

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

DISSERTATION

Untersuchung zur Outcome-Relevanz
einer Chitotriosidase 1-Mutation bei intensivstationär behandelten
Patienten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Susanne Heim

aus Münster

Datum der Promotion 27.02.2015

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt (deutsch)	5
Abstract (English)	7
1. Einleitung	9
1.1. Chitinasen	10
1.2. Chitin	10
1.3. Bedeutung der humanen Chitotriosidase 1	11
1.4. Mögliche Funktionen	11
1.5. Genetische Codierung der Chitotriosidase 1 und Defizienz	12
1.6. Vorkommen	13
1.7. Fragestellung	13
2. Methodik	14
2.1. Patienten	14
2.1.1. Erfassungszeitraum und Ort	14
2.1.2. Einwilligung	14
2.1.3. Patientenauswahl	14
2.2. Datenerhebung	16
2.2.1 Überblick	16
2.2.2. Patientendaten aus COPRA	16
2.2.3. Patientendaten aus MedVision	17
2.2.4. Patienten-Parameter	17
2.3. Krankheitsschwere-Scores	19
2.3.1. Scores zur Bestimmung des Krankheitsschweregrades und zur Risikoeinschätzung	19
2.3.2. SAPS II	19
2.3.4. SOFA	20
2.3.4. TISS-28	21
2.4. Infektion und mikrobiologische Befunde	22
2.4.1. Mikrobiologische Befunde	22
2.4.2. Entzündungsparameter	23
2.4.3. SIRS und Sepsis	23
2.5. Material und Methoden zur DNA-Analyse und Messung der Enzymaktivität	24
2.5.1. Probengewinnung und Bestimmung des Genotyps	24

2.5.2. Bestimmung der Chitotriosidase 1-Aktivität	26
2.6. Statistik	26
2.6.1. Aufteilung der Kohorte	26
2.6.2. Statistische Berechnungen - Charakterisierung, Signifikanz und Bewertung	27
3. Ergebnisse	28
3.1. Basischarakteristika	28
3.2. Enzymaktivität	28
3.3. Vorerkrankungen	29
3.4. Erkrankungen während des intensivstationären Aufenthaltes	30
3.4.1. Auftreten von Infektionen in Hinsicht auf Infektionsfokusse	30
3.4.2. Auftreten von Infektionen in Hinsicht auf Erregertypen	31
3.5. Krankheitsschwere während des intensivstationären Aufenthaltes	32
3.5.1. Krankheitsschwere-Scores am Aufnahmetag	32
3.5.2. Krankheitsschwere-Scores im Verlauf	32
3.6. Parameter der Behandlungsqualität	35
3.6.1. Liegedauer und Mortalität als Parameter für die Behandlungsqualität	35
3.6.2. Konfounderanalyse zur Beurteilung des Einflusses neurologischer Vorerkrankung und Krankheitsschwere auf den Endpunkt Mortalität	35
3.6.3. Auftreten von SIRS oder Sepsis	36
4. Diskussion	40
4.1. Hauptergebnis	40
4.2. Voraussetzungen	40
4.3. Basischarakteristika und Prävalenz	41
4.4. Enzymaktivität	41
4.5. Vorerkrankungen	41
4.6. Infektion und Immunabwehr	42
4.6.1. Fokus	43
4.6.2. Gram-negative und gram-positive Erreger, Biofilmbildner	43
4.6.3. Mykosen	44
4.6.4. Multiresistente Erreger	45
4.6.5. Krankheitsschwere	45
4.7. Behandlungsqualität	46

4.8. SIRS, Sepsis	47
4.9. Ausblick	48
4.10. Zusammenfassung	50
5. Verzeichnisse	51
5.1. Literatur	51
5.2. Abbildungen	57
5.3. Grafiken	57
5.4. Tabellen	57
5.5. Abkürzungen	58
6. Eidesstattliche Versicherung	59
6.1. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen	60
7. Lebenslauf (Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.)	61
8. Wissenschaftliche Veröffentlichung/Artikel	62
9. Danksagung	63

Abstrakt (deutsch)

Humane Chitotriosidase 1 (Chit 1) ist ein hochkonserviertes Enzym, das Chitin hydrolysieren kann und dessen physiologische Funktion im Menschen bislang nicht bekannt ist. Ein funktioneller Zusammenhang mit dem angeborenen Immunsystem gilt als naheliegend. Ziel dieser Studie war es, zu zeigen, ob bei schwerstkranken Intensiv-Patienten ein alternierender Krankheitsverlauf auftritt, falls ein Chit 1-Polymorphismus zur Aktivitätsreduktion oder sogar Inaktivierung des codierten Enzyms führt.

Methodik: prospektive, kontrollierte, nicht interventionelle, klinische Observationsstudie auf 5 anästhesiologischen Intensivstationen der Charité - Universitätsmedizin Berlin. In zwei Beobachtungszeiträumen (02-05/2007, 09-11/2008) wurden 200 Patienten mit hoher Krankheitsschwere (SAPS II \geq 65) eingeschlossen und deren intensivstationärer Krankheitsverlauf täglich dokumentiert. Nach Abschluss der Beobachtung wurde die Kohorte bezüglich einer Chit 1-Mutation genotypisiert und in Träger und Nicht-Träger des Chit 1-inaktivierenden Polymorphismus unterteilt. Primärer Endpunkt war der Verlauf der Krankheitsschwere anhand von validierten Scores (SAPS II, SOFA, TISS-28). Sekundär wurden Infektionen und Erregernachweise, die Inzidenz von SIRS und Sepsis und Parameter der Behandlungsqualität verglichen. Die Untersuchung erfolgte mit Zustimmung der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Studie EA1/117/06. Ein positives Datenschutzvotum wurde erteilt.

Ergebnisse: Es wurden 129 Nichtträger und 71 hetero- bzw. homozygote Träger des Chit 1-Polymorphismus in die Studie eingeschlossen. Basischarakteristika und Vorerkrankungen waren homogen verteilt. Am Aufnahmetag unterschieden sich die Werte des Krankheitsschwerescores SAPS II₁ zwischen beiden Gruppen nicht signifikant [Median 53 vs 55, $p = 0,178$], dagegen bestand eine signifikant geringere Krankheitsschwere für die Träger der Mutation beim SOFA₁ [Median 8 vs. 7, $p = 0,004$] und TISS - 28₁ [Median 44 vs 38, $p = 0,008$]. Im Verlauf zeigten sich bei SAPS II, SOFA und TISS-28 signifikante Unterschiede der Krankheitsschwere [$p = 0,04749$, $p = 0,01361$, $p = 0,04889$]: Während bei Patienten mit intakter Enzymfunktion die Krankheitsschwere sukzessive abnahm, stagnierte bei Mutationsträgern die hohe Krankheitsschwere. Auftreten und Dynamik von SIRS, Sepsis, Behandlungsdauer und Mortalität zeigten keinerlei signifikante Unterschiede. Die Suszeptibilität für gram-negative Erreger zeigte eine Tendenz zugunsten der Träger der Mutation.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen im Vergleich zwischen beiden untersuchten Populationen einen signifikanten Unterschied zu Lasten der Mutationsträger bezüglich der Krankheitsschwere im Verlauf anhand der Scores SAPS II, SOFA und TISS-28. Kein statistisch signifikanter Unterschied war darstellbar bei Basischarakteristika, Infektionsverteilung, Erregern, dem Vorkommen bzw. der Dynamik im Auftreten von SIRS bzw. Sepsis, der intensivstationären Behandlungsdauer und der Mortalität.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Untersuchung ein Polymorphismus der Chit 1 einen Einfluss auf die Krankheitsschwere hatte, nicht jedoch auf den Behandlungsverlauf. Ein ursächlicher Zusammenhang konnte nicht gefunden werden.

Abstract (English)

Human Chitotriosidase 1 (Chit 1) is a chitinolytic enzyme whose physiological function in humans is widely unknown. A relation to the congenital immunosystem is assumed. Purpose of this study was to detect, whether critically ill patients' course of disease in intensive care was altered, if a polymorphism of Chit 1 was reducing or inactivating this enzyme's activity.

Methodology: Prospective, controlled, non interventional, clinical, observational trial involving 5 anesthesiological Intensive Care Units (ICU) of the Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Charité - University Medicine Berlin.

200 critically ill patients (SAPS II ≥ 65) were selected (02-05/2007, 09-11/2008). Their course of disease was studied daily. After collecting this data the cohort was genotyped concerning a mutation in Chit 1-gene and divided into carriers and non-carriers of this inactivating polymorphism. Primary endpoint was the course of disease and its severity measured by validated scores (SAPS II, SOFA, TISS-28). Secondary infections and correlation with causative organisms were inspected. This study was approved by the Ethical Committee of Charité - University Medicine Berlin with study EA1/117/06. A vote of data privacy protection has been issued.

Results: 129 non-carriers and 71 hetero-/homozygote carriers of a Chit 1-polymorphism were accepted. Basic characteristics and comorbidities were distributed homogeneously. On the day of admission no significant difference between groups was seen concerning SAPS II₁-values [median 53 vs. 55, $p = 0,178$], but SOFA₁ [median 8 vs. 7, $p = 0,004$] and TISS-28₁ [median 44 vs. 38, $p = 0,008$] showed significantly lower values for carriers of the Polymorphism.

In contrast during ICU-stay SAPS II, SOFA and TISS-28 showed a significant difference concerning the severity of disease [$p = 0,04749$, $p = 0,01361$, $p = 0,04889$]: while in non-carriers severity of disease gradually decreased, this stayed on high levels in carriers of the polymorphism.

Incidence and dynamics of SIRS and sepsis, duration of stay and mortality showed no significant difference. Concerning susceptibility for gram-negative organisms a tendency to be at risk was seen for carriers of the mutation.

Conclusion: The results of this trial showed a significant difference concerning severity of disease during ICU-stay with a disadvantage for carriers of the Chit 1-polymorphism.

No statistically significant difference could be proved concerning basic characteristics, infections, causative organisms, incidence and dynamics of SIRS or sepsis, duration of stay and mortality.

In short: in this trial a polymorphism of Chit 1 did influence the severity of disease but not the course of stay. A causative relation could not be detected.

1. Einleitung

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich damit, ob bei schwerstkranken Patienten unter intensivstationärer Behandlung ein alternierender Krankheitsverlauf auftritt, falls ein Polymorphismus am humanen Chitotriosidase 1-Gen zur Aktivitätsreduktion oder sogar Inaktivierung des betreffenden Enzyms führt. Diese Defizienz tritt homozygot bei ca. 6%, heterozygot bei ca. 40% der kaukasischen Bevölkerung auf, ohne dass es im Alltag zu klinischen Auffälligkeiten kommt¹. Die Chitotriosidase 1 gehört zur Familie der Chitinasen; diese sind in der Lage, Chitin zu hydrolysieren.

Die Sekretion der Chitotriosidase 1 (Chit 1) findet in Phagozyten, speziell in Makrophagen und Neutrophilen, statt. Gleichzeitig lässt sich im Plasma im Zuge chronischer oder akuter Aktivierung von Makrophagen eine erhöhte Enzymaktivität messen, sodass ein Zusammenhang mit dem angeborenen Immunsystem naheliegt.

1.1. Chitinasen



Abb. 1: kristalline Struktur der Chitotriosidase 1⁴

Chitinasen sind genetisch hochkonservierte Enzyme, die in einer großen Reihe von Spezies vorkommen, unter anderem in Bakterien, Pilzen, Nematoden, Pflanzen, Insekten und Vertebraten^{5 6}.

Chitotriosidase 1 (Chit 1) ist eines der beiden bekannten humanen Analoga, als deren natürliches Substrat Chitin gilt. Im Menschen ist keine systemeigene Chitin-Produktion bekannt⁷.

