und die darauffolgende Einwanderung neutrophiler Granulozyten kommt es zur Degranulation zytotoxischer Enzyme sowie zur Bildung freier Sauerstoffradikale. Die Folge davon sind eine Schädigung der Endothelzellen mit konsekutivem Austritt von Plasma in den Extrazellularraum, eine damit verbundene Schocksymptomatik, eine disseminierte intravasale Koagulation und zuletzt eine Hypoperfusion der Organe. Verschlimmert wird die Situation durch die ebenfalls von TNF- $\alpha$  getriggerte Freisetzung von Stickstoffmonoxid und Kohlenstoffmonoxid, die zu einem weiteren systemischen Druckverlust und einer verminderten Organperfusion führt (8, 80). Auch diese Prozesse sind für die hepatische Schädigung und die damit verbundene Dysfunktion im späteren Verlauf der Sepsis mitverantwortlich.

IL-6 ist ein pleiotropes multifunktionales Zytokin, das auf verschiedene Organe unterschiedliche Wirkungen ausübt (12). Es wird davon ausgegangen, dass IL-6 einen Einfluss auf die

Leberfunktion septischer Patienten hat, indem es unter anderem die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber stimuliert (6). Die Freisetzung solcher Proteine führt zum Beispiel zu einer Hemmung der antikoagulatorischen Proteine C und S, einer Aktivierung Thrombin-aktivierender-Fibrinolysehemmer sowie zu einer vermehrten Bildung des Tissue-Faktors (81). Dies führt insgesamt zu einer prokoagulatorischen Situation. Das Risiko für eine Entstehung von Mikrothromben oder eine disseminierte intravasale Koagulation ist erhöht und könnte die ohnehin verminderte hepatische Perfusion weiter verschlechtern. In einer randomisierten placebokontrollierten Doppelblind-Studie mit Sepsis-Patienten ist unter anderem gezeigt worden, dass eine andauernde Koagulopathie während der ersten 24 Stunden nach Auftritt der Sepsis zu einer erhöhten Entwicklung von Organversagen und einer erhöhten Mortalität führt (82). Daneben wird gezeigt, dass IL-6 zu einer Phosphorylierung von Zelladhäsionsmolekülen zwischen den Endothelzellen der Umbilikalgefäße führt. Hierdurch kommt es zu einer Zunahme der Durchlässigkeit der Gefäße. Dieser Prozess könnte im Rahmen einer Sepsis mitverantwortlich für den Übertritt von Flüssigkeit aus dem Gefäßsystem in das Interstitium sein. Hypotension, Ödeme und eine Minderperfusion von wichtigen Organen wie der Leber und eine damit einhergehende Gewebeschädigung könnten die Folgen sein (83). Cressmann et. al. haben andererseits gezeigt, dass die vollständige Unterdrückung der Genexpression von IL-6 zu einer verminderten Regeneration der Hepatozyten bei leberteilresezierten Mäusen führt (84). Dies belegt, dass erhöhte IL-6-Spiegel ebenfalls eine protektive Wirkung haben könnten. Zukünftige Studien sollten die gegensätzlichen Wirkungen von IL-6 genauer untersuchen.

Die negativen Korrelationen zwischen den untersuchten Zytokinen und der hepatischen Funktion in dieser Arbeit stehen im Einklang mit den aus tierexperimentellen Studien gewonnenen Daten. Sie bestätigen die Assoziation von ET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 mit dem Ausmaß der hepatischen Dysfunktion bei septischen Patienten. Die Daten gehen ebenso konform mit klinischen Studien aus vergangenen Jahren, in denen im Falle von erhöhten Plasmakonzentrationen von ET-1, TNF- $\alpha$  oder IL-6 eine pathologische Änderung einiger biochemischen Laborparametern wie AST, ALT, Bilirubin, Albumin und PTZ festgestellt worden ist (85-87). So haben Buendgens et al. bei septischen Patienten mit erhöhten ET-1-Werten ebenfalls erhöhte PTZ und verminderte Albuminkonzentrationen beobachtet. Bei den Leberparametern ALT und Bilirubin haben die Autoren keinen Zusammenhang feststellen können. In einer anderen Studie ist zwar ein Zusammenhang zwischen ET-1 und Bilirubin festgestellt worden, jedoch nicht zwischen ET-1 und ALT (86). Diese Ergebnisse stützen einerseits die Daten dieser Arbeit, andererseits verdeutlichen sie die in Kapitel 4.1 dargelegte Ungenauigkeit der biochemischen Leberparameter zur

Quantifizierung der tatsächlichen Leberfunktion. Diese Ungenauigkeit dürfte auch die Erforschung der Zusammenhänge zwischen den in der Sepsis stattfindenden Prozessen und der Entstehung einer hepatischen Störung erschweren.

In der vorliegenden Arbeit wird mithilfe des LiMAX-Tests erstmals die tatsächlich vorhandene Stoffwechsellkapazität der Leber mit den Zytokinen ET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 an den jeweiligen Tagen korreliert. Es kann gezeigt werden, dass bei allen drei Zytokinen einheitlich innerhalb der ersten 24 Stunden nach Eintritt der Sepsis (Tag 0) keine signifikante Korrelation mit der Leberfunktion besteht. Eine signifikant negative Korrelation wird bei allen Zytokinen ab Tag 2 festgestellt. Diese setzt sich außer bei TNF- $\alpha$  (am Tag 5 nicht signifikant) bis Tag 10 fort. Ein solcher Zusammenhang könnte darauf hindeuten, dass der leberschädigende Effekt der Zytokine erst nach Ablauf des ersten Tages der Sepsis einsetzt. Aktuell werden Maßnahmen wie die gezielte Entfernung der Immunmediatoren aus dem Patientenblut erforscht, die eine Regulierung der Immunantwort bei septischen Patienten zum Ziel hat (88). Die Erkenntnisse aus den beschriebenen Zusammenhängen zwischen den Zytokinen und der Leber stützt die Annahme, dass die Regulierung der Plasmakonzentrationen der Zytokine bereits in den ersten 24 Stunden nach Eintritt der Sepsis die Leber vor einem bevorstehenden Zelluntergang schützen könnte. Warum TNF- $\alpha$  im Gegensatz zu den anderen beiden Zytokine am Tag 5 keine signifikante Korrelation mit der Leberfunktion aufweist, kann anhand der Daten der Studie nicht hinreichend geklärt werden. Tatsache ist, dass die Prozesse während der Sepsis, zusätzlich zu den hier untersuchten Mediatoren, von zahlreichen anderen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren gesteuert werden, die sich gegenseitig in einem hochgradig komplexen Mechanismus beeinflussen. Sämtliche Zytokine sind während der Erkrankung einer kontinuierlichen Dynamik ausgesetzt. Es bleibt somit Gegenstand zukünftiger Studien, dieser Frage weiter nachzugehen.

#### **4.3. Korrelation zwischen der hepatischen Dysfunktion und dem Verlauf von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6**

Die gewählte Grenze der Leberfunktionsstörung in dieser Studie ist aufgrund der Publikation von Kaffarnik et al. gewählt worden, in welcher ein LiMAX von 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  als bester Cut-Off-Wert für die Prädiktion einer negativen Prognose bei septischen Patienten errechnet worden ist (4).

Es ist aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ersichtlich, dass die Serumkonzentrationen von CT-proET-1 und TNF- $\alpha$  bei Patienten mit einem LiMAX  $<100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  höher sind als bei Patienten mit einem LiMAX  $\geq 100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ . Der Unterschied ist bei TNF- $\alpha$  an Tag 10 signifikant und bei CT-proET-1 zusätzlich auch an Tag 5. Dies könnte darauf hinweisen, dass die persistierend hohen Serumspiegel der Zytokine vor allem im späteren Verlauf der Sepsis die Leberfunktion

beeinflussen und zusätzlich die bereits geschädigte Leber an der Regeneration hindern. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass die Konzentration der Zytokine in dieser Studie an Tag 0 nicht signifikant mit dem LiMAX-Wert korreliert hat. Fallen die Serumspiegel im Verlauf ab, kann sich die Leber regenerieren und ihre physiologische Funktion wiedererlangen. Diese Annahme wird von Sánchez-Etayo et al gestützt. Die Autoren haben am Tiermodell einen erhöhten intraabdominellen Druck induziert und nach vollständiger Blockade von ET-1-Rezeptoren eine bessere hepatische Mikrozirkulation und Oxygenierung festgestellt als in der Kontrollgruppe (89). Wu et al. sind in einer Studie mit septischen Ratten zu ähnlichen Ergebnissen gekommen. Die Autoren haben nach Unterdrückung der Endothelin-Produktion eine verbesserte Mikrozirkulation der Leber nachweisen (90) können. Die verbesserte Blutversorgung könnte eine wichtige Rolle bei der Regeneration der Leber spielen.