Chitotriosidase 1 (s. Abb. 1) existiert in 2 Formen: als 50-kDa und als 39-kDa Protein, welches aus ersterem durch proteolytische Prozesse in den Lysosomen von Phagozyten entsteht und dort gespeichert wird. In der Zirkulation ist nur die 50-kDa-Form präsent⁸. Das 50-kDa Protein enthält eine C-terminale Chitin-Bindungsdomäne, eine Hinge-Region und die 39 kDa N-terminale Domäne, an der sich die Hydrolaseaktivität befindet^{9 10}.

1.2. Chitin

Chitin selbst ist ein vielfach natürlich vorkommendes, farbloses, wasserunlösliches Polysaccharid, bestehend aus einer Kette von β (1 \rightarrow 4) - verbundenen Zuckeruntereinheiten (N-Acetylglucosaminen, s. Abb. 2). Synthetisiert wird es von einer großen Zahl von Organismen, unter anderem als strukturelle Komponente von Arthropoden inklusive Insekten und Arachnoiden, Krustentieren, niedrigen Wirbellosen und Einzellern¹¹. Weiterhin kommt es vor in Pilzen, Plankton, Algen, Parasiten wie Protozoen und Filarien, aber auch als Barriere gegen die Invasion von Parasiten in Form einer Schicht, die den Intestinaltrakt eines Wirtes auskleidet¹².

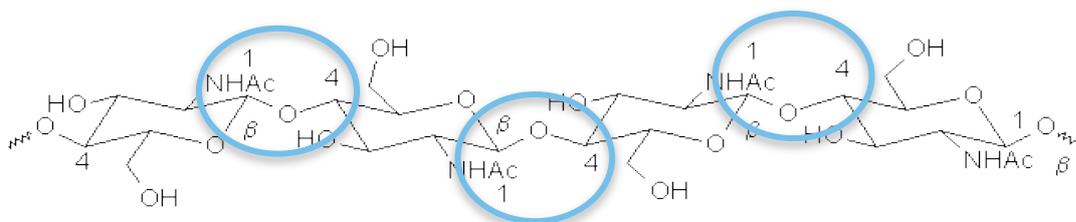


Abb. 2: Strukturformel Chitin² (β (1 \rightarrow 4)-Verbindungen markiert)

1.3. Bedeutung der humanen Chitotriosidase 1

Im Menschen wird Chitin nicht synthetisiert und die Frage nach der physiologischen Aufgabe der Chit 1 im Menschen konnte trotz umfangreicher Forschung noch nicht suffizient beantwortet werden. Da dieses Enzym von aktivierten Phagozyten sezerniert wird und die Aktivierung durch immunmodulatorische Zytokine, bakterielle Polysaccharide und chitinhaltige Pathogene beeinflusst wird, scheint eine Rolle im angeborenen Immunsystem naheliegend^{13 14 15 16}.

Als Beispiel für eine mögliche Rolle in der Verteidigung gegen chitinhaltige Pathogene kann der Nachweis signifikant erhöhter Chit 1-Aktivität im Serum akut an Plasmodium falciparum-Malaria erkrankter Kinder gesehen werden¹⁷.

Weitere Krankheiten, bei denen ein erhöhter Plasmaspiegel auffällt, stehen jeweils in Zusammenhang mit entzündlicher Aktivität bzw. aktivierten Makrophagen, z. B. bei Infektionen, Autoimmunkrankheiten wie Sarkoidose und bei Artherosklerose^{18 19 20 21 22}²³. Die exakte Kausalität der Aktivierung ist dabei noch nicht geklärt.

Darüber hinaus konnten bei zwei neuroinflammativen Erkrankungen, die mit unphysiologischen Ablagerungen einhergehen (Alzheimer-Krankheit, Multiple Sklerose), erhöhte Chit 1-Aktivitätsspiegel in Liquor bzw. Serum nachgewiesen werden^{24 25}.

Klinische Relevanz erlangt das humane Enzym durch die Entdeckung, dass der Plasmaspiegel bei vorliegendem Morbus Gaucher Typ I massiv erhöht ist, abhängig vom Schweregrad der Erkrankung. Diese Erhöhung ist sekundär im Zuge einer angeborenen Defizienz der Glucocerebrosidase, wodurch es zur Akkumulation von Glycosylceramid in Lysosomen von Makrophagen kommt, die dadurch chronisch aktiviert werden. Es finden sich große Mengen aktivierter, lipidüberladener Makrophagen in Milz, Leber und anderen Geweben. Bei suffizienter Enzymersatztherapie sind die Plasmaspiegel der Chit 1 rückläufig. Eine bedarfsgerechte Anpassung der Enzymersatztherapie wird dadurch möglich^{7 18}.

1.4. Mögliche Funktionen

Zur physiologischen Funktion der Chit 1 gibt es wenig Wissen. In Studien konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Chit 1 der Aufbau der fungalen Zellwand beeinträchtigt war²⁶. Bei *A. fumigatus*-Mykose war ein Anstieg der Serum-Chitinase-Aktivität nachweisbar²⁷ und mit Hilfe rekombinanter Chitotriosidase war in vitro das

Hyphenwachstum chitinhaltiger Pilze gehindert bzw. in vivo die Überlebenswahrscheinlichkeit neutropener Mäuse mit Mykosen verbesserbar¹⁵.

Erhöhte Chitotriosidase-Aktivität konnte auch in Plasma und Urin von Neonaten mit schweren Mykosen und bakteriellen Infektionen nachgewiesen werden²⁸. Eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Infektionen mit gramnegativen Erregern zeigte sich bei chemotherapie-belasteten Kindern mit zusätzlich eingeschränkter Chit 1-Aktivität²⁹.

2005 konnte im Mausmodell durch die Injektion von bakteriellen Chitinasen eine selektive Lyse von Mamma-Karzinom-Zellen in vitro und in vivo erreicht werden. Im 1-jährigen Follow-up-Intervall blieben diese Mäuse tumorfrei³⁰.

1.5. Genetische Codierung der Chitotriosidase 1 und Defizienz

Das Chit 1-Gen ist auf Chromosom 1q31-q32 lokalisiert. Es besteht aus 12 Exons und umfasst etwa 20 kB genomischer DNA^{7 3 31}.

Im Rahmen der Erforschung der Chit 1 wurde gezeigt, dass aus einer 24 bp-Duplikation des codierenden Gens in Exon 10 die Aktivierung einer kryptischen mRNA mit einer Inframe-Deletion von 87 Nucleotiden resultiert. Diese fehlgespleißte mRNA codiert ein Chitotriosidase-Protein, dem 29 Aminosäuren fehlen³ (s. Abb. 3).

Dies führt in homozygoter Form zur völligen und in heterozygoter Form zur teilweisen Inaktivierung der enzymatischen Aktivität^{3 31}. Dabei sind sowohl heterozygote als auch homozygote Träger dieses Polymorphismus im täglichen Alltag klinisch unauffällig.

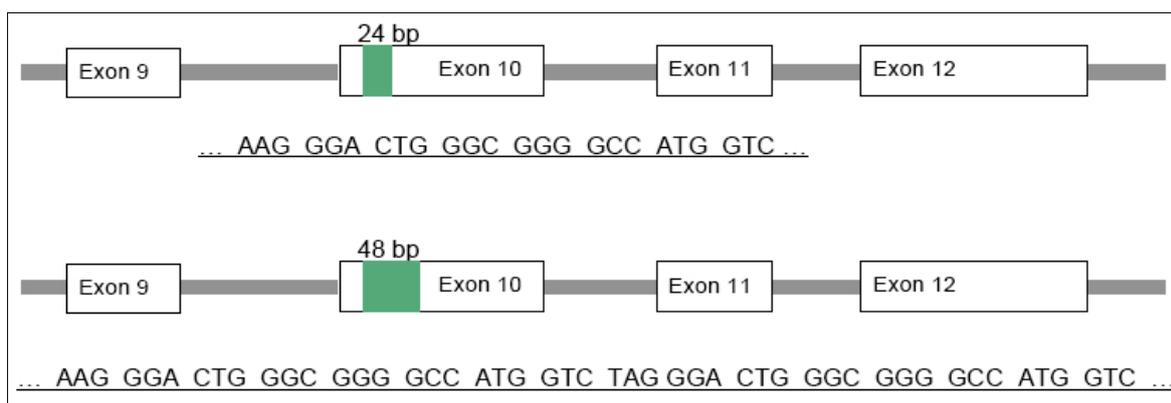


Abb. 3: Schematische Darstellung der Mutation im Chitotriosidase 1-Gen mit resultierender reduzierter bis aufgehobener Enzymaktivität - entsprechend Genotypen Wildtyp (wt/wt), heterozygoter Träger des Polymorphismus (wt/mt) oder homozygoter Träger (mt/mt) des Polymorphismus [nach^{1 3}].

1.6. Vorkommen

Die Allelhäufigkeit der beschriebenen Mutation liegt in unterschiedlichen Populationen und auf verschiedenen Kontinenten mit variablen Frequenzen vor. Das Auftreten einer Heterozygotie reichte in Studien von 0-2 % in Subsahara Afrika über 30-40 % in Mittel-, Südeuropa, Nordafrika und Island bis zu 58 % in Taiwan. Auch das Auftreten der Homozygotie variierte von 0 % in Subsahara Afrika über 4 bis 6 % in Mittel- und Südeuropa, Nordafrika respektive Island und bis zu 30,8 % in Taiwan^{32 33 34}. Zu den Ursachen dieser ungleichen Verteilung bestehen bislang nur Hypothesen

1.7. Fragestellung

Ziel dieser Studie war es, herauszufinden, ob sich bei intensivstationär behandelten Patienten, mit der dort regelhaft auftretenden Infektionsbelastung und stressinduzierten Immunsupprimierung eine Folge der Aktivitätsdefizienz der Chit 1 darstellen lässt^{35 36}. Frage war auch, welche Folgen ein teilweiser oder völliger Ausfall des Enzyms Chitotriosidase 1 bei diesen Patienten hatte in Bezug auf die Krankheitsschwere, ob signifikante Unterschiede bei der Dynamik des Verlaufs von SIRS und Sepsis und ggf. eine veränderte Suszeptibilität gegenüber Erregern von Infektionen zu erkennen war. Insbesondere bei schwerstkranken Patienten könnte dieser Enzymausfall einen zusätzlichen Risikofaktor bedeuten, der sich durch DNA-Analyse vorab erkennen ließe. Um einen Zusammenhang zwischen einer aktivitätsreduzierten Chit 1 und dem Outcome der untersuchten Patienten zu finden, wurde ein prädefiniertes Spektrum klinischer Effekte und Laborparameter bei eingeschlossenen Patienten erfasst und ausgewertet.

2. Methodik

2.1. Patienten

2.1.1. Erfassungszeitraum und Ort

Die vorliegende Untersuchung erfolgte in zwei Observationszeiträumen: vom 12. 02. – 13. 05. 2007 und vom 02. 09. – 30. 11. 2008. Durchgeführt wurde sie auf fünf Intensivtherapiestationen (ITS) der Charité - Universitätsmedizin Berlin: am Campus Virchow Klinikum (CVK) wurden Patienten der Stationen 8i, 14i und 1i, am Campus Charité Mitte (CCM) Patienten der Stationen 101i und 103i eingeschlossen. Alle fünf Stationen gehören zur Universitätsklinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin, wobei eine der Stationen (Station 1i) einen deutlichen Schwerpunkt bei neurologischen und neurochirurgischen Krankheitsbildern hat.

Es handelt sich um eine prospektive, kontrollierte, nicht-interventionelle, klinische Observationsstudie.

2.1.2. Einwilligung

Die Untersuchung erfolgte mit Zustimmung der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Studie EA1/117/06. Ein positives Datenschutzvotum wurde erteilt.

Alle Patienten, bzw. deren gesetzliche Betreuer wurden vom Studienarzt oder den vertretenden Stationsärzten aufgeklärt und stimmten der Teilnahme schriftlich zu.

2.1.3. Patientenauswahl

Um einen Zusammenhang zwischen einer aktivitätsreduzierten Chitotriosidase 1 und dem Outcome der untersuchten Patienten zu finden, wurde eine Kohorte von 200 Individuen eingeschlossen, die eine vorab definierte Krankheitsschwere erreicht hatten (SAPS II \geq 65). Deren intensivstationärer Krankheitsverlauf wurde anhand von Krankheitsschwere-Scores und Parametern, die das Behandlungsergebnis beschreiben, dokumentiert und qualitativ bewertet.

Eingeschlossen wurden volljährige Patienten, die innerhalb der Beobachtungszeiträume auf einer der fünf unter 2.1.1. genannten ITS stationär behandelt wurden. Ein Mindestaufenthalt von 36 h wurde vorgegeben, um Patienten, die im Rahmen ihrer Grunderkrankung langfristiger intensivpflichtig waren auszusuchen. Patienten, die nach

chirurgischen Eingriffen lediglich kurzfristig überwacht werden mussten, wurden dagegen dadurch ausgeschlossen.

Um schwer erkrankte Studienteilnehmer herauszufinden, sollten die aufgenommenen Patienten zusätzlich in der Schweregradklassifikation SAPS II (Simplified Acute Physiology Score, s. Punkt 2.3.2.) einen Score von über 65 erreichen. Minderjährigkeit, Schwangerschaft, nicht einwilligungsfähiger Zustand ohne existierende Betreuung oder die Teilnahme an einer anderen Studie galten als Ausschlusskriterium. Einschlussbaum s. Abb. 4, Basischarakteristika der Patienten sind im Überblick in Tab. 4 zusammengefasst.

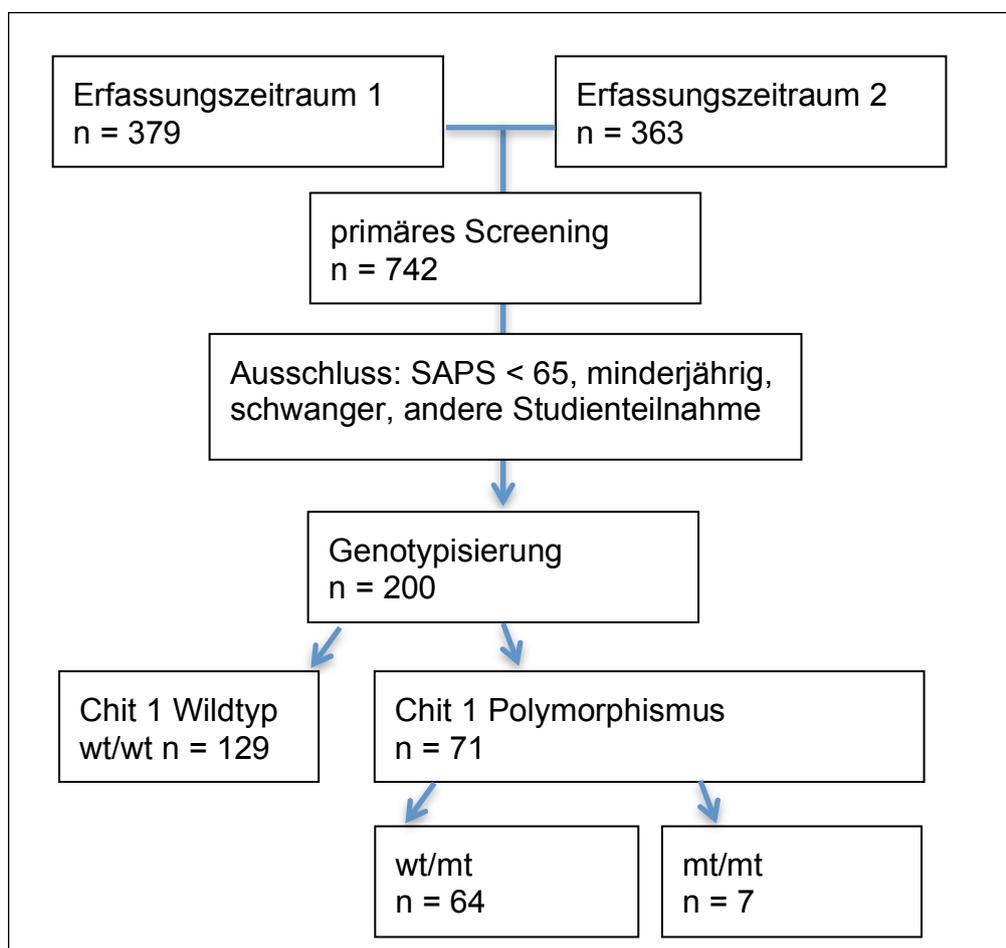


Abb. 4: Einschlussbaum (wt/wt = homozygoter Wildtyp, mt/mt = homozygoter Träger des Chit1-Polymorphismus, wt/mt = heterozygoter Träger des Chit1-Polymorphismus)

2.2. Datenerhebung

2.2.1 Überblick

Das Chitotriosidase 1-Gen der 200 endgültig eingeschlossenen Patienten wurde via PCR analysiert bezüglich einer inaktivierenden 24 bp-Insertion (s.u.). Dabei wurde die Gesamtheit geteilt in zwei zu vergleichende Kohorten: Wildtyp (Nichtträger dieses Polymorphismus) gegenüber hetero- bzw. homozygoten Trägern.

Parallel wurden die individuellen Krankheitsverläufe in den Untersuchungszeiträumen dokumentiert und nach Abschluss der Datendokumentation ein eventueller Zusammenhang mit der genetischen Zugehörigkeit statistisch untersucht.

Diese Observation und Dokumentation der Kohorte erfolgte in den genannten Zeiträumen (2007 und 2008) täglich prospektiv aus den elektronischen Patientenakten in den Programmen COPRA und MedVision und den konventionellen Akten der Patienten. Verlaufsdaten von Überhangtagen der Aufenthalte, die vor einem der Beobachtungszeiträume begonnen hatten oder deren Behandlung sich danach weiter fortsetzte, wurden nachträglich dokumentiert.

2.2.2. Patientendaten aus COPRA

Das Programm COPRA ist ein Patienten-Daten-Management-System, welches 1993 an der Universität Leipzig entwickelt wurde. Beim Einsatz von COPRA werden die überwiegende Zahl der Formulare und Patientendaten elektronisch geführt. Daten werden von medizinischen Geräten (Monitore, Beatmungsgeräte etc.) generiert, einem bestimmten Patienten zugeordnet, und automatisiert in die jeweilige digitale intensivmedizinische Patientenakte eingepflegt. In Form eines elektronischen Kurvenblattes werden Anordnungen, Vitalwerte, Laborwerte, Blutgasanalysen, Medikamentenapplikationen, Infusionstherapiedaten, Bilanzen und durchgeführte Maßnahmen dokumentiert. Diese digitalen Patientenakten werden zusätzlich engmaschig von den Ärzten und Pflegekräften im Freitext ergänzt. Dokumentiert wird dabei auch mehrmals täglich der klinische Status eines Patienten. Die Frequenz der Dokumentation geschieht nach einem Standard jeweils 3 x täglich von Ärzten und 3 x täglich von Pflegekräften.

Das zur Zeit der Datenerhebung installierte Programm lief in der Version 5.24.³⁷.

2.2.3. Patientendaten aus MedVision

Das Programm MedVision ist eine weitere Form der elektronischen Krankenakte. Bei Aufnahme in die Charité - Universitätsmedizin Berlin wurden bis 12/2010 für jeden Patienten alle relevanten Daten in MedVision dokumentiert. Eine Auswahl der Funktionen, die zur Verfügung stehen und dokumentiert werden, sind die Patientenverwaltung (Stationsbuch mit Stammdaten), Formulardruck, medizinische Textverarbeitung, Dialyseregime und Arztbrieferstellung. Die Krankenakte dokumentiert Anamnesen, Diagnosen, Befunde aus anderen Fachbereichen (Mikrobiologie, Hygiene, Chirurgie, Konsile und Laborwerte (per Datenfernübertragung aus den der Charité angeschlossenen Laboratorien). Bei der genutzten Version handelte es sich um MedVision 3.40.3.³⁸

2.2.4. Patienten-Parameter

Die von uns erfassten Parameter waren:

- Patienten-Kenndaten und Verblindungs-ID
- Aufnahmetag und Herkunft der Übernahme (z.B. Aufnahme aus OP, von Extern, aus der Rettungsstelle, von anderer Intensivstation etc.)
- Aufnahmediagnosen, Aufnahmezustand mit Vorerkrankungen, eventuelle antibiotische Vorbehandlung, vorhandene Bildgebung
- Länge des intensivstationären Aufenthaltes, Verlegungszeitpunkt und -ziel
- Status Überleben oder Versterben auf der ITS und im gesamten Krankenhausaufenthalt
- Krankheitsschwere-Scores (SAPS II; SOFA; TISS-28), Vigilanzscores
- Vitalparameter, Hämodynamik, Blutgaswerte, Beatmungsparameter und -dauer
- Vaskuläre Zugänge, Drainagen, Beatmungsdevices, Einfuhr, Ausscheidung und Bilanz
- Laborwerte, mikrobiologische Befunde
- Bildgebung und dazu gehörige Befundungen
- Infektions-Zeichen, Infektions-Diagnosen, Infektions-Fokusse, antimikrobielle Behandlung

Bei den Aufnahmediagnosen wurde nach Infektion, maligner, kardiovaskulärer, abdominaler bzw. renaler, respiratorischer, muskuloskeletaler oder neurologischer

2.3. Krankheitsschwere-Scores

2.3.1. Scores zur Bestimmung des Krankheitsschweregrades und zur Risikoeinschätzung

Täglich dokumentiert wurden die Krankheitsschwere-Scores SAPS II, SOFA und TISS-28, die auf den Stationen von Ärzten bzw. Pflegekräften im Zuge der Tages- und Nachtroutine erhoben werden.

2.3.2. SAPS II

Die Abkürzung SAPS II steht für 'Simplified Acute Physiology Score II' und dient der Erfassung der Erkrankungsschwere eines Patienten. Es handelt sich um die auf 17 Punkte vereinfachte Form des ursprünglichen SAPS-Scores.

Der Wert wird einmal zur Aufnahme und danach, ab einer Liegedauer von mindestens 24 Stunden, täglich erhoben. Als Berechnungsgrundlage dienen:

1. Alter [Jahre]
2. Herzfrequenz [1/min]
3. systolischer Blutdruck [mmHg]
4. Körperkerntemperatur [°C]
5. Oxygenierungsindex: $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ [mmHg]
6. Urinmenge [l/Tag]
7. Serum-Harnstoff [g/l]
8. Leukozytenzahl [$10^3/\text{mm}^3$]
9. Serum-Kalium [mmol/l]
10. Serum-Natrium [mmol/l]
11. Serum-Bicarbonat [mmol/l]
12. Serum-Bilirubin [$\mu\text{mol/l}$]
13. Vigilanz nach Glasgow Coma Scale [3-15 mögliche Punkte]^{42 43}:
 - Augenöffnung [1-4 Punkte]
 - verbale Kommunikation [1-5 Punkte]
 - motorische Reaktion [1-6 Punkte]¹⁶
14. Art der Aufnahme:
 - geplante chirurgische Aufnahme: Operationstermin mindestens 24 Stunden präoperativ oder postoperative ITS-Aufnahme geplant
 - ungeplante chirurgische Aufnahme: Operationstermin ≤ 24 Stunden geplant oder postoperativ ungeplante Aufnahme auf Intensivstation erforderlich

- medizinische Aufnahme: keine Operation innerhalb einer Woche vor ITS-Aufnahme erfolgt oder ITS-Aufnahme aus nichtoperativen Gründen
- 15. chronisches Grundleiden: metastasierende Neoplasie
- 16. chronisches Grundleiden: maligne hämatologische Erkrankung
- 17. chronisches Grundleiden: HIV mit AIDS-Symptomatik

Die einzelnen Unterscores addiert ergeben einen Gesamtscore von 0 bis maximal 163 Punkte (als schlechtester möglicher Wert).