Andere Autoren haben im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit beobachten können, dass eine partielle Hemmung von TNF- $\alpha$  zu einer verminderten hepatischen Zellschädigung führt. Eine vollständige Unterdrückung der Expression von TNF- $\alpha$  resultiert jedoch bei Versuchstieren mit einem Ischämie-Reperfusionsschaden in einem erhöhten Leberschaden (91). Wie erwähnt entfaltet TNF- $\alpha$  seine Wirkung über zwei verschiedene Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2). TNFR1 scheint in der Signaltransduktion von TNF- $\alpha$  die Hauptrolle zu spielen (92). Hinzu kommt, dass TNFR1 selbst im Rahmen der Inflammation zwei unterschiedliche Prozesse einleiten kann. Wird TNF- $\alpha$  nach seiner Bindung an TNFR1 im Rahmen einer Endozytose in die Zelle aufgenommen, wird der Zelluntergang eingeleitet. Bleibt TNF- $\alpha$  nach seiner Bindung an TNFR1 hingegen an der Zelloberfläche bestehen, so wird eine Proliferation der Zelle und somit Regeneration des Organs induziert. Wann die Zelle sich für einen bestimmten Signalweg entscheidet, ist Gegenstand der aktuellen Forschung (91). Es wird jedoch schon jetzt deutlich, dass TNF- $\alpha$  bei septischen Patienten auch hinsichtlich der Regeneration der Leber eine wichtige Rolle spielen könnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können zwischen diesen Wirkungen nicht unterscheiden. Hierfür müssten im Rahmen von zukünftigen Experimenten u. a. die Bindungsverhältnisse von TNF- $\alpha$  an die beiden Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 untersucht werden. TNF- $\alpha$  scheint jedenfalls bei septischen Patienten eher eine Leberdysfunktion zu verstärken.

Der Verlauf von IL-6 ist ähnlich wie die Verläufe von CT-proET-1 und TNF- $\alpha$ . Allerdings kann kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit einem LiMAX  $\geq 100$   $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  und Patienten mit einem LiMAX  $< 100$   $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  festgestellt werden. Wie bereits erläutert kann IL-6 die Entstehung einer hepatischen Dysfunktion begünstigen. Dies kann den hohen Serumspiegel von IL-6 bei Patienten mit einem LiMAX  $< 100$   $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  erklären. Die potenziellen regenerativen Eigenschaften von IL-6 könnten der Grund für die Höhe von IL-6 bei Patienten mit einer besseren

Leberfunktion ( $\text{LiMAX} \geq 100 \mu\text{g/kg/h}$ ) sein. Trautwein et al. haben bei Ratten, die einer partiellen Hepatektomie unterzogen worden sind, deutlich höhere Konzentrationen von IL-6 gemessen als bei Ratten mit einer Scheinoperation (93). Die Autoren haben eine signifikant positive Korrelation zwischen der Höhe von IL-6 und Messenger-RNA von mehreren Proteinen und Transkriptionsfaktoren feststellen können, die für die Aktivierung der Proliferation der Hepatozyten verantwortlich gemacht werden. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie und zahlreicher vorangegangener Studien kann davon ausgegangen werden, dass IL-6 ein unspezifischer Parameter ist und bei zahlreichen Prozessen erhöht sein kann (94). Dies könnte erklären, dass dieses Zytokin bei Patienten mit einem  $\text{LiMAX} < 100 \mu\text{g/kg/h}$  trotz der tendenziell höheren Konzentrationen im Vergleich mit Patienten mit  $\text{LiMAX} \geq 100 \mu\text{g/kg/h}$  zu keinem Messzeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied erreicht.

Ein  $\text{LiMAX}$  von  $100 \mu\text{g/kg/h}$  bedeutet, dass eine kritische Leberinsuffizienz (95) vorliegt. Kaffarnik et al. haben für diesen Cut-Off-Wert bei septischen Patienten eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 77 % für Mortalität im Krankenhaus oder einen langen Aufenthalt auf der Intensivstation (4) errechnet. Angesichts der erhöhten Zytokin-Konzentrationen bei  $\text{LiMAX} < 100 \mu\text{g/kg/h}$  wäre es denkbar, dass dieser Wert dazu verwendet werden könnte, um Patienten zu selektieren, die von Therapieverfahren wie extrakorporaler Zytokin-Adsorption profitieren können. Diese Hypothese muss im Rahmen von anderen klinischen Studien überprüft werden.

An dieser Stelle muss betont werden, dass die Leber nicht nur die Freisetzung der Immunmediatoren triggert, sondern auch für deren Beseitigung aus dem systemischen Kreislauf mitverantwortlich ist (80). Auf diese Weise wird unter physiologischen Bedingungen eine Feinjustierung der Funktionen des Immunsystems sichergestellt und einer proinflammatorischen Überreaktion entgegengesteuert. Im Rahmen einer Sepsis kann die eingeschränkte hepatische Funktion mit einer daraus resultierenden verminderten Beseitigung der Mediatoren zusätzlich zu deren Erhöhung im Blut beitragen. Es ist wahrscheinlich, dass sich die hohen Konzentrationen von ET-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 und die eingeschränkte Leberfunktion während der Sepsis in einem Circulus vitiosus gegenseitig bedingen und verstärken.

#### **4.4. Korrelation zwischen dem Schweregrad der Sepsis und dem Verlauf des LiMAX-Tests, CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6**

Der APACHE-II-Score ist eine validierte Methode, um den Schweregrad einer Krankheit und die Überlebenschancen von Patienten auf einer Intensivstation zu beurteilen (42). Dieses System hat jedoch einige Schwächen, die eine rechtzeitige Erkennung eines Hochrisikopatienten erschweren können. Zum Beispiel können junge Patienten mit einer schweren Sepsis, die ansonsten jedoch keine chronischen Erkrankungen haben, trotz ungünstiger Prognose einen falsch-niedrigen APACHE-II-Score erhalten (96). Um zwischen einer schweren und einer weniger schweren Sepsis zu unterscheiden, ist in der vorliegenden Studie ein Cut-Off-Wert von 20 festgelegt worden. Grundlage dafür ist die Studie von Meyer et al. mit 578 Patienten. Deren Autoren haben in ihrer Analyse einen APACHE-II-Score von 20 als besten Cut-Off-Wert für die Vorhersage der Mortalität der Patienten auf der Intensivstation gefunden (97).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Höhe der Serumspiegel von CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 mit dem Schweregrad der Sepsis, definiert durch den APACHE-II-Score, korrelieren. Diese sind bei Patienten mit einem APACHE-II-Score  $\geq 20$  (im Folgenden „schwere Form der Sepsis“ genannt) höher als bei Patienten mit einem APACHE-II-Score  $< 20$  (im Folgenden „leichte Form der Sepsis“ genannt). Statistisch signifikant sind die Werte für CT-proET-1 und IL-6 am Tag 5 nach Auftritt der Sepsis. Bei TNF- $\alpha$  ist dies zu allen Messzeitpunkten der Fall. Brauner et al. haben ebenfalls bei Patienten mit einem septischen Schock eine Korrelation von ET-1 und TNF- $\alpha$ , gemessen in den ersten 24 Stunden nach Auftritt der Krankheit, mit dem APACHE-II-Score beobachtet (98). In Bezug auf ET-1 kann in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zur Studie von Brauner et al. ein signifikanter Zusammenhang mit dem APACHE-II-Score nur im späteren Verlauf der Sepsis festgestellt werden. Diese Diskrepanz könnte dadurch erklärt werden, dass in der Studie von Brauner et al. die Spiegelbestimmung nur am ersten Tag nach Beginn des septischen Schocks durchgeführt worden ist. Eine längerfristige Untersuchung ist nicht durchgeführt worden. Elif et al. haben in einer klinischen Studie mit 60 septischen Patienten eine positive Korrelation von TNF- $\alpha$  und IL-6 mit APACHE-II-Score nachgewiesen (99). In einer weiteren Studie mit 840 septischen Patienten hat der APACHE-II-Score in Kombination mit dem IL-6 hinsichtlich der 28-Tage-Mortalität einen höheren prädiktiven Wert als für sich alleine (82). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit der vorhandenen Literatur und lassen vermuten, dass nicht nur IL-6, sondern auch ET-1 und TNF- $\alpha$  mit dem Schweregrad der Sepsis assoziiert sind und zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs herangezogen werden könnten.

Korrelierend mit den erhöhten Serumspiegeln der untersuchten Zytokine in der vorliegenden Studie ist die Leberfunktion in der Patientengruppe mit einer schweren Form der Sepsis im Vergleich mit Patienten mit einer leichten Form der Sepsis erniedrigt. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist an den Tagen 2 und 5 signifikant. Interessanterweise zeigen Patienten mit einer schweren Form der Sepsis an den Tagen 0 und 2 einen progredienten niedrigen LiMAX-Wert, der erst ab Tag 5 langsam ansteigt ohne in den Normbereich zurückzugehen. Die Gruppe der Patienten mit einer leichten Form der Sepsis zeigt bereits ab Tag 2 einen steigenden LiMAX-Wert und erreicht am Tag 5 eine normale Leberfunktion. Diese Ergebnisse zeigen erstmals unabhängig von biochemischen Laborparametern die Assoziation zwischen dem Schweregrad der Sepsis und der tatsächlich vorhandenen Stoffwechselkapazität der Leber. Sie belegen, dass die Leber durch den Schweregrad der Sepsis beeinflusst werden könnte.

Es wäre von großem Vorteil, einen in der klinischen Routine einfach durchzuführenden Test zu entwickeln, mit dessen Hilfe der Schweregrad einer Sepsis mit einer höheren Genauigkeit ermittelt werden kann als mit dem APACHE-II-Score allein. Ein solcher Fortschritt würde bei der Wahl und Intensität einer Therapie eine wichtige Rolle spielen. Dies würde z. B. dazu beitragen, Patienten, die von einem frühzeitigen Einsatz vasoaktiver Substanzen, mechanischer Ventilation und Nierenersatztherapie profitieren könnten, gezielter zu selektieren. Umgekehrt würden Patienten erkannt, bei denen eine aggressive Therapie nicht indiziert ist und somit eine zusätzliche Belastung durch eine solche Therapie für den Patienten nicht in Kauf genommen werden muss. Kürzlich veröffentlichte Studien zeigen, dass durch die Kombination von mehreren Immunmediatoren höhere Vorhersagewerte erreicht werden können als durch aktuell etablierte Verfahren wie SOFA- oder APACHE-II-Score (72, 100). Von Matsumoto et al. wird z. B. ein Punktesystem basierend auf den Konzentrationen von IL-6, IL-1 $\beta$ , Interleukin-8, IL-10, Monocyte Chemoattractant Protein-1 und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 als ein viel versprechender Test zur Vorhersage sowohl des Schweregrades der Sepsis als auch der Mortalität vorgeschlagen (72).