Als bedeutsam für die Prognose, unabhängig von der Diagnose des Patienten, gilt der erste innerhalb von 24 Stunden erhobene Wert (SAPS II₁)^{44 45 46 47}.

2.3.4. SOFA

Der SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) wurde von Experten der European Society for Intensive Care Medicine (ESICM) validiert zur objektiven Beschreibung der Organfunktion bzw. -dysfunktion im Falle einer Sepsis und anderer kritischer Zustände. Grundlage der 24-stündlichen Erhebung sind die jeweils schlechtesten Werte für sechs Organsysteme, d. h.: respiratorisches System, Koagulation, Leber, Niere, kardiovaskuläres System, ZNS (Glasgow Coma Scale, s.o.); es erfolgt also eine tägliche Einstufung des Krankheitsverlaufs.

Dabei wird im einzelnen bewertet und 4 Schweregradstufen zugeordnet:

- das respiratorische System nach Oxygenierungsindex:
[PaO₂/FiO₂: < 400 mmHg, < 300 mmHg, < 200 mmHg und beatmet, < 100 mmHg und beatmet]
- die Koagulation nach Thrombozytenzahl:
[> 150 x 10⁶/μl, < 100 x 10⁶/μl, < 50 x 10⁶/μl, < 20 x 10⁶/μl]
- die Leberfunktion nach Erhöhung des Serum-Bilirubinwertes:
[1,2 - 1,9, 2,0 - 5,9, 6,0 - 11,9, > 12,0 mg/dl]
- die Nierenfunktion nach Serum-Creatininwert:
[1,2 - 1,9, 2,0 - 3,4, 3,5 - 4,9, > 5,0 mg/dl] oder Urinproduktion
- das kardiovaskuläre System nach MAP bzw. der Notwendigkeit des Einsatzes von Katecholaminen zur Stabilisierung der Hämodynamik
- das ZNS nach Glasgow Coma Scale (s.o.) in 4 Stufen:
[GCS < 6, 6 - 9, 10 - 12, 13 - 14]

Jedes Organsystem wird bewertet mit Punkten von 0-4, zunehmend mit dem Schweregrad der Dysfunktion. Insgesamt sind maximal 24 Punkte erreichbar. Hohe SOFA-Score-Werte sind prognostisch verbunden mit signifikant erhöhter Letalität^{44 48 49}

2.3.4. TISS-28

Das Therapeutic Intervention Scoring System in der Form von 1996 hat den Ansatz, die Schwere der Erkrankung am therapeutischen Aufwand zu messen, den ein einzelner Patient erfordert. Der TISS-28 wird ebenfalls 24-stündlich erhoben. Erfasst werden die jeweils schlechtesten Zustände in diesem Zeitraum. Der Score errechnet sich aus 7 Gruppen von Parametern in denen die notwendigen therapeutischen Maßnahmen dokumentiert werden:

- Basisaktivitäten (Standardmonitoring, Labor, einmalige Medikation, mehrfache Medikation, Routine-Verbandswechsel, häufiger Verbandswechsel, Drainage-Pflege)
- Beatmung (apparative Beatmung, Atemunterstützung, Tubus- bzw. Stoma-Pflege, Atemtherapie)
- renaler Support (Nierenersatztherapie, Harnbilanzierung, aktive Diurese)
- kardiovaskulärer Support (einmalige vasoaktive Medikation, mehrfache vasoaktive Medikation, massiver Flüssigkeitsersatz, arterieller Katheter, Pulmonalkatheter, zentralvenöser Katheter, kardiopulmonale Reanimation)
- neurologischer Support (Hirndruckmessung)
- metabolischer Support (Behandlung metabolischer Entgleisungen, parenterale Ernährung, enterale Ernährung)
- spezielle Interventionen (einmalige Intervention innerhalb der ITS, mehrfache Intervention innerhalb der ITS, Diagnose und Therapie/Operation außerhalb der ITS)

Die maximal erreichbare Punktesumme beträgt 75 und lässt sich in notwendige Pflegezeit umrechnen. Diese Summe ist entsprechend ein Maß für den pflegerischen Aufwand eines Patienten und daraus abgeleitet dessen Erkrankungsschwere^{44 46,50 51}. Als besonders aussagekräftig für die Prognose des Patienten gilt der 1. Wert des TISS-28 erhoben 24 h nach Aufnahme auf der ITS (TISS-28₁)⁴⁴.

2.4. Infektion und mikrobiologische Befunde

Mikrobiologische Befunde, die bei den einzelnen Patienten zur Verfügung standen, wurden täglich gescreent und sobald verfügbar, dem Tag der Materialentnahme zugeordnet, dokumentiert und bewertet (Materialien siehe Tabelle 1).

2.4.1. Mikrobiologische Befunde

Der Nachweis eines Erregers wurde mitgeteilt als

- mikroskopischer Befund (morphologische Beurteilung)
- Kulturergebnis, ggf. mit Resistogramm
- Antigen- oder Antikörper-Nachweise oder/ und
- PCR-Ergebnis.

Als Erregernachweis gewertet wurde das Wachstum einer zur positiven Diagnose ausreichenden Menge Kolonie bildender Einheiten (KBE) oder histologischer Nachweis von Erregerwachstum aus den entsprechenden Proben (siehe Tabelle 1).

Erregerwachstum, das als am ehesten ‚durch Verunreinigung entstanden‘ beurteilt worden war, wurde nicht als positiver Nachweis gewertet. Ebenso ein Nachweis von Erregern, die am Fundort als nichtpathogene Besiedelung gelten.

Abstriche	z.B. Wunden, Haut, Nasopharynx, Perineum, intraabdominell
intravasale Proben	Blutkulturen, Katheterspitzen
Gewebeproben	z.B. Herzklappen, Abszessgewebe
Bioptate	z.B. aus Bronchien, Trachea, Darm, Synovia, Leber, Niere, Lunge, Knochenmark
Punktate	z.B. Liquor, Pleura-, Perikard-Erguss, Aszites, Gelenkflüssigkeit, Urin, Abszessinhalt
Proben aus Lavagen	z.B. Bronchial-Lavagen, Wundspülungen, intraabdominelle Lavagen
weitere Körperflüssigkeiten	z.B. Katheter-Urin, spontan-Urin, Sputum, Magensaft, Trachealsekret, Bronchialsekret

Tab. 1: mikrobiologisch untersuchte Materialien

Dokumentiert wurde die Art des Erregers, Einfach- und Mehrfachinfektionen notiert und dies ausgewertet in Zusammenschau mit klinischen und laborparametrischen Zeichen in Hinblick auf das Auftreten von SIRS und Sepsis.

2.4.2. Entzündungsparameter

Die beobachteten Entzündungsparameter aus Vollblut waren Leukozyten, CRP und PCT. Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich gemessen. Entsprechende Werte entnahmen wir aus den elektronischen Patientenakten Copra und MedVision. Bei mehreren Werten pro Tag wurde der jeweils schlechteste Wert innerhalb von 24 Stunden dokumentiert. Zusätzlich wurden die freitextlichen Eintragungen der täglichen Arzt- und Pflegedokumentation zur Beurteilung eines möglichen Infektionsstatus' hinzugezogen.

2.4.3. SIRS und Sepsis

Zur Klassifizierung des Zustandes SIRS oder Sepsis dienten die Parameter der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)⁵³.

Zur Diagnosestellung eines SIRS oder einer Sepsis herangezogene Parameter sind in der folgenden Tabelle 2 aufgeführt.

<p>I. Nachweis einer Infektion: (Diagnose durch mikrobiologischen Nachweis oder klinische Kriterien)</p>
<p>II. SIRS (Severe Inflammatory Response Syndrome): (mindestens 2 Kriterien aus)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$); rektal, intravasal oder vesikal gemessen - Tachykardie $\geq 90/\text{min}$ - Tachypnoe $\geq 20/\text{min}$ oder Hyperventilation $\text{PaCO}_2 \leq 33\text{mmHg}$ ($\leq 4,3\text{ kPa}$) - Leukozytose ($\geq 12/\text{nl}$) oder Leukopenie ($\leq 4/\text{nl}$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild.
<p>Fortsetzung Tabelle 2 siehe nächste Seite</p>

III. akute Organdysfunktion:

(mindestens 1 Kriterium aus)

- Akute Enzephalopathie: Vigilanzeinschränkung, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium
- Relative oder absolute Thrombozytopenie: Thrombozyten-Abfall um mehr als 30 % innerhalb von 24 Stunden oder Thrombozytenzahl $\leq 100/\text{nl}$ (akute Blutung oder immunologische Ursachen ausgeschlossen)
- Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 75 \text{ mmHg}$ ($\leq 10 \text{ kPa}$) (Raumluft) oder $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von $\leq 250 \text{ mmHg}$ ($\leq 33 \text{ kPa}$) (mit Sauerstoffapplikation), (manifeste Herz-oder Lungenerkrankung als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen).
- Renale Dysfunktion: Diurese von $\leq 0.5 \text{ ml/kg/h}$ für ≥ 2 Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder Anstieg des Serumkreatinins $> 2 \times$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.
- Metabolische Azidose: Base Excess $\leq -5 \text{ mmol/l}$ oder Laktatkonzentration $> 1,5 \times$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.

- **Sepsis:** Kriterien I und II

- **Schwere Sepsis:** Kriterien I, II und III

- **Septischer Schock:** Kriterien I und II sowie für ≥ 1 Stunde systolischer arterieller Blutdruck $\leq 90 \text{ mmHg}$ bzw. mittlerer arterieller Blutdruck $\leq 65 \text{ mmHg}$ oder Vasopressoreinsatz notwendig, um diese Blutdruckkriterien zu halten (Hypotonie bestehend trotz adäquater Volumengabe und nicht durch andere Ursachen erklärbar).

Tab. 2: Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock entsprechend den ACCP/SCCM Konsensus- Konferenz Kriterien 11 (mod. nach ⁵³)

2.5. Material und Methoden zur DNA-Analyse und Messung der Enzymaktivität

Die Probengewinnung erfolgte im Rahmen der Routine-Blutentnahme durch Ärzte oder Pflegekräfte der fünf beteiligten Intensivstationen. Eine gesonderte Punktion zu Studienzwecken fand nicht statt. Nach Einschluss der Patienten erfolgte die Analyse der Proben am Institut für Laboratoriumsmedizin, klinische Chemie und Patho-Biochemie (dem heutigen Labor Berlin), Campus Virchow-Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin.

2.5.1. Probengewinnung und Bestimmung des Chit 1-Genotyps

Die Abnahme von 2 ml Blut wurde im Rahmen der Routine-Blutentnahme in Vacutainer® der Firma Becton-Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) vorgenommen. Die DNA-Isolierung erfolgte aus diesem Vollblut nach dem 'Blood and Body Fluid Spin

Protokoll' mit dem 'QIAamp® DNA Blood Mini Kit' der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland).

Die anschließende PCR zur Analyse der DNA auf den untersuchten Chitotriosidase 1-Polymorphismus fand statt in einem Mastermix aus AquaDest plus 10-fach-Puffer. Als Taq-Polymerase diente AmpliTaq® Gold. Beide Bestandteile stammten von Applied Biosystems (Heidelberg, Deutschland). Als Basenbausteine wurde GeneAmp® dNTPs verwendet, ebenfalls von Applied Biosystems.

Die verwendeten Forward- und Reverse-Primer, gewählt nach dem Protokoll von Boot et al. ³, waren Chas9, 5'-AGCTATCTGAAGCAGAAG-3' und Chas8, 5'-GGAGAAGCCGGCAAAGTC-3'.

Temperaturen und Zeiten der PCR sind aufgelistet in Tabelle 3.

Zeit	Vorgang	Temperatur
10 Minuten	Aufschmelzen bei Taq-Gold Temperatur	95°C
20 Sekunden	Denaturierung	95°C
20 Sekunden	Annealing	58°C
30 Sekunden	Extension	72°C
34-malige Wiederholung dieses Zyklus'		
5 Minuten	Stabilisierung	72°C
10 Minuten	Pause	Kühlung

Tab. 3: Temperaturen und Zeiten der PCR

Die Elektrophorese der PCR-Produkte (jeweils 4-5 µl in die Taschen des Gels pipettiert) erfolgte in 40 % (w/v) Accugel 29:1 Acrylamid: Bis-Acrylamid der Firma National Diagnostics (Atlanta, Georgia, USA) als Horizontal-Gelelektrophorese für 30 Minuten, Laufbedingungen 500 V - 50 mA - 15 W. Anschließend wurden die aufgetrennten PCR-Produkte zur Sichtbarmachung im Silbernitratbad angefärbt.

Anhand der Banden stellte sich die Trennung in Chit 1-Wildtyp (wt) oder -Mutation (mt) und homo- (wt/wt, mt/mt)) oder heterozygot (wt/mt) deutlich dar (siehe Abb. 6).

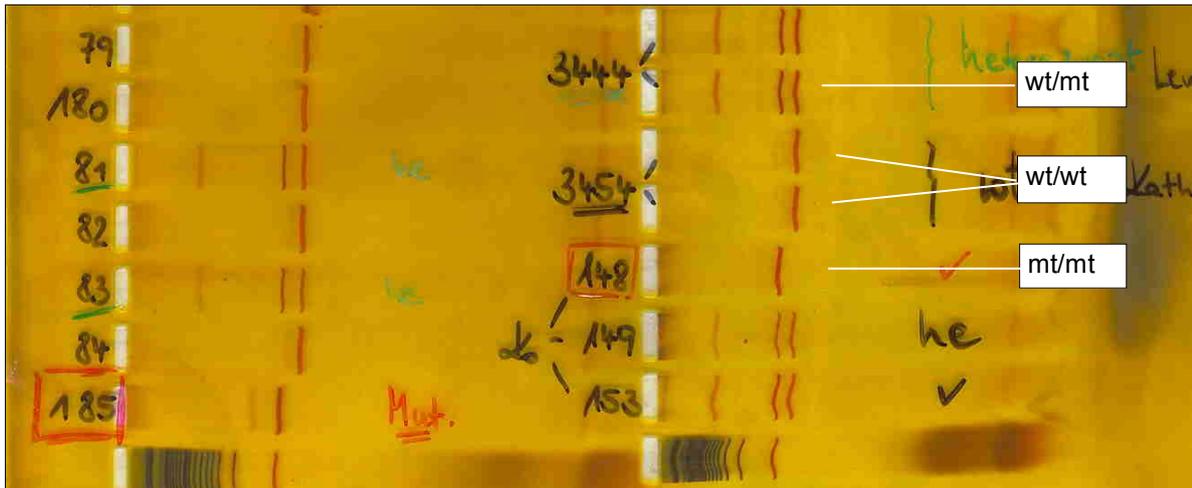


Abb. 6: Banden des Chit1 Gens nach Gel-Elektrophorese: Wildtyp (wt/wt) = 75 bp, heterozygote Träger (mt/wt) = 99 bp+75 bp, homozygoter Träger der Mutation (mt/mt) = 99 bp

2.5.2. Bestimmung der Chit 1-Aktivität

Die Messung der Enzymaktivität (in nmol/l/h) geschah nach einem Protokoll von Hollak et al.¹⁸: sie erfolgte nach Inkubation von 5 µl EDTA-Plasma mit 100 µl 0.022 mM 4-Methylumbelliferyl-β-D-N,N',N''-triacetylchitotriose (4-MU-Chitotriose, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) als Substrat in Citrat/Phosphat-Puffer (0,1/0,2 M), pH 5,2 bei 37 C°. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion mit 2 ml 0,3 M Glycine/NaOH-Puffer, pH 10,6 gestoppt.

Die Intensität des entstandenen Fluorescent-4-Methylumbelliferone wurde mit einem Fluorimeter der Firma Perkin-Elmer-Corp. (Norwalk, CT, USA) bei einer Wellenlänge von 445 nm gemessen.

2.6. Statistik

Die Datenanalyse erfolgte mit SPSS (IBM© SPSS© Statistics, Version 20, © Copyright 1989, 2010 SPSS Inc., an IBM Company, Chicago, Illinois, USA) sowie mit SAS (Version 9.1, Copyright© by SAS Institute Inc. 2003, Cary, NC, USA).

2.6.1. Aufteilung der Kohorte nach Genotyp

Die Kohorte wurde hinsichtlich ihres Chit 1-Genotyps in zwei Gruppen geteilt:

1. Nichtträger der Mutation bzw. Wildtyp (wt/wt)
2. heterozygote und homozygote Träger der Mutation (wt/mt bzw. mt/mt)

Anhand dieser disjunkten Grundaufteilung wurde die weitere Analyse vorgenommen.

2.6.2. Statistische Berechnungen - Charakterisierung, Signifikanz und Bewertung

Die Charakterisierung der Daten erfolgte mit Hilfe deskriptiver Statistik durch SPSS. Binäre kategoriale Daten wurden dabei als absolute Anzahl und in Prozent (%) angegeben. Bei kontinuierlichen Größen erfolgte für normalverteilte Variablen eine Zusammenfassung als Mittelwert und Standardabweichung (SD). Bei fehlender Normalverteilung oder ordinalem Skalenniveau erfolgte die Zusammenfassung als Median mit zugehörigen 25 % und 75 % Quartilen (25 % - 75 %).

Die Signifikanztestung kategorialer Werte wurde über den exakten Chi-Quadrat Test nach Fisher durchgeführt. Für normalverteilte Variablen erfolgte dagegen ein t-Test für unabhängige Stichproben. Als nichtparametrischer Test für nicht-normalverteilte kontinuierliche Parameter wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für die Analyse des Verlaufs ordinaler Parameter der Krankheitsschwerescores SAPS II, SOFA und TISS-28 erfolgte eine nichtparametrische longitudinale Datenanalyse in einem zweifaktoriellen Design [1. Faktor (unabhängig): Gruppe (Träger vs. Nichtträger der Mutation), 2. Faktor (abhängig): Zeit (Zeitraum der ersten 20 Tage des jeweiligen stationären Aufenthalts)] nach Brunner et al. (2002)⁵⁴.

Zur Prüfung mehrerer unabhängiger Variablen im Sinne einer Konfounderanalyse in Bezug auf die Zielgröße Mortalität erfolgte eine weitere Signifikanztestung mittels multivariater, logistischer Regression. Hierbei wurden jene Faktoren in das Modell integriert, die einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen in den Basischarakteristika aufwiesen.

Alle Signifikanztestungen erfolgten zweiseitig mit einem Fehler erster Art $\alpha = 0,05$, jedoch im Sinne einer explorativen Analyse nicht für multiples Testen adjustiert.

Zur Bewertung des Intervalls bis zum Beginn und zum Vergleich der Dynamik im Verlauf von SIRS und Sepsis in beiden Kohorten wurde eine Kaplan-Meyer-Analyse durchgeführt. Bei dieser Analyse erfolgte neben der Signifikanztestung der Gruppen mittels des Log-Rang-Tests (zweiseitiges $\alpha = 0,05$) auch die grafische Darstellung der Überlebenskurven zum Vergleich der SIRS- und Sepsis-Verläufe über 20 Tage nach stationärer Aufnahme.

Die 20 Tage Grenze wurde gewählt, weil bis zu diesem Zeitpunkt jeweils noch 50 % der ursprünglich eingeschlossenen Individuen zur Beobachtung standen.

3. Ergebnisse

3.1. Basischarakteristika

Es wurden 200 Patienten in die Untersuchung eingeschlossen. Diese wurden nach Abschluss der Datenerhebung entsprechend ihres Genotyps in zwei Gruppen aufgeteilt. Dabei ergab sich eine Gruppe von n = 129 (64,5 %) Patienten mit Chitotriosidase 1 Gen vom Wildtyp. Die anderen 71 Individuen waren entweder heterozygote (n = 64 [32 %]) oder homozygote (n = 7 [3,5 %]) Träger des untersuchten Polymorphismus.

Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Basischarakteristika Geschlecht und Alter (s. Tabelle 4).

Variable	Chit 1 Wildtyp, n = 129	Chit 1 Polymorphismus n = 71	p-Wert
weibliche Patienten n (%)	53 (41.1)	29 (40.8)	> 0,999
Alter Median (25-75 % Quartile) Jahre	70 (60-77)	71 (64 – 78)	0,490

Tab. 4: Basischarakteristika

3.2. Enzymaktivität

Im ersten Untersuchungszeitraum der Studie wurde zusätzlich die Enzymaktivität untersucht. Hierbei zeigte sich deutlich eine verminderte Aktivität bzw. ein völlige Inaktivität des Enzyms Chit 1 bei heterozygoten bzw. homozygoten Trägern der Mutation gegenüber Nichtträgern der Mutation (siehe Abbildung 7).

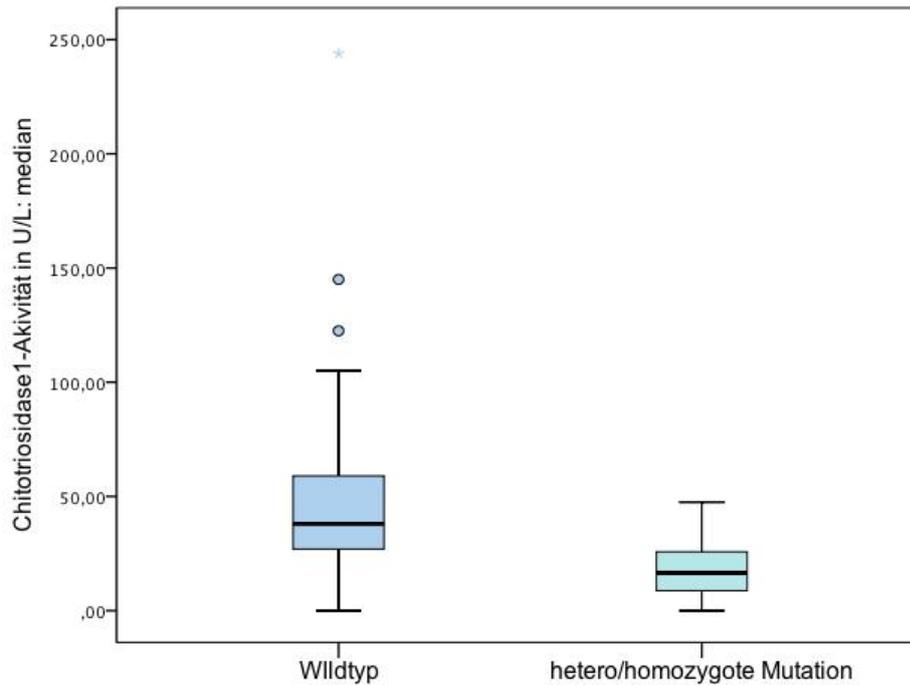


Abb. 7: Box Plots der Chit 1-Enzymaktivität bezüglich der Genotypisierung

3.3. Vorerkrankungen

Bei den Vorerkrankungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen. Lediglich bei neurologischen Erkrankungen als Aufnahme-diagnose zeigte sich ein signifikant häufigeres Vorkommen in der Gruppe der vom untersuchten Polymorphismus betroffenen Individuen (s. Tabelle 5).