ET-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 und der LiMAX-Test könnten zur Erweiterung anderer Vorhersage-Verfahren eingesetzt werden, um deren Genauigkeit zu erhöhen. Im Rahmen zukünftiger Studien sollten die Sensitivität wie auch die Spezifität von ET-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 und dem LiMAX-Test hinsichtlich der Vorhersage des Schweregrades der Sepsis sowohl alleine als auch in kombinierter Form untersucht und deren diagnostische Wertigkeit in diesem Zusammenhang validiert werden.

#### **4.5. Korrelation zwischen dem Krankheitsverlauf und der Höhe von CT-proET-1, TNF- $\alpha$ und IL-6**

In der vorliegenden Studie ist untersucht worden, ob in der Sepsis-Gruppe ein Zusammenhang zwischen CT-proET-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 und dem Krankheitsverlauf der Patienten festgestellt werden kann. Patienten mit einem negativen Verlauf zeigten höhere Serumspiegel von CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6. Dieser Unterschied ist bei CT-proET-1 und IL-6 im späteren Verlauf der Sepsis an den Tagen 5 und 10 signifikant, bei TNF- $\alpha$  zusätzlich auch in der frühen Phase der Sepsis. Zahlreiche Studien aus den vergangenen Jahren stehen im Einklang mit diesen Ergebnissen. Sie zeigen ebenfalls die Assoziation einer hohen Konzentration der genannten Zytokine mit der ungünstigen Prognose bei septischen Patienten (72, 73, 101-104). Beispielsweise ist der TNF- $\alpha$ -Spiegel in einer Studie mit Patienten mit septischem Schock in der Gruppe der Nicht-Überlebenden zu allen drei Messzeitpunkten (Einschluss in die Studie, Tag 1 und Tag 10) signifikant höher als in der Überlebenden-Gruppe (102). Naffaa et al. haben zudem im Rahmen einer klinisch-prospektiven Studie mit septischen Patienten den IL-6-Wert am Tag der Entlassung der Patienten aus dem Krankenhaus als einen unabhängigen Prädiktor der Sechs-Monate-Mortalität identifiziert (103). In einer weiteren Studie haben Sepsis-Patienten mit einem IL-6-Serumspiegel >1000 pg/ml am Tag der Diagnose eine Mortalität von 56 %, verglichen mit einer Mortalität von 40 % bei Patienten mit niedrigeren Spiegel (104).

Das zunehmende Verständnis über die Rolle der Zytokine hat zur Entwicklung von Antikörpern geführt, die einige oder sämtliche Signalwege des jeweiligen Zytokins unterdrücken können. Es existieren bereits mehr als 40 Wirkstoffe, die mit unterschiedlicher Selektivität die beiden bekannten Endothelin-Rezeptoren hemmen und beispielsweise in der Behandlung der pulmonalen Hypertension erfolgreich eingesetzt werden können (64). Einige dieser Wirkstoffe erhalten aktuell eine besondere Aufmerksamkeit bei der Behandlung von septischen Patienten und befinden sich in der Erprobung. Ziel ist es, durch Antagonisierung der Wirkung von ET-1 die Prognose dieser kritisch kranken Patienten zu verbessern. Je nach Wirkstoff könnten Effekte wie eine verbesserte Durchblutung der Organe, eine Hemmung der Bildung verschiedener Zytokine, eine Unterdrückung der Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Wasserstoffperoxid, eine Reduzierung der Organschädigung und eine Verbesserung des mittleren arteriellen Drucks erzielt werden. Durch den frühzeitigen Einsatz von Bosentan, einem nicht-selektiven ET-1-Rezeptorblocker, ist im Tierexperiment bereits eine höhere Überlebensrate bei Mäusen mit einem septischen Schock nachgewiesen worden (64, 105). Der frühe Einsatz von Granulocyte Colony Stimulating im septischen Tiermodell führt zu einer Verbesserung der Sieben-Tage-

Mortalität von 96 auf 42 %. Im Blut der Versuchstiere ist eine Verringerung des Anteils von Endotoxinen sowie von ET-1 und TNF- $\alpha$  festgestellt worden (106). Allerdings hat beim Menschen ein solcher Effekt bisher nicht nachgewiesen werden können.

Im Hinblick auf TNF- $\alpha$  sind ebenfalls verschiedene Experimente durchgeführt worden, um durch Unterdrückung der Wirkung oder der Freisetzung dieses Zytokins das Überleben der septischen Patienten zu verbessern. Márquez et al. haben in Tiermodellen durch frühe Infusion (30 Minuten vor oder nach Induzierung der Sepsis) eines spezifischen TNF- $\alpha$ -Antikörpers eine signifikant höhere Überlebensrate erreichen können als in der Kontrollgruppe (69 % vs. 29 %) (7). In den meisten Studien kann allerdings kein signifikante Effekt einer solchen Behandlung nachgewiesen werden (107). Interessant in diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse einer randomisierten Doppelblind-Studie von Bernard et al. mit septischen Patienten: Durch den Einsatz eines polyklonalen TNF- $\alpha$ -Antikörpers kann zwar eine deutliche Senkung von TNF- $\alpha$  im Plasma herbeigeführt werden, jedoch hat das auf die Mortalität gegenüber der Placebo-Gruppe keinen Einfluss (108).

Hinsichtlich der Inhibierung der Wirkung von IL-6 bei Sepsis sind die Ergebnisse der Studien ebenfalls heterogen. Während Riedemann et al. im Tierversuch durch eine vollständige Blockade von IL-6 einen Überlebensvorteil bei septischen Mäusen festgestellt haben, können Vysa et al. im Rahmen einer größeren experimentellen Studie diese Ergebnisse nicht reproduzieren (109, 110). Durch Hemmung eines der beiden Signalwege von IL-6, welches die proinflammatorischen Funktionen vermittelt, können Barkhausen et al. während einer Beobachtungsperiode von 96 Stunden bei septischen Mäusen eine Überlebensrate von 100 % erreichen. Durch eine vollständige Blockierung von IL-6 können die Autoren hingegen keinen positiven Effekt erzielen (111).

All diese Ergebnisse verdeutlichen die Komplexität der Kurz- und Langzeitwirkung der einzelnen Zytokine und lassen vermuten, dass mit einer isolierten Unterdrückung einzelner Immunmediatoren wahrscheinlich kein Überlebensvorteil erzielt werden kann.

In der vorliegenden Studie hat gezeigt werden können, dass TNF- $\alpha$  als einziges Zytokin bereits in der frühen Phase der Sepsis signifikant mit dem Krankheitsverlauf assoziiert ist. CT-proET-1 und IL-6 erreichen eine solche Assoziation erst ab Tag 5. Diese Erkenntnisse könnten dazu beitragen, den Zustand des septischen Patienten im Verlauf seiner Krankheit besser einzuschätzen und entsprechend der wahrscheinlichen Prognose rechtzeitig geeignete Maßnahmen einzuleiten. Ein Testverfahren auf Basis der gleichzeitigen Konzentrationsmessung aller drei Zytokine könnte vor allem an den Tagen 5 und 10 von Vorteil sein. Die Relevanz der Etablierung von neuen Markern in Bezug auf die frühzeitige Einschätzung des Schweregrades der Sepsis ist in Kapitel 4.4

dargestellt worden. Hinsichtlich des Krankheitsverlaufs behält sie hier ihre Gültigkeit. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen ebenfalls, wie wichtig es ist, neuartige Therapieverfahren zu entwickeln, um die Wiederherstellung des Gleichgewichts der Immunreaktion zu unterstützen und das Überleben kritisch kranker Patienten zu sichern.

#### **4.6. Ausblick**

In den vergangenen Jahrzehnten sind beachtliche Fortschritte in der Diagnostik und der Behandlung von Sepsis gemacht worden. Dennoch stellt diese Krankheit mit einer weltweiten Mortalitätsrate von über 5 Millionen pro Jahr weiterhin eine ernste Herausforderung dar (112). Mit stetiger Zunahme unseres Wissens über die komplexen biologischen Prozesse während einer Sepsis, die erheblichen Einfluss auf Organe wie die Leber ausüben können, und mit den daraus resultierenden diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen wächst auch die Notwendigkeit des Einsatzes eines geeigneteren Verfahrens zur Ermittlung der tatsächlichen Leberfunktion. Biochemische Laborparameter wie Transaminasen, Bilirubin, Albumin oder Gerinnungswerte verfügen wie dargelegt über keine hohe Genauigkeit, um den aktuellen Zustand der Leber darzustellen. Der ICG-Test wird als dynamisches Verfahren ebenfalls in der Ermittlung der Leberfunktion eingesetzt. Er könnte jedoch aufgrund seiner hinlänglich bekannten Limitierungen zu falsch-positiven oder negativen Ergebnissen führen (113, 114). Dies führt zu der Frage, ob diese Tests weiterhin alleine für die Diagnostik und die Erforschung der Zusammenhänge zwischen Zytokinen und der Leber ausreichen.