Variable	Chit 1 Wildtyp n = 129	Chit 1 Polymorphismus n = 71	p-Wert
Diagnosen bei Aufnahme, (n = 200), Angaben in n (%)			
Infektion	17 (13.2)	12 (16.9)	0,531
Malignom/Neoplasie	17 (13.2)	9 (12.7)	> 0,999
Kardiovaskuläre Erkrankung	43 (33.3)	17 (23.9)	0,198
abdominelle und renale Erkrankung	13 (10.1)	5 (7.0)	0,609
respiratorische Erkrankung	15 (11.6)	8 (11.3)	> 0,999
muskuloskeletale Erkrankung (Traumatologie + Orthopädie)	12 (9.3)	6 (8,5)	> 0,999
neurologische Erkrankung	12 (9.3)	14 (19.7)	0.048
Fortsetzung Tabelle 5: folgende Seite			

Chirurgische Patienten (n = 164), Angaben in n (%)	Chit 1 Wildtyp	Chit 1 Polymorphismus	p-Wert
Muskuloskeletale VE	19 (17.4)	11 (20.0)	0,675
Neurochirurgische VE	11 (10.1)	9 (16.4)	0,312
Kardiovaskuläre und intrathorakale VE	50 (45.9)	17 (30.9)	0,092
Abdominelle VE	29 (26.6)	18 (32.7)	0,466
Co-Morbiditäten			
n (%)*			
Gefäßerkrankung	56 (43.4)	31 (43.7)	> 0,999
Hypertonus	51 (39.5)	37 (52.1)	0,102
Chronische Lebererkrankung	14 (10.9)	8 (11.3)	> 0,999
Chronische Nierenerkrankung	35 (27.1)	19 (26.8)	> 0,999
Metabolische und diabetische VE	51 (39.5)	23 (32.4)	0,360
Chronische Lungenerkrankung	40 (31.0)	21 (29.6)	0,874
Neuropsychiatrische VE	39 (30.2)	18 (25.4)	0,515
schädlicher Alkoholkonsum	16 (12.4)	4 (5.6)	0,147
Infektionen	37 (28.7)	24 (33.8)	0,521

Tab. 5: Vorerkrankungen (VE) - Aufnahme Diagnosen und Co-Morbiditäten, * mehrere möglich

3.4. Erkrankungen während des intensivstationären Aufenthaltes

3.4.1. Auftreten von Infektionen in Hinsicht auf Infektionsfokuse

In der Annahme, dass die Funktion der Chitotriosidase 1 in Zusammenhang mit dem Immunsystem stehe, wurde auch der mögliche Einfluss reduzierter Chitotriosidase-Aktivität auf das Auftreten von Infektionen betrachtet. Dabei gruppieren wir in Bezug auf den Fokus. Es ließ sich jedoch nicht nachweisen, dass eine inaktivierende Mutation im Chit 1-Gen zu einer signifikanten Häufung im Auftreten einzelner Infektionsfokuse führt (siehe Tabelle 6).

Variable bzw. Fokus der Infektion	Chit 1 Wildtyp n = 129	Chit 1 Polymorphismus n = 71	p-Wert
Pulmonal, n (%)	52 (40,3)	37 (52,1)	0,137
Abdomen, Weichteilgewebe, Wundinfektionen, n (%)	27 (20,9)	13 (18,3)	0,715
Harnwege, n (%)	6 (4,7)	5 (7,0)	0,525
Katheter oder Bakteriämie, n (%)	10 (7,8)	5 (7,0)	> 0,999
Andere Infektionen, n (%)	12 (9,3)	5 (7,0)	0,792
keine Infektion, n (%)	22 (17,1)	6 (8,5)	0,135

Tab. 6: Infektionen nach Fokussen

3.4.2. Auftreten von Infektionen in Hinsicht auf Erregertypen

Die lytische Aktivität der Chitotriosidase 1 bezieht sich auf $\beta(1\rightarrow4)$ -glycosidische Bindungen von Polysacchariden aus N-Acetyl-D-Glucosamin. Unterschieden wurde bei Nachweis eines Erregers deshalb auch hinsichtlich der unterschiedlichen Oberflächen dieser Erreger, welche in Anteilen aus verschiedenen Polysaccharidketten bestehen.

Variable	Chit 1 Wildtyp n = 129	Chit 1 Polymorphismus n = 71	p-Wert
Infektion mit Biofilm- Bildner, n (%)	87 (67,4)	53 (74,6)	0,335
gram-positive Erreger, n (%)	76 (58,9)	41 (57,7)	0,882
gram-negative Erreger, n (%)	57 (44,2)	40 (56,3)	0,106
Pilzinfektion, n (%)	10 (7,8)	7 (9,9)	0,606
multiresistente Erreger, n (%)	58 (45,0)	35 (49,3)	0,657

Tab. 7: Infektionen nach Erregergruppen

Speziell die Zellwände von Spross- und Fadenpilzen beinhalten Chitin, sodass hier das Augenmerk auf einer erhöhten Empfindlichkeit von Trägern des untersuchten Polymorphismus für Mykosen lag. In unserer Untersuchung ließ sich keine Signifikanz

zugunsten eines Genotyps nachweisen (siehe Tabelle 7). Auch bei Infektionen mit multiresistenten Erregern sah man keine Tendenz zugunsten eines der Genotypen.

3.5. Krankheitsschwere während des intensivstationären Aufenthaltes

3.5.1. Krankheitsschwere-Scores am Aufnahmetag

Als Maßstab für die Schweregradklassifikation der Erkrankung der untersuchten Patienten wurden die bereits oben beschriebenen Krankheitsschwere-Scores SAPS II, SOFA und TISS-28, verwendet. Zur Bemessung des Erkrankungsgrades bei Aufnahme verglichen wir die Mediane der Aufnahme-Scores (SAPS II₁, SOFA₁, TISS-28₁) der beiden Kohorten (siehe Tabelle 8).

Hier zeigten sich beim SAPS II₁ des Aufnahmetages keine signifikanten Unterschiede. Beim SOFA₁ und beim TISS-28₁ zeigten sich bei Patienten mit Mutation im Median signifikant niedrigere Werte, also per definitionem weniger gravierende Krankheitszustände am Aufnahmetag, als bei Patienten mit intakter Enzymfunktion der Chitinase (SOFA₁: p = 0,004; TISS-28₁: p = 0,008).

Variable	Chit 1 Wildtyp n = 129	Chit 1 Polymorphismus n = 71	p-Wert
SAPS II ₁ , median (25-75 % Quartilen)	53 (43.5-65)	50 (40-63)	0,178
SOFA ₁ , median (25-75 % Quartilen)	8 (6-11)	7 (5-9)	0.004
TISS-28 ₁ , median (25-75 % Quartilen)	44 (35-51.5)	38 (32-46)	0,008

Tab. 8: Mediane der Krankheitsschwere-Scores am Aufnahmetag

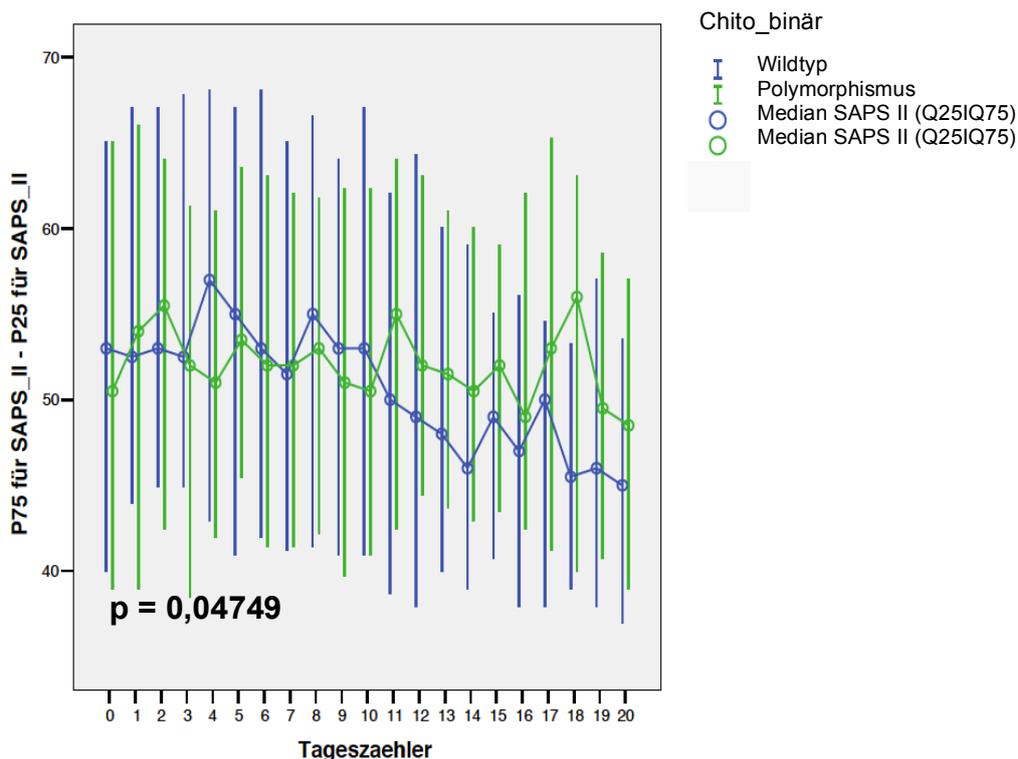
3.5.2. Krankheitsschwere-Scores im Verlauf

Um die Krankheitsschwere-Scores von Trägern und Nichtträgern der Chit 1-Mutation im Verlauf der intensivstationären Aufenthalte vergleichen zu können, wurde eine longitudinale Analyse erstellt⁵⁴. Verglichen wurden die Zeitverläufe der täglich erhobenen Krankheitsschwere-Scores SAPS II, SOFA und TISS-28 im Zeitraum der ersten 20 Tage des individuellen Beobachtungszeitraums der einzelnen Patienten über die betrachteten Gruppen (Träger vs. Nichtträger).

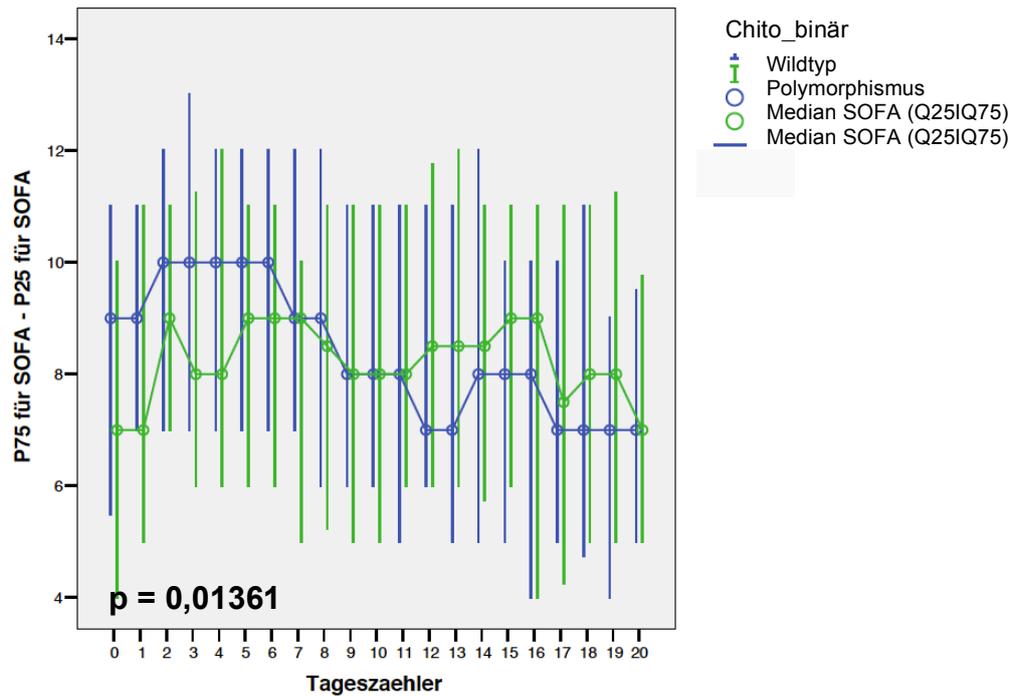
Bis zum 20. Tag des jeweiligen Beobachtungsfensters waren noch 50 % der ursprünglich eingeschlossenen Patienten in intensivstationärer Behandlung auf den beobachteten Stationen, weshalb der Analysezeitraum bis dorthin begrenzt wurde.