Bei septischen Patienten haben Buendgens et al. eine schwache Korrelation zwischen ET-1, Albumin ( $r = -0,3$ ) und PTZ ( $r = -0,2$ ) gezeigt. Bilirubin und ALT sind nicht mit ET-1 korreliert gewesen (85). In einer Studie mit Empfängern einer Lebertransplantation hat durch Infusion von Somatostatin eine Verringerung der Konzentration von ET-1 am OP-Tag erreicht werden können. Diese Dynamik ist mit einer Verringerung der Plasmakonzentration von AST assoziiert gewesen – im Gegensatz zu den Ergebnissen von Buendgens et al. auch mit Bilirubin und ALT, jedoch nicht mit PTZ (115). Bei Patienten mit Leberzirrhose ist nach einer viermonatigen Therapie mit einem  $\beta$ -Blocker eine Verdoppelung der ET-1-Konzentrationen verzeichnet worden. Die Konzentrationen von Bilirubin, AST, ALT und Ammoniak sowie die PTZ haben hingegen keine signifikante Dynamik gezeigt.

Hinsichtlich der Assoziation von ET-1 mit dem ICG-Test sind die Ergebnisse der veröffentlichten Studien einheitlicher: In einem Rattenmodell für hämorrhagischen Schock ist die erhöhte Konzentration von ET-1 mit einer verringerten Plasmaverschwinderate von ICG assoziiert gewesen (116). Eine ähnliche Assoziation ist in einer klinischen Studie mit Patienten mit einer

chronischen Lebererkrankung präsentiert worden. Zusätzlich haben die Autoren auch eine moderate negative Korrelation zwischen den Syntheseleistungsparametern Albumin und PTZ festgestellt (117). Andere Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 sind ebenfalls mit den erwähnten Leberfunktionstests assoziiert (118-122). Es scheint jedoch, dass deren Auswirkung auf die Leber durch den ICG-Test früher sichtbar gemacht werden kann als durch die Messung der biochemischen Laborparameter. In einem Rattenmodell ist nach Injektion von LPS bereits nach einer Stunde eine erhebliche Erhöhung von TNF- $\alpha$  verzeichnet worden. Eine Erhöhung von ALT ist bis sechs Stunden nach der Injektion jedoch nicht festgestellt worden (118). Wang et al. haben hingegen beobachtet, dass es bereits einer Stunde nach der intravenösen Injektion von TNF- $\alpha$  zu einer pathologischen Veränderung des ICG-Tests kommt (10). Bei Tieren, die sechs Wochen lang mit einem hepatotoxischen Mittel vorbehandelt worden sind, sind die erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen korrelierend mit sämtlichen gemessenen Leberfunktionsparametern: ICG, AST, ALT, Bilirubin, Albumin und Gesamtcholesterin (120).

Es sei erwähnt, dass die direkte Vergleichbarkeit dieser Studien nur eingeschränkt möglich ist. Gründe hierfür sind unterschiedliche Tiermodelle oder Patientenkollektive mit unterschiedlichen Fragestellungen, Endpunkten und Pathologien.

Der LiMAX-Test könnte ein verlässliches Verfahren für die Diagnostik und Erforschung der Leberfunktion bei septischen Patienten sein, zumal seine höhere Genauigkeit im Vergleich zu biochemischen Laborparametern bei mehreren Leberpathologien wie bei hepatozellulärem Karzinom, Leberfibrose, Leberdysfunktion nach Chemotherapie und bei transplantierten Patienten erwiesen ist (36-38, 57, 123). Um den Stellenwert der einzelnen Testverfahren bei septischen Patienten zu eruieren, ist es unerlässlich, im Rahmen einer geeigneten klinisch-prospektiven Studie den LiMAX-Test, den ICG-Test und die Konzentration der biochemischen Laborparameter miteinander zu vergleichen. Möglicherweise könnte sich die Kombination aus mehreren Testverfahren gegenüber dem Einsatz eines einzelnen Verfahrens als überlegen erweisen.

Von großer Bedeutung sind auch die rechtzeitige Feststellung der Sepsis selbst, ihre sicherere Unterscheidung von anderen Immunreaktionen und die Vorhersage ihres Verlaufs bei jedem einzelnen Patienten. Rezente Studien zeigen vielversprechend, dass die Messung von Zytokinen als neue Biomarker unsere diagnostische Sicherheit erhöhen könnte (72, 75, 124). IL-6 könnte zu den Markern gehören, die eine hohe diagnostische Wertigkeit in der Vorhersage von Sepsis und ihrer Schweregrade bieten können. Es ist gezeigt worden, dass dieses Zytokin in Kombination mit PCT und CRP eine Sensitivität von über 80 % und eine Spezifität von 100 % erreichen kann (124).

Es ließe sich spekulieren, dass die aktuelle Sepsis-Definition in Zukunft von einer neuen Definition abgelöst werden könnte, die nicht wie bisher allein auf Kriterien wie einer akuten Zunahme des SOFA-Scores und der Laktat-Konzentration basiert, sondern zusätzlich auch die Höhe von mehreren relevanten Zytokinen berücksichtigt.

Immense Forschungsanstrengungen werden nicht nur in der Diagnostik und der Vorhersage von Sepsis unternommen, sondern auch in neuen Therapieansätzen, die aus den gewonnenen Erkenntnissen resultieren. Die isolierte Unterdrückung der Wirkung einzelner Zytokine wird bei zahlreichen inflammatorischen Krankheiten wie rheumatoider Arthritis, juveniler idiopathischer Arthritis, Colitis ulcerosa und Psoriasis erfolgreich eingesetzt (125, 126). Bei septischen Patienten findet diese Therapieform jedoch bis jetzt keinen Einzug in die klinische Routine (125-128). Dies ist u. a. auf fehlende Wirksamkeit oder schwerwiegende Nebenwirkungen im Rahmen von klinischen Studien zurückzuführen. Die komplexen biologischen Prozesse während einer Sepsis und die zahlreichen teilweise gegensätzlichen Funktionen eines jeden Zytokins sind sicherlich eine der Hauptgründe dafür, warum die positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs durch eine einfache Antagonisierung eines bestimmten Zytokins schwierig ist. Der rekombinante IL-1-Rezeptorantagonist Anakinra hat bislang als einer der wenigen Zytokininhibitoren im Rahmen einer erneuten Analyse einer Phase-III-Studie eine reduzierende Wirkung auf die 28-Tage-Mortalität bei septischen Patienten zeigen können (129). Steeland et al. haben vor Kurzem einen neuen Antikörper erprobt, der gleichzeitig TNFR1 und das Matrix-Metalloproteinase-8 inhibiert. Im Rahmen eines klinischen Pilotprojekts haben die Autoren mit diesem Wirkstoff eine Reduzierung des SOFA-Scores bewirken können (130). Es bleibt abzuwarten, ob sich einige rekombinante Zytokininhibitoren in Zukunft als wirkungsvoll erweisen können.

Die extrakorporale Hämoadsorption ist eine andere neuartige Therapiestrategie, die eine Regulierung der überschießenden Immunreaktion durch gleichzeitige Entfernung der Entzündungsmediatoren aus dem Blut zum Ziel hat (88). In Anbetracht des hochgradig komplexen humanen Immunsystems ist das ein schwieriges Unterfangen, das jedoch in den meisten klinischen Pilotstudien Hoffnung gemacht hat (131, 132). Wichtige Fragen im Hinblick auf den richtigen Zeitpunkt, die Dauer und die Häufigkeit des Einsatzes dieses Systems sind noch unbeantwortet. Auch die Beantwortung der Frage, ob eine solche Therapie für den septischen Patienten von Vorteil sein wird, bleibt abzuwarten. Noch fehlen aussagekräftige Studien zu diesem Thema. Die Fortführung der Forschung ist der sicherste und wahrscheinlich einzige Weg für die Erweiterung unserer Möglichkeiten im Kampf gegen Sepsis – eine Krankheit, die so häufig und zugleich so tödlich ist.

#### **4.7. Limitationen**

Eine Limitierung der vorliegenden Studie ist die geringe Anzahl der Patienten. Die SIRS-Gruppe mit lediglich fünf Patienten steht nicht im Gleichgewicht zur Sepsis-Gruppe. Weitere Limitierungen sind die geringe Anzahl der untersuchten Zytokine, die kurze Untersuchungsperiode von nur zehn Tagen, die geringe Anzahl der Untersuchungsintervalle und die Tatsache, dass nur ein Verfahren zur Ermittlung der Leberfunktion eingesetzt worden ist. Die dargelegten Ergebnisse erlauben es nicht, Aussagen über einen möglichen kausalen Zusammenhang zu treffen. Des Weiteren kann durch die präsentierten Zusammenhänge nicht auf den genauen Vorhersagewert der Zytokine im Hinblick auf die Prognose der Patienten geschlossen werden. Hierfür ist u. a. die Durchführung von Receiver-Operating-Characteristic-Analysen notwendig. Zukünftige Studien sollten eine größere Anzahl von Patienten über einen längeren Zeitraum und mit mehr Untersuchungsintervallen wissenschaftlich begleiten. Zur genaueren Eruiierung der Zusammenhänge zwischen Leber und Zytokinen sollten die Konzentrationen sämtlicher relevanten Immunmediatoren überwacht werden. Regressionsanalysen sollten zur Untersuchung von potenziellen kausalen Zusammenhängen zusätzlich zur Berechnung der Korrelationen durchgeführt werden. Zur Ermittlung der hepatischen Funktion sollten Verfahren verwendet werden, mit denen nicht nur die metabolische Kapazität, sondern auch die Exkretions- und Syntheseleistung der Leber gemessen werden können.