Über dieses Intervall ergibt sich bei allen drei Scores ein signifikanter Unterschied zwischen Trägern und Nichtträgern der Chit 1-Mutation (SAPS II $p = 0,047049$, SOFA $p = 0,01361$, TISS-28 $p = 0,04889$).

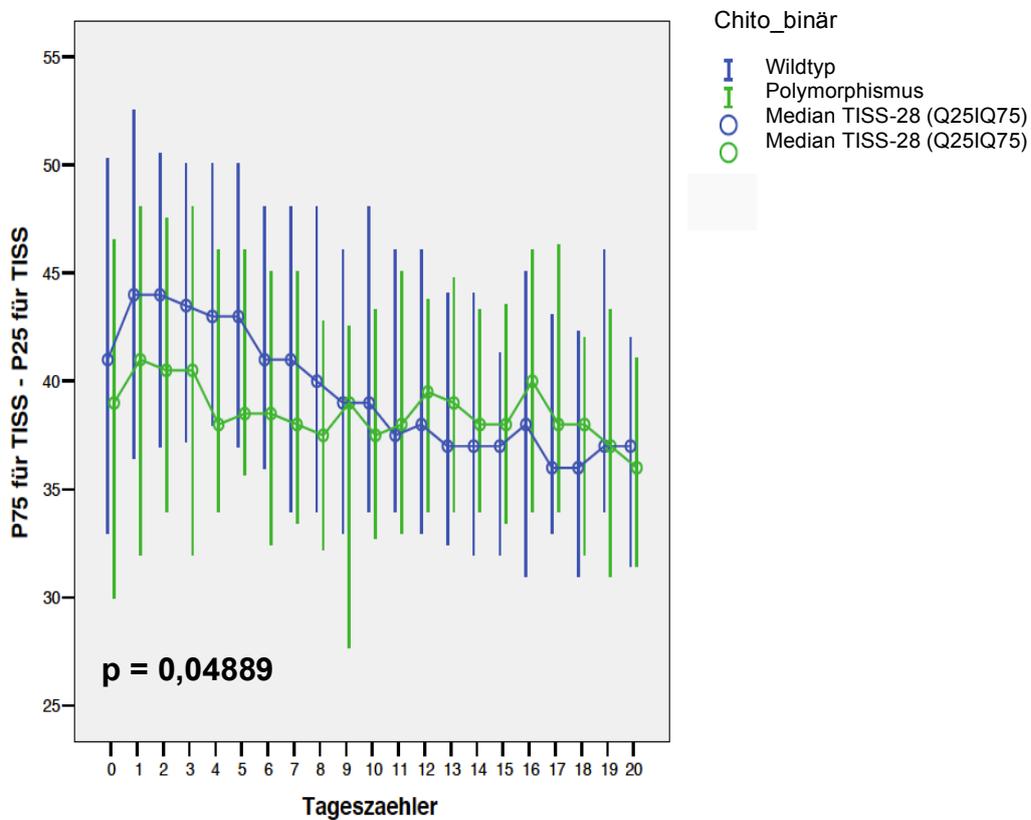
Die grafische Umsetzung der longitudinalen Analysen (Grafiken A, B, C) zeigt, dass sich am Aufnahmetag bei allen Scores bei den Nichtträgern des Polymorphismus (Wildtyp) schwerere Krankheitszustände darstellen. Verfolgt man dies über 20 Tage, so sieht man, dass Individuen mit intakter Enzymfunktion eine Entwicklung in Richtung geringere Krankheitsschwere durchmachen. Im Gegensatz dazu scheint sich bei Individuen mit eingeschränkter Funktion der Chit 1 (Polymorphismus) die Krankheitsschwere nicht zu verbessern, sondern mit Schwankungen auf hohem Niveau zu sistieren.



Grafik A: : Longitudinale Analyse zum Krankheitsschwere-Score SAPS II im Verlauf der ersten 20 Tage ITS-Aufenthalt (die Grafik zeigt die Mediane mit 25%-75% Quartilen).



Grafik B: Longitudinale Analyse zum Krankheitsschwere-Score SOFA im Verlauf der ersten 20 Tage ITS-Aufenthalt (die Grafik zeigt die Mediane mit 25%-75% Quartilen).



Grafik C: Longitudinale Analyse zum Krankheitsschwere-Score TISS-28 im Verlauf der ersten 20 Tage ITS-Aufenthalt (die Grafik zeigt die Mediane mit 25%-75% Quartilen).

3.6. Parameter der Behandlungsqualität

3.6.1. Liegedauer und Mortalität als Parameter für die Behandlungsqualität

Ein wichtiger Faktor zur Bemessung des Verlaufs eines Krankenhaus-Aufenthaltes ist die Zahl der Liegetage. Es wurde unterschieden zwischen Aufenthaltsdauer in intensivstationärer Behandlung und der Dauer des Gesamtaufenthaltes im Krankenhaus (letzteres als Zeitraum zwischen initialer Aufnahme in die Charité und Entlassung nach extern).

Ein weiterer wichtiger Parameter des Behandlungserfolges ist die Mortalität während des ITS-Aufenthaltes. Träger der beobachteten Chit 1-Mutation benötigten zwar einen im Median längeren stationären Aufenthalt auf einer der Intensivstationen (25 Tage vs. 22 Tage) und zeigten eine prozentual höhere Sterblichkeit im Rahmen ihres intensivstationären Aufenthaltes (42,9 % vs 34,9 %) als Nichtträger. Die Verlängerung, respektive Erhöhung war jedoch nicht signifikant (siehe Tabelle 10).

Variable	Chit 1 Wildtyp n = 129	Chit 1 Polymorphismus n = 71	p-Wert
ITS-Aufenthalt, n Tage (25-75 %)	22 (10,0-39,0)	25 (10,0-37,0)	0,979
Krankenhausaufenthalt, n Tage (25-75 %)	39 (18,0-60,5)	36 (18,0-62,0)	0,764
ITS-Sterblichkeit, n (%)	45 (34,9)	28 (42,9)	0,542

Tab. 9: Dauer des stationären Aufenthaltes, Mortalität während ITS-Aufenthalt.

3.6.2. Konfounderanalyse zur Beurteilung des Einflusses neurologischer Vorerkrankung und Krankheitsschwere auf den Endpunkt Mortalität

Zur weiteren Beurteilung eines möglichen Einflusses des inaktivierenden Polymorphismus der Chit 1 führten wir eine Konfounderanalyse in Form der multivariaten logistischen Regression durch. Als Zielgröße diente die Mortalität während des ITS-Aufenthaltes.

Eine schrittweise logistische Regression unter Einbeziehung sowohl neurologischer Vorerkrankungen, als auch der Krankheitsschwere-Scores SOFA₁ und TISS-28₁ (Scores jeweils am ersten Tag erhoben), zeigte, dass kein signifikanter Einfluss dieser Parameter auf den Endpunkt Mortalität (siehe Tabelle 10) nachweisbar war.

		Regressions- koeffizient	Signifikanz	Odds Ratio	95 % Konfidenzintervall für die Odds Ratio	
					Unterer Wert	Oberer Wert
Schritt 1	Chit 1-Mutation	- 0,226	0,473	0,798	0,430	1,480
	neurologische Vorerkrankung	0,074	0,872	1,077	0,436	2,661
	TISS-28 ₁	0,010	0,525	1,010	0,980	1,040
	SOFA ₁	- 0,017	0,697	0,983	0,901	1,072
Schritt 2	Chit 1-Mutation	- 0,221	0,481	0,802	0,434	1,483
	TISS-28 ₁	0,010	0,489	1,010	0,982	1,040
	SOFA ₁	- 0,018	0,691	0,982	0,900	1,072
Schritt 3	Chit 1-Mutation	- 0,232	0,457	0,793	0,430	1,462
	TISS-28 ₁	0,007	0,569	1,007	0,982	1,033
Schritt 4	Chit 1-Mutation	- 0,195	0,522	0,823	0,452	1,496

Tab. 10: Logistische Regression, Endpunkt Mortalität

3.6.3. Auftreten von SIRS oder Sepsis

In der Annahme, dass die Aktivität der Chitotriosidase 1 in Zusammenhang mit der Aktivität des Immunsystems steht^{13 14 15,16 17}, interessierte auch, ob im Falle einer Funktionseinschränkung oder sogar eines Ausfalls des Enzyms die Inzidenz von SIRS oder Sepsis zunahm. Im Falle eines Auftretens dieser Zustände, definiert nach der S2k-Leitlinie der AWMF von 2010⁵³, war von Interesse, ob es Unterschiede in der Zeit bis zum Auftreten von SIRS oder Sepsis, also der Dynamik im Verlauf gab.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Individuen mit unauffälliger Chit 1-Funktion und solchen mit eingeschränkter Funktion (siehe Tabelle 11).

	Chit 1 Wildtyp n = 129	Chit 1 Polymorphismus n = 71	p-Wert
Inzidenz SIRS n (%)	119 (92,2)	66 (93,0)	> 0,999
Inzidenz Sepsis n (%)	105 (81,4)	57 (80,3)	0,852
Mediane Zeit bis SIRS in Tagen (25-75 % Quartile)	1 (1-2)	1 (1-2)	0,815
Mediane Zeit bis Sepsis in Tagen (25-75 % Quartile)	3 (2-6)	3 (2-6)	0,409

Tab. 11: Inzidenz und Zeitraum bis zum Auftreten von SIRS oder Sepsis

Die folgenden Kaplan-Meier-Darstellungen zeigen den intensivstationären Verlauf bis zum Auftreten eines SIRS bzw. einer Sepsis über einen Zeitraum der jeweils ersten 20 Tage. Die Kurven der beiden Endpunkte SIRS und Sepsis in der Überlebensanalyse verlaufen annähernd parallel (SIRS siehe Tabelle 12 und Abbildung 8, Sepsis siehe Tabelle 13 und Abbildung 9).

Test	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	0,055	1	0,815
Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen des Chit 1-Polymorphismus			

Tab. 12: Überlebensanalyse Kaplan-Meier zum Onset von SIRS (Gesamtvergleiche)
Signifikanzprüfungen der Intervalle bis zum Auftreten von SIRS innerhalb der ersten 20 Tage des Beobachtungszeitraums. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beobachteten Kohorten.