#### **4.8. Zusammenfassung**

Mit der vorliegenden Studie hat gezeigt werden können, dass es bereits wenige Stunden nach Entstehung der Sepsis bei der Mehrheit der Patienten zu einer deutlichen und im Verlauf progredienten Einschränkung der hepatischen Funktion kommt. ET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 könnten einen Einfluss auf das Ausmaß der hepatischen Dysfunktion haben. Während IL-6 auch bei SIRS-Patienten erhöhte Serumspiegel aufweist, scheinen ET-1 und TNF- $\alpha$  spezifischere proinflammatorische Mediatoren zu sein, die eine wichtige Rolle für den Verlauf der Sepsis darstellen. ET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 sind nicht nur bei septischen Patienten erhöht, sondern korrelieren mit dem Ausmaß der Leberdysfunktion, mit dem Schweregrad der Sepsis und mit dem Verlauf der Erkrankung. Aufgrund der Komplexität des Zusammenwirkens der pro- und antiinflammatorischen Zytokine in der Sepsis ist es schwierig herauszuarbeiten, ob die Zytokine selbst für eine septische Leberdysfunktion verantwortlich sind oder ob durch ein progredientes Leberversagen deren Serumspiegel auf hohem Niveau persistieren. Wahrscheinlich bedingt beides sich gegenseitig. Die komplexen Wirkungen von ET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 erschweren es, durch eine einfache Antagonisierung oder Suppression ihrer Freisetzung einen klaren Vorteil für den

Patienten zu erzielen. Für die Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation und Perfusion der Organe sowie deren Regeneration im Falle einer Schädigung, für den Schutz des Körpers gegenüber Krankheitserregern durch Regulierung des Immunsystems und letztlich für die Anpassung des Stoffwechsels an die sich ständig ändernden Umstände im Rahmen einer Sepsis sind all diese Zytokine unerlässlich. Studien wie die von Márquez et al. machen deutlich, dass nicht eine vollständige Deaktivierung von ET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 das Ziel sein kann, sondern eher eine Feinjustierung ihres Anteils im Blut. Auf diese Weise soll die physiologische Wirkung dieser Mediatoren vorhanden bleiben, ihr schädlicher Einfluss jedoch weitestgehend unterbunden werden. Hierfür ist es von immenser Bedeutung, unser Wissen über die Zusammenwirkung der einzelnen Mediatoren des Immunsystems zu erweitern. Weitere Studien sind notwendig, in denen nicht wie bisher die Suppression eines einzelnen Zytokins untersucht, sondern die pro- und antiinflammatorische Immunreaktion als Ganzes betrachtet und ihre Feinjustierung als Ziel gesetzt werden sollte.

## Literaturverzeichnis

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*. 2016;315(8):801-10.
2. Kempker JA, Martin GS. The Changing Epidemiology and Definitions of Sepsis. *Clinics in chest medicine*. 2016;37(2):165-79.
3. Kramer L, Jordan B, Druml W, Bauer P, Metnitz PG. Incidence and prognosis of early hepatic dysfunction in critically ill patients--a prospective multicenter study. *Critical care medicine*. 2007;35(4):1099-104.
4. Kaffarnik MF, Lock JF, Vetter H, Ahmadi N, Lojewski C, Malinowski M, Neuhaus P, Stockmann M. Early diagnosis of sepsis-related hepatic dysfunction and its prognostic impact on survival: a prospective study with the LiMAX test. *Critical care (London, England)*. 2013;17(5):R259.
5. Katz S, Jimenez MA, Lehmkuhler WE, Grosfeld JL. Liver bacterial clearance following hepatic artery ligation and portacaval shunt. *The Journal of surgical research*. 1991;51(3):267-70.
6. Strnad P, Tacke F, Koch A, Trautwein C. Liver - guardian, modifier and target of sepsis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2016.
7. Marquez-Velasco R, Bojalil R, Buelna A, Flores-Guzman F, Estevez-Ramirez J, Laguna J, Hernandez AM, Diaz-Quinonez A, Paniagua-Solis JF. Anti-tumor necrosis factor alpha F(ab')<sub>2</sub> antibody fragments protect in murine polymicrobial sepsis: concentration and early intervention are fundamental to the outcome. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2006;55(9):378-84.
8. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Critical care medicine*. 1993;21(10 Suppl):S415-22.
9. Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology*. 2002;122(1):202-10.
10. Wang P, Ba ZF, Chaudry IH. Mechanism of hepatocellular dysfunction during early sepsis. Key role of increased gene expression and release of proinflammatory cytokines tumor necrosis factor and interleukin-6. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 1997;132(4):364-9; discussion 9-70.
11. Wang P, Ayala A, Ba ZF, Zhou M, Perrin MM, Chaudry IH. Tumor necrosis factor-alpha produces hepatocellular dysfunction despite normal cardiac output and hepatic microcirculation. *The American journal of physiology*. 1993;265(1 Pt 1):G126-32.
12. Hassan W, Ding L, Gao RY, Liu J, Shang J. Interleukin-6 signal transduction and its role in hepatic lipid metabolic disorders. *Cytokine*. 2014;66(2):133-42.
13. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *The Journal of experimental medicine*. 1989;169(1):333-8.
14. Frink M, van Griensven M, Kobbe P, Brin T, Zeckey C, Vaske B, Krettek C, Hildebrand F. IL-6 predicts organ dysfunction and mortality in patients with multiple injuries. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*. 2009;17:49.
15. Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, Shin J, Nemzek JA. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock (Augusta, Ga)*. 2002;17(6):463-7.
16. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(5):878-88.

17. Schmidt-Arras D, Rose-John S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *Journal of hepatology*. 2016;64(6):1403-15.
18. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332(6163):411-5.
19. Bauer M, Zhang JX, Bauer I, Clemens MG. Endothelin-1 as a regulator of hepatic microcirculation: sublobular distribution of effects and impact on hepatocellular secretory function. *Shock (Augusta, Ga)*. 1994;1(6):457-65.
20. Schuetz P, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Bergmann A, Muller B. Circulating precursor levels of endothelin-1 and adrenomedullin, two endothelium-derived, counteracting substances, in sepsis. *Endothelium : journal of endothelial cell research*. 2007;14(6):345-51.
21. Baveja R, Kresge N, Ashburn JH, Keller S, Yokoyama Y, Sonin N, Zhang JX, Huynh T, Clemens MG. Potentiated hepatic microcirculatory response to endothelin-1 during polymicrobial sepsis. *Shock (Augusta, Ga)*. 2002;18(5):415-22.
22. Chen TW, Chu CM, Yu JC, Chen CJ, Chan DC, Liu YC, Hsieh CB. Comparison of clinical staging systems in predicting survival of hepatocellular carcinoma patients receiving major or minor hepatectomy. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2007;33(4):480-7.
23. Schneider PD. Preoperative assessment of liver function. *The Surgical clinics of North America*. 2004;84(2):355-73.
24. Burton JR, Jr., Rosen HR. Diagnosis and management of allograft failure. *Clinics in liver disease*. 2006;10(2):407-35, x.
25. Heidelbaugh JJ, Bruderly M. Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation. *American family physician*. 2006;74(5):756-62.
26. Lee SG, Hwang S. How I do it: assessment of hepatic functional reserve for indication of hepatic resection. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2005;12(1):38-43.
27. Peixoto RD, Hawley P. Intravenous lidocaine for cancer pain without electrocardiographic monitoring: a retrospective review. *Journal of palliative medicine*. 2015;18(4):373-7.
28. Klapdor R, Roose HJ. [Kinetics and metabolism of i.v. injected bromsulphthalein (BSP) in man]. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*. 1971;9(9):665-72.
29. Kanzler S, Teufel A, Galle PR. [Liver function test to predict hepatic failure after liver resection--expensive and without clinical relevance?]. *Zentralblatt fur Chirurgie*. 2007;132(4):267-73.
30. Armuzzi A, Candelli M, Zocco MA, Andreoli A, De Lorenzo A, Nista EC, Miele L, Cremonini F, Cazzato IA, Grieco A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Review article: breath testing for human liver function assessment. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2002;16(12):1977-96.
31. Mullin EJ, Metcalfe MS, Maddern GJ. How much liver resection is too much? *American journal of surgery*. 2005;190(1):87-97.
32. Leevy CM, Smith F, Longueville J, Paumgartner G, Howard MM. Indocyanine green clearance as a test for hepatic function. Evaluation by dichromatic ear densitometry. *Jama*. 1967;200(3):236-40.
33. Cherrick GR, Stein SW, Leevy CM, Davidson CS. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *The Journal of clinical investigation*. 1960;39:592-600.

34. Stockmann M, Malinowski M, Lock JF, Seehofer D, Neuhaus P. Factors influencing the indocyanine green (ICG) test: additional impact of acute cholestasis. *Hepato-gastroenterology*. 2009;56(91-92):734-8.
35. Stockmann M, Lock JF, Malinowski M, Niehues SM, Seehofer D, Neuhaus P. The LiMAX test: a new liver function test for predicting postoperative outcome in liver surgery. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2010;12(2):139-46.
36. Buechter M, Thimm J, Baba HA, Bertram S, Willuweit K, Gerken G, Kahraman A. Liver Maximum Capacity: A Novel Test to Accurately Diagnose Different Stages of Liver Fibrosis. *Digestion*. 2018:1-10.
37. Lock JF, Westphal T, Rubin T, Malinowski M, Schulz A, Jara M, Bednarsch J, Stockmann M. LiMAX Test Improves Diagnosis of Chemotherapy-Associated Liver Injury Before Resection of Colorectal Liver Metastases. *Ann Surg Oncol*. 2017;24(9):2447-55.
38. Blüthner E, Bednarsch J, Pape U-F, Karber M, Maasberg S, Gerlach UA, Pascher A, Wiedenmann B, Pratschke J, Stockmann M. Advanced liver function assessment in patients with intestinal failure on long-term parenteral nutrition. *Clin Nutr*. 2019.
39. Malinowski M, Jara M, Luttgert K, Orr J, Lock JF, Schott E, Stockmann M. Enzymatic liver function capacity correlates with disease severity of patients with liver cirrhosis: a study with the LiMAX test. *Digestive diseases and sciences*. 2014;59(12):2983-91.
40. Jara M, Malinowski M, Luttgert K, Schott E, Neuhaus P, Stockmann M. Prognostic value of enzymatic liver function for the estimation of short-term survival of liver transplant candidates: a prospective study with the LiMAX test. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2015;28(1):52-8.
41. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Critical care medicine*. 2003;31(4):1250-6.
42. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Critical care medicine*. 1985;13(10):818-29.
43. Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S. 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. *Critical care medicine*. 1998;26(11):1793-800.
44. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive care medicine*. 1996;22(7):707-10.
45. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *Jama*. 1993;270(24):2957-63.
46. Braden B, Faust D, Sarrazin U, Zeuzem S, Dietrich CF, Caspary WF, Sarrazin C. 13C-methacetin breath test as liver function test in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2005;21(2):179-85.
47. Jiang Z, Dragin N, Jorge-Nebert LF, Martin MV, Guengerich FP, Aklillu E, Ingelman-Sundberg M, Hammons GJ, Lyn-Cook BD, Kadlubar FF, Saldana SN, Sorter M, Vinks AA, Nassr N, von Richter O, Jin L, Nebert DW. Search for an association between the human CYP1A2 genotype and CYP1A2 metabolic phenotype. *Pharmacogenetics and genomics*. 2006;16(5):359-67.
48. Palmer CN, Coates PJ, Davies SE, Shephard EA, Phillips IR. Localization of cytochrome P-450 gene expression in normal and diseased human liver by in situ hybridization of wax-embedded archival material. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1992;16(3):682-7.

49. Jara M, Bednarsch J, Lock JF, Malinowski M, Schulz A, Seehofer D, Stockmann M. [Enhancing safety in liver surgery using a new diagnostic tool for evaluation of actual liver function capacity - The LiMAx test]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946). 2014;139(8):387-91.
50. Lock JF, Taheri P, Bauer S, Holzthutter HG, Malinowski M, Neuhaus P, Stockmann M. Interpretation of non-invasive breath tests using (13)C-labeled substrates--a preliminary report with (13)C-methacetin. *European journal of medical research*. 2009;14:547-50.
51. Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Immunoluminometric assay for measurement of the C-terminal endothelin-1 precursor fragment in human plasma. *Clinical chemistry*. 2006;52(6):1144-51.
52. Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A. Proteolytic processing pattern of the endothelin-1 precursor in vivo. *Peptides*. 2005;26(12):2482-6.
53. Nessler N, Launey Y, Aninat C, Morel F, Malledant Y, Seguin P. Clinical review: The liver in sepsis. *Critical care (London, England)*. 2012;16(5):235.
54. Kobashi H, Toshimori J, Yamamoto K. Sepsis-associated liver injury: Incidence, classification and the clinical significance. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2013;43(3):255-66.
55. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clinical chemistry*. 2000;46(12):2050-68.
56. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive care medicine*. 2004;30(4):580-8.
57. Lock JF, Schwabauer E, Martus P, Videv N, Pratschke J, Malinowski M, Neuhaus P, Stockmann M. Early diagnosis of primary nonfunction and indication for reoperation after liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2010;16(2):172-80.
58. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, Rochweg B, Rubenfeld GD, Angus DC, Annane D, Beale RJ, Bellinhan GJ, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith C, De Backer DP, French CJ, Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones AE, Karnad DR, Kleinpell RM, Koh Y, Lisboa TC, Machado FR, Marini JJ, Marshall JC, Mazuski JE, McIntyre LA, McLean AS, Mehta S, Moreno RP, Myburgh J, Navalesi P, Nishida O, Osborn TM, Perner A, Plunkett CM, Ranieri M, Schorr CA, Seckel MA, Seymour CW, Shieh L, Shukri KA, Simpson SQ, Singer M, Thompson BT, Townsend SR, Van der Poll T, Vincent J-L, Wiersinga WJ, Zimmerman JL, Dellinger RP. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Critical care medicine* 2017. p. 486-552.
59. Piechota M, Banach M, Irzmanski R, Barylski M, Piechota-Urbanska M, Kowalski J, Pawlicki L. Plasma endothelin-1 levels in septic patients. *Journal of intensive care medicine*. 2007;22(4):232-9.
60. Kothari N, Bogra J, Abbas H, Kohli M, Malik A, Kothari D, Srivastava S, Singh PK. Tumor necrosis factor gene polymorphism results in high TNF level in sepsis and septic shock. *Cytokine*. 2013;61(2):676-81.
61. Lin S, Huang Z, Wang M, Weng Z, Zeng D, Zhang Y, Zhu Y, Jiang J. Interleukin-6 as an early diagnostic marker for bacterial sepsis in patients with liver cirrhosis. *Journal of critical care*. 2015.
62. Marzi I. [The significance of the liver for the course of SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) following shock, trauma and during sepsis]. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS*. 1994;29(1):41-6.

63. Deng M, Scott MJ, Loughran P, Gibson G, Sodhi C, Watkins S, Hackam D, Billiar TR. Lipopolysaccharide clearance, bacterial clearance, and systemic inflammatory responses are regulated by cell type-specific functions of TLR4 during sepsis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2013;190(10):5152-60.
64. Kowalczyk A, Kleniewska P, Kolodziejczyk M, Skibska B, Goraca A. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2015;63(1):41-52.
65. Szabo G, Romics L, Jr., Frenzl G. Liver in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Clinics in liver disease*. 2002;6(4):1045-66, x.
66. Wiezer MJ, Meijer C, Vuylsteke R, Pullens RH, Prins HA, Cuesta MA, Meijer S, Hack CE, van Leeuwen PA. Is major liver surgery associated with an increased systemic inflammatory response? A prospective comparison of hemihepatectomy and other major abdominal surgery. *Liver*. 1999;19(3):220-7.
67. Ratti F, Pulitano C, Catena M, Paganelli M, Aldrighetti L. Serum levels of endothelin-1 after liver resection as an early predictor of postoperative liver failure. A prospective study. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2016;46(6):529-40.
68. Battistini B, Forget MA, Laight D. Potential roles for endothelins in systemic inflammatory response syndrome with a particular relationship to cytokines. *Shock* (Augusta, Ga). 1996;5(3):167-83.
69. Plank LD, Hill GL. Sequential metabolic changes following induction of systemic inflammatory response in patients with severe sepsis or major blunt trauma. *World journal of surgery*. 2000;24(6):630-8.
70. Giannoudis PV, Harwood PJ, Loughenbury P, Van Griensven M, Krettek C, Pape HC. Correlation between IL-6 levels and the systemic inflammatory response score: can an IL-6 cutoff predict a SIRS state? *J Trauma*. 2008;65(3):646-52.
71. Riese J, Schoolmann S, Beyer A, Denzel C, Hohenberger W, Haupt W. Production of IL-6 and MCP-1 by the human peritoneum in vivo during major abdominal surgery. *Shock* (Augusta, Ga). 2000;14(2):91-4.
72. Matsumoto H, Ogura H, Shimizu K, Ikeda M, Hirose T, Matsuura H, Kang S, Takahashi K, Tanaka T, Shimazu T. The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Scientific reports*. 2018;8(1):13995.
73. Li X, Yan B. Research on the effect of cytokine concentration on the immune level and survival conditions of elderly patients with sepsis. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;16(2):842-6.
74. Wang L, Zhao H, Wang D. Inflammatory cytokine expression in patients with sepsis at an intensive care unit. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;16(3):2126-31.
75. Dolin HH, Papadimos TJ, Stepkowski S, Chen X, Pan ZK. A Novel Combination of Biomarkers to Herald the Onset of Sepsis Prior to the Manifestation of Symptoms. *Shock* (Augusta, Ga). 2018;49(4):364-70.
76. Peters K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovascular research*. 2003;60(1):49-57.
77. Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, Oldner A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. *European journal of pharmacology*. 2000;407(1-2):1-15.
78. Tanikawa K. Hepatic sinusoidal cells and sinusoidal circulation. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 1995;10 Suppl 1:S8-11.
79. Ebach DR, Riehl TE, Stenson WF. Opposing effects of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 in sepsis due to cecal ligation and puncture. *Shock* (Augusta, Ga). 2005;23(4):311-8.
80. Yan J, Li S, Li S. The role of the liver in sepsis. *International reviews of immunology*. 2014;33(6):498-510.

81. Vary TC, Kimball SR. Regulation of hepatic protein synthesis in chronic inflammation and sepsis. *The American journal of physiology*. 1992;262(2 Pt 1):C445-52.
82. Dhainaut JF, Shorr AF, Macias WL, Kollef MJ, Levi M, Reinhart K, Nelson DR. Dynamic evolution of coagulopathy in the first day of severe sepsis: relationship with mortality and organ failure. *Critical care medicine*. 2005;33(2):341-8.
83. Kruttgen A, Rose-John S. Interleukin-6 in sepsis and capillary leakage syndrome. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2012;32(2):60-5.
84. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*. 1996;274(5291):1379-83.
85. Buendgens L, Yagmur E, Bruensing J, Herbers U, Baeck C, Trautwein C, Koch A, Tacke F. C-terminal proendothelin-1 (CT-proET-1) is associated with organ failure and predicts mortality in critically ill patients. *J Intensive Care*. 2017;5(1):25.
86. Wereszczynka-Siemiatkowska U, Swidnicka-Siergiejko A, Siemiatkowski A, Bondyra Z, Wasielica-Berger J, Mroczko B, Janica J, Dabrowski A. Endothelin 1 and transforming growth factor- $\beta$ 1 correlate with liver function and portal pressure in cirrhotic patients. *Cytokine*. 2015;76(2):144-51.
87. Faitot F, Besch C, Lebas B, Addeo P, Ellero B, Woehl-Jaegle M-L, Namer I-J, Bachellier P, Freys G. Interleukin 6 at reperfusion: A potent predictor of hepatic and extrahepatic early complications after liver transplantation. *Clinical transplantation*. 2018;32(9):e13357.
88. Houshyar KS, Pyles MN, Rein S, Nietzschmann I, Duscher D, Maan ZN, Weissenberg K, Philipps HM, Strauss C, Reichelt B, Siemers F. Continuous hemoadsorption with a cytokine adsorber during sepsis - a review of the literature. *The International journal of artificial organs*. 2017;40(5):205-11.
89. Sanchez-Etayo G, Borrat X, Escobar B, Hessheimer A, Rodriguez-Laiz G, Taura P. Effect of intra-abdominal pressure on hepatic microcirculation: implications of the endothelin-1 receptor. *J Dig Dis*. 2012;13(9):478-85.
90. Wu R, Dong W, Zhou M, Cui X, Hank Simms H, Wang P. Ghrelin improves tissue perfusion in severe sepsis via downregulation of endothelin-1. *Cardiovascular research*. 2005;68(2):318-26.
91. Shuh M, Bohorquez H, Loss GE, Jr., Cohen AJ. Tumor Necrosis Factor-alpha: Life and Death of Hepatocytes During Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *The Ochsner journal*. 2013;13(1):119-30.
92. Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrissey PJ, Ware CB, Mohler KM. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998;160(2):943-52.
93. Trautwein C, Rakemann T, Niehof M, Rose-John S, Manns MP. Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterology*. 1996;110(6):1854-62.
94. Ma L, Zhang H, Yin YL, Guo WZ, Ma YQ, Wang YB, Shu C, Dong LQ. Role of interleukin-6 to differentiate sepsis from non-infectious systemic inflammatory response syndrome. *Cytokine*. 2016;88:126-35.
95. Rubin TM, Heyne K, Luchterhand A, Jan B, W R Vondran F, Polychronidis G, Malinowski M, Nikolic A, Tautenhahn H-M, Jara M, Wunsch T, Stockmann M, Friso Lock J. Kinetic validation of the LiMAx test during 10 000 intravenous  $^{13}\text{C}$ -methacetin breath tests. *J Breath Res*. 2017;12(1):016005.
96. Giamarellos-Bourboulis EJ, Norrby-Teglund A, Mylona V, Savva A, Tsangaris I, Dimopoulou I, Mouktaroudi M, Raftogiannis M, Georgitsi M, Linner A, Adamis G,

- Antonopoulou A, Apostolidou E, Chrisofos M, Katsenos C, Koutelidakis I, Kotzampassi K, Koratzanis G, Koupetori M, Kritselis I, Lymberopoulou K, Mandragos K, Marioli A, Sundén-Cullberg J, Mega A, Prekates A, Routsis C, Gogos C, Treutiger CJ, Armaganidis A, Dimopoulos G. Risk assessment in sepsis: a new prognostication rule by APACHE II score and serum soluble urokinase plasminogen activator receptor. *Critical care (London, England)*. 2012;16(4):R149.
97. Meyer AA, Messick WJ, Young P, Baker CC, Fakhry S, Muakkassa F, Rutherford EJ, Napolitano LM, Rutledge R. Prospective comparison of clinical judgment and APACHE II score in predicting the outcome in critically ill surgical patients. *J Trauma*. 1992;32(6):747-53; discussion 53-4.
98. Brauner JS, Rohde LE, Clausell N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha: early predictors of mortality in patients with septic shock. *Intensive care medicine*. 2000;26(3):305-13.
99. Kartal ED, Karkac E, Gulbas Z, Alpat SN, Erben N, Colak E. Several Cytokines and Protein C Levels with the Apache II Scoring System for Evaluation of Patients with Sepsis. *Balkan Med J*. 2012;29(2):174-8.
100. Barre M, Behnes M, Hamed S, Pauly D, Lepiorz D, Lang S, Akin I, Borggreffe M, Bertsch T, Hoffmann U. Revisiting the prognostic value of monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin-6 in the sepsis-3 era. *Journal of critical care*. 2018;43:21-8.
101. Charles P-E, Péju E, Dantec A, Bruyère R, Meunier-Beillard N, Dargent A, Prin S, Wilson D, Quenot J-P. Mr-Proadm Elevation Upon Icu Admission Predicts the Outcome of Septic Patients and is Correlated with Upcoming Fluid Overload. *Shock (Augusta, Ga)*. 2017;48(4):418-26.
102. Calandra T, Baumgartner JD, Grau GE, Wu MM, Lambert PH, Schellekens J, Verhoef J, Glauser MP. Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon-alpha, and interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. *Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. The Journal of infectious diseases*. 1990;161(5):982-7.
103. Naffaa M, Makhoul BF, Tobia A, Kaplan M, Aronson D, Saliba W, Azzam ZS. Interleukin-6 at discharge predicts all-cause mortality in patients with sepsis. *The American journal of emergency medicine*. 2013;31(9):1361-4.
104. Reinhart K, Menges T, Gardlund B, Harm Zwaveling J, Smithes M, Vincent JL, Tellado JM, Salgado-Remigio A, Zimlichman R, Withington S, Tschaikowsky K, Brase R, Damas P, Kupper H, Kempeni J, Eiselstein J, Kaul M. Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study. *Critical care medicine*. 2001;29(4):765-9.
105. Iskit AB, Senel I, Sokmensuer C, Guc MO. Endothelin receptor antagonist bosentan improves survival in a murine caecal ligation and puncture model of septic shock. *European journal of pharmacology*. 2004;506(1):83-8.
106. Lundblad R, Nesland JM, Giercksky KE. Granulocyte colony-stimulating factor improves survival rate and reduces concentrations of bacteria, endotoxin, tumor necrosis factor, and endothelin-1 in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. *Critical care medicine*. 1996;24(5):820-6.
107. van der Poll T. Tumor necrosis factor inhibition in severe sepsis: a promise not fulfilled\*. *Critical care medicine*. 2014;42(3):724-5.
108. Bernard GR, Francois B, Mira JP, Vincent JL, Dellinger RP, Russell JA, Larosa SP, Laterre PF, Levy MM, Dankner W, Schmitt N, Lindemann J, Wittebole X. Evaluating the Efficacy and Safety of Two Doses of the Polyclonal Anti-Tumor Necrosis Factor-alpha Fragment Antibody AZD9773 in Adult Patients With Severe Sepsis and/or Septic Shock: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase IIb Study\*. *Critical care medicine*. 2014;42(3):504-11.

109. Vyas D, Javadi P, Dipasco PJ, Buchman TG, Hotchkiss RS, Coopersmith CM. Early antibiotic administration but not antibody therapy directed against IL-6 improves survival in septic mice predicted to die on basis of high IL-6 levels. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2005;289(4):R1048-53.
110. Riedemann NC, Neff TA, Guo RF, Bernacki KD, Laudes IJ, Sarma JV, Lambris JD, Ward PA. Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;170(1):503-7.
111. Barkhausen T, Tschernig T, Rosenstiel P, van Griensven M, Vonberg RP, Dorsch M, Mueller-Heine A, Chalaris A, Scheller J, Rose-John S, Seegert D, Krettek C, Waetzig GH. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Critical care medicine*. 2011;39(6):1407-13.
112. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K, International Forum of Acute Care T. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(3):259-72.
113. Sakka SG. Assessment of liver perfusion and function by indocyanine green in the perioperative setting and in critically ill patients. *J Clin Monit Comput*. 2018;32(5):787-96.
114. Stehr A, Ploner F, Traeger K, Theisen M, Zuelke C, Radermacher P, Matejovic M. Plasma disappearance of indocyanine green: a marker for excretory liver function? *Intensive care medicine*. 2005;31(12):1719-22.
115. Feng Z-y, Xu X, Wu L-j, Wu J, Zhu S-m, Zheng S-s. Downregulation of endothelin-1 by somatostatin improves liver function of recipients undergoing adult-to-adult living donor liver transplantation. *Chinese medical journal*. 2010;123(15):1961-6.
116. Kubulus D, Mathes A, Reus E, Pradarutti S, Pavlidis D, Thierbach J-T, Heiser J, Wolf B, Bauer I, Rensing H. Endothelin-1 contributes to hemoglobin glutamer-200-mediated hepatocellular dysfunction after hemorrhagic shock. *Shock (Augusta, Ga)*. 2009;32(2):179-89.
117. Matsumoto H, Uemasu J, Kitano M, Kawasaki H. Clinical significance of plasma endothelin-1 in patients with chronic liver disease. *Digestive diseases and sciences*. 1994;39(12):2665-70.
118. Fang H, Liu A, Chen X, Cheng W, Dirsch O, Dahmen U. The severity of LPS induced inflammatory injury is negatively associated with the functional liver mass after LPS injection in rat model. *J Inflamm (Lond)*. 2018;15(1):21.
119. Li L, Duan C, Zhao Y, Zhang X, Yin H, Wang T, Huang C, Liu S, Yang S, Li X. Preventive effects of interleukin-6 in lipopolysaccharide/d-galactosamine induced acute liver injury via regulating inflammatory response in hepatic macrophages. *International immunopharmacology*. 2017;51:99-106.
120. Breikaa RM, Algardaby MM, El-Demerdash E, Abdel-Naim AB. Multimechanistic antifibrotic effect of biochanin a in rats: implications of proinflammatory and profibrogenic mediators. *PloS one*. 2013;8(7):e69276.
121. Yang S, Zhou M, Chaudry IH, Wang P. Norepinephrine-induced hepatocellular dysfunction in early sepsis is mediated by activation of alpha2-adrenoceptors. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2001;281(4):G1014-21.
122. Szalay L, Shimizu T, Suzuki T, Yu H-P, Choudhry MA, Schwacha MG, Rue LW, Bland KI, Chaudry IH. Estradiol improves cardiac and hepatic function after trauma-hemorrhage: role of enhanced heat shock protein expression. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2006;290(3):R812-8.
123. Wuensch T, Heucke N, Wizenty J, Quint J, Sinn B, Arsenic R, Jara M, Kaffarnik M, Pratschke J, Stockmann M. Hepatic CYP1A2 activity in liver tumors and the implications for preoperative volume-function analysis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2019;316(5):G608-G14.

124. Shao W-X, Yu D-J, Zhang W-Y, Wang X-J. Clinical Significance of Interleukin-6 in the Diagnosis of Sepsis and Discriminating Sepsis Induced by Gram-negative Bacteria. *Pediatr Infect Dis J*. 2018;37(8):801-5.
125. Steeland S, Libert C, Vandenbroucke RE. A New Venue of TNF Targeting. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):1442.
126. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy*. 2016;8(8):959-70.
127. Guazzi M, Gomberg-Maitland M, Naeije R. Impact of pharmacologic interventions--treating endothelial dysfunction and group 2 pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis*. 2015;57(5):473-9.
128. Freeman BD, Machado FS, Tanowitz HB, Desruisseaux MS. Endothelin-1 and its role in the pathogenesis of infectious diseases. *Life sciences*. 2014;118(2):110-9.
129. Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW, Amdur RL, Zhao H, Dinarello CA, Cron RQ, Opal SM. Interleukin-1 Receptor Blockade Is Associated With Reduced Mortality in Sepsis Patients With Features of Macrophage Activation Syndrome: Reanalysis of a Prior Phase III Trial. *Critical care medicine*. 2016;44(2):275-81.
130. Steeland S, Van Ryckeghem S, Vandewalle J, Ballegeer M, Van Wonterghem E, Eggermont M, Decruyenaere J, De Bus L, Libert C, Vandenbroucke RE. Simultaneous Inhibition of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 and Matrix Metalloproteinase 8 Completely Protects Against Acute Inflammation and Sepsis. *Critical care medicine*. 2018;46(1):e67-e75.
131. Hawchar F, László I, Öveges N, Trásy D, Ondrik Z, Molnar Z. Extracorporeal cytokine adsorption in septic shock: A proof of concept randomized, controlled pilot study. *Journal of critical care*. 2019;49:172-8.
132. Friesecke S, Stecher S-S, Gross S, Felix SB, Nierhaus A. Extracorporeal cytokine elimination as rescue therapy in refractory septic shock: a prospective single-center study. *J Artif Organs*. 2017;20(3):252-9.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Navid Ahmadi, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Zusammenhang zwischen CT-proET-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 mit der hepatischen Dysfunktion bei Sepsis selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum 07.06.2019

Unterschrift

## Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Navid Ahmadi hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Kaffarnik MF, Ahmadi N, Lock JF, Wuensch T, Pratschke J, Stockmann M, Malinowski M. Correlation between plasma endothelin-1 levels and severity of septic liver failure quantified by maximal liver function capacity (LiMAX test). A prospective study. PloS one. 2017;12(5):e0178237.

Anteilerklärung:

Folgende Tätigkeiten wurden mindestens zur Hälfte von Navid Ahmadi durchgeführt:

Vorbereitung und Verfassung des Ethikantrags sowie Organisation der Studie; Rekrutierung, Aufklärung und Einschluss der Patienten in die Studie; Durchführung sämtlicher für die Studie notwendigen Untersuchungen (z. B. Leberfunktionstest) und Blutabnahmen; Vorbereitung und Lagerung der Blutproben.

Die Durchführung des immunologischen Nachweisverfahrens für die Konzentrationsbestimmung der Zytokine in den Blutproben führte Navid Ahmadi in Zusammenarbeit mit einer Medizinisch-technischen Assistentin durch.

Die Auswertung der Daten und die Erstellung der Tabellen und Grafiken führte Navid Ahmadi alleine durch. Des Weiteren wirkte er maßgeblich an der Überarbeitung und Korrektur des Manuskripts mit.

Publikation 2:

Kaffarnik MF, Lock JF, Vetter H, Ahmadi N, Lojewski C, Malinowski M, Neuhaus P, Stockmann M. Early diagnosis of sepsis-related hepatic dysfunction and its prognostic impact on survival: a prospective study with the LiMAX test. *Critical care (London, England)*. 2013;17(5):R259.

Anteilerklärung:

Folgende Tätigkeiten wurden mindestens zur Hälfte von Navid Ahmadi durchgeführt:

Vorbereitung und Verfassung des Ethikantrags sowie Organisation der Studie; Rekrutierung, Aufklärung und Einschluss der Patienten in die Studie; Durchführung sämtlicher für die Studie notwendigen Untersuchungen (z. B. Leberfunktionstest) und Blutabnahmen; Vorbereitung und Lagerung der Blutproben; Verwaltung und Auswertung der Daten sowie Erstellung der Tabellen und Grafiken für die Publikation.

Unterschrift des Doktoranden

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





**Publikationsliste**

Honeder C\*, **Ahmadi N\***, Kramer A-M, Zhu C, Saidov N, Arnoldner C. Cochlear Implantation in the Guinea Pig. Journal of visualized experiments : JoVE. 2018(136):e56829-e.

Zhu C, Gausterer JC, Schopper H, Nieratschker M, Saidov N, **Ahmadi N**, Honeder C, Gabor F, Arnoldner C. Evaluation of Sustained-Release Steroid Hydrogels in a Guinea Pig Model for Noise-Induced Hearing Loss. Audiology & neuro-otology. 2018;23(2):73-81.

Kaffarnik MF, **Ahmadi N**, Lock JF, Wuensch T, Pratschke J, Stockmann M, Malinowski M. Correlation between plasma endothelin-1 levels and severity of septic liver failure quantified by maximal liver function capacity (LiMAX test). A prospective study. PloS one. 2017;12(5):e0178237.

Kaffarnik MF, Lock JF, Vetter H, **Ahmadi N**, Lojewski C, Malinowski M, Neuhaus P, Stockmann M. Early diagnosis of sepsis-related hepatic dysfunction and its prognostic impact on survival: a prospective study with the LiMAX test. Critical care (London, England). 2013;17(5):R259.

## **Danksagung**

Es ist mir eine große Freude, mich an dieser Stelle beim Vorstand meiner Forschungsgruppe, Herrn Prof. Dr. med. Martin Stockmann, bedanken zu können. Seine hervorragenden Arbeiten und die durchdachten Strukturen, die er in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin geschaffen hat, sind stets ein Quell der Inspiration für meine Forschungsarbeit gewesen. Durch seine Kompetenz und gekonnte Leitung der Forschungsgruppe ist es mir möglich gewesen, Wissenschaft auf hohem Niveau zu betreiben.

Mein herzlicher Dank geht ebenso an meinen geschätzten Kollegen, Vorgesetzten, Betreuer und Lehrer, Herrn Dr. med. Magnus Kaffarnik. Ich habe viel von ihm gelernt. Er hat mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Auf seine Kompetenz und Erfahrung habe ich mich immer verlassen können. Und seine angenehme und offenherzige Persönlichkeit hat diese Arbeit für mich mit sehr viel Freude verbunden.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Solvy Wolke. Als Medizinisch-technische Assistentin hat sie eine unverzichtbare Schlüsselrolle bei diesem Forschungsprojekt gespielt. Ihr Wissen und ihre Erfahrung sind ein großer Gewinn für die vorliegende Arbeit gewesen. Ich freue mich, dass ich mit ihr habe zusammenarbeiten dürfen.

Ein großes Dankeschön geht zudem an alle Kolleginnen und Kollegen auf den chirurgischen und anästhesiologischen Intensivstationen im Campus-Virchow-Klinikum. Die Ärztinnen und Ärzte wie auch die Schwestern und Pfleger dort haben durch ihren unermüdlichen Einsatz die Untersuchung von Studienpatienten und die Entstehung der Daten für die vorliegende Arbeit erst ermöglicht.

Zusammenfassend gilt mein Dank allen Personen, Institutionen und Laboratorien, die ihren Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben, auch wenn sie hier nicht explizit genannt sind.