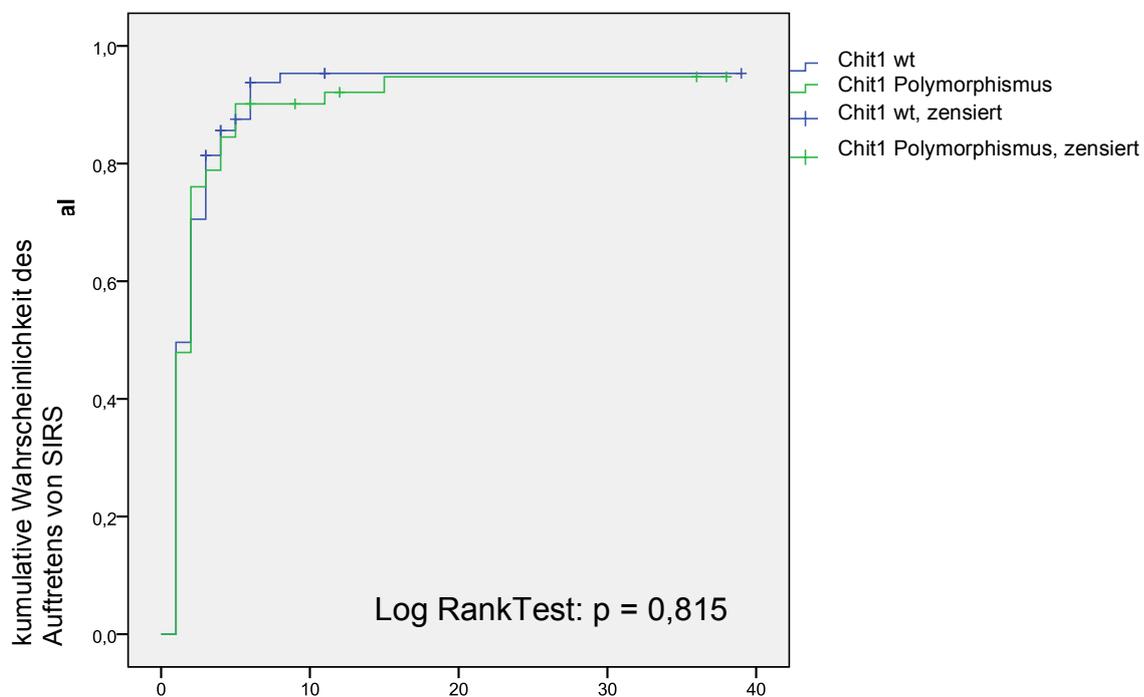


Abb. 8: Kaplan-Meier Analyse zum Onset SIRS, grafische Darstellung der kumulativen Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten von SIRS innerhalb der ersten 20 Tage des Beobachtungszeitraums. (wt = Wildtyp)

Test	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	0,683	1	0,409
Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen des Chit 1-Polymorphismus			

Tab. 13: Überlebensanalyse Kaplan-Meier zum Onset einer Sepsis (Gesamtvergleiche)
Signifikanzprüfungen der Intervalle bis zum Auftreten einer Sepsis innerhalb der ersten 20 Tage des Beobachtungszeitraums. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beobachteten Kohorten.

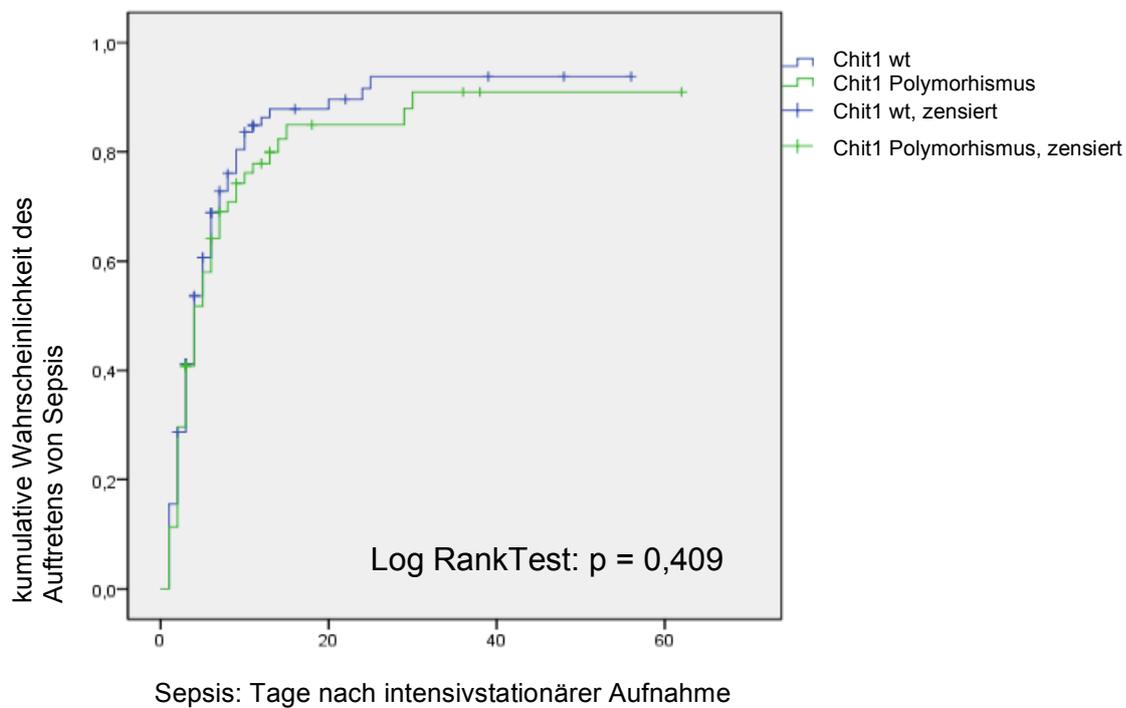


Abb. 9: Kaplan-Meier Analyse zum Onset einer Sepsis, grafische Darstellung der kumulativen Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten einer Sepsis innerhalb der ersten 20 Tage des Beobachtungszeitraums. (wt = Wildtyp)

4. Diskussion

4.1. Hauptergebnis

Das Hauptergebnis dieser Studie ist, dass sich in der vorliegenden Untersuchung ein signifikanter Einfluss eines inaktivierenden Chitotriosidase 1-Polymorphismus auf die Krankheitsschwere im Verlauf der ersten 20 Tage darstellte. Für den Verlauf oder das Behandlungsergebnis von intensivstationären Patienten war kein signifikanter Unterschied erkennbar.

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Hypothese, dass Patienten, bei denen eine Indikation zur intensivmedizinischen Behandlung besteht, insbesondere nach erfolgreichem operativem Eingriff, unter erhöhtem Stress stehen, welcher auch ihre Immunkompetenz beeinflusst^{35 55 56 57}. Daraus ließe sich ableiten, dass unter dieser reduzierten Immunkompetenz, bei zusätzlich eingeschränkter Funktion der Chitotriosidase 1, ggf. deren physiologische Funktion demaskiert und der Krankheitsverlauf modifiziert würde. Trotz signifikant unterschiedlicher Krankheitsschwere im Verlauf ließ sich kein Hinweis auf die physiologische Funktion des Enzyms darstellen.

4.2. Voraussetzungen

Die Erstbeschreibung der Chitotriosidase 1 in humanmedizinischem Kontext findet sich 1994¹⁸. Darin wird bei Patienten mit M. Gaucher der Zusammenhang hergestellt zwischen sekundär erhöhter Aktivität der Chitotriosidase im Plasma und dem Status der Erkrankung. Schon vorher existierten Studien zum Vorkommen einer humanen Chitotriosidase^{58 59}. Purifikation, Decodierung und Cloning des Enzyms gelangen 1995. Als Produktionsort werden aktivierte Phagozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten beschrieben^{7 9 60}. Funktionen verwandter Chitinasen in Pflanzen, Fungi, Bakterien, Insekten, wirbellosen Kleinlebewesen, einigen Fischen und Protozoen sind bekannt. Bei Ihnen ist Chitinase Teil eines endogenen Kreislaufs, dient dem Eindringen in einen Wirt oder der Verdauung von chitinhaltigen Ernährungsbestandteilen. Aber sie dient auch dem Schutz vor pathogenen Eindringlingen^{5 6}. Bei der in dieser Arbeit untersuchten Inaktivierung der humanen Chit 1 durch eine 24-bp-Duplikation scheinen die betroffenen Individuen klinisch unbeeinträchtigt zu sein. Eine physiologische Funktion im humanen Serum konnte bislang noch nicht suffizient nachgewiesen werden^{1 3 14 15 16}.

4.3. Basischarakteristika und Prävalenz

Bezüglich der Basischarakteristika ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Geschlecht und Alter der eingeschlossenen Teilnehmer. Das Verhältnis von Trägern (n = 71) zu Nichtträgern des Polymorphismus der Chit 1 (n = 129) war der vorbeschriebenen Prävalenz entsprechend unausgewogen. Der Anteil heterozygot betroffener Individuen war konform zu anderen Daten für mitteleuropäische Bevölkerungsgruppen^{1 3 17 22 32 61}. Jedoch betrug der Anteil homozygoter Träger in unserer Gruppe nur wenig mehr als die Hälfte des vorbeschriebenen Anteils. Dies kann eine zufällige Konstellation sein. Als Interpretationen muss man aber auch zwei Möglichkeiten in Betracht ziehen:

1. Es besteht die Möglichkeit, dass homozygote Polymorphisträger einen Selektionsvorteil und insgesamt positiveren Krankheitsverlauf hatten, ergo möglicherweise seltener einen Krankheitsschwere-Scores von SAPS II ≥ 65 erreichten.
2. ist es umgekehrt möglich, dass Individuen mit vollständig inaktivierter Chit 1-Aktivität so sehr benachteiligt waren, dass sie einen Einschluss in unsere Studie nicht erreichten und schon vorher ausschieden.

4.4. Enzymaktivität

Die gemessene Enzymaktivität der Chit 1 war wie vorbeschrieben, auch in den vorliegenden Ergebnissen korreliert mit dem Genotyp, d.h. bei heterozygot aufgetretenem Polymorphismus war die Enzymaktivität im Median etwa halbiert^{1 62}. Bei homozygoter Ausprägung des Polymorphismus war die Enzymaktivität annähernd null, d.h. eine kompensatorisch erhöhte Aktivität bei Heterozygotie fand nicht statt.

4.5. Vorerkrankungen

Bei den Aufnahmediagnosen der eingeschlossenen Patienten zeigte sich keine signifikante Korrelation zur Enzymaktivität. Lediglich neurologische Vor- oder Grunderkrankungen fanden sich signifikant häufiger bei Trägern des untersuchten Polymorphismus.

Da von den fünf beobachteten Stationen eine der ITS vorwiegend neurologische bzw. neurochirurgische Patienten behandelt, gibt es in der Untersuchung ein relativ häufiges

Auftreten dieser Erkrankungen, was einen Selektionsbias erzeugt. D. h. ein relativ häufigeres Auftreten dieser Erkrankungen entspricht einem allgemein höheren Anteil dieser Erkrankungen am untersuchten Patientenkollektiv, der sich im Rahmen des Verhältnisses Träger zu Nichtträgern des Polymorphismus auf das Ergebnis auswirken kann.

Zusätzlich spiegelt sich dieses häufigere Auftreten als Aufnahmediagnose nicht bei den Nebendiagnosen wieder: dort kommen bei den Trägern des Polymorphismus neurologische Vorerkrankungen relativ weniger vor. Die scheinbar signifikant erhöhte Anzahl an neurologischen Aufnahmediagnosen muss also vorrangig als Einschluss-Bias bzw. Zufallsbefund gewertet werden.

Dennoch gibt es Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen erhöhter Chit 1-Aktivität und cerebralen, bzw. neurologischen Erkrankungen wie M. Alzheimer, Non-Alzheimer-Demenz und Multipler Sklerose herstellen^{24 25 63 64 65}. In einer Untersuchung wurden chitinartige Polymere im Gehirn von an M. Alzheimer Erkrankten nachgewiesen. Diese ließen sich *in vitro* durch die Zugabe einer Chitinase degradieren⁶⁶. Weitere gezielte Untersuchungen zum Zusammenhang eines Chit 1-Polymorphismus mit neurologischen bzw. cerebralen Erkrankungen sind erforderlich, um pathogenetische Zusammenhänge und eventuelle Therapieansätze zu ergründen.

Es ergab sich in der vorliegenden Arbeit auch kein Anhalt für ein gehäuftes Auftreten von malignen Erkrankungen bei Trägern der Chit 1-Defizienz. Im Gegensatz dazu steht eine einzelne Studie, in der im Mausmodell gezeigt werden konnte, dass durch Gabe von bakteriellen Chitinasen die Lyse von Mamma-Karzinom-Zellen induziert wurde³⁰.

4.6. Infektion und Immunabwehr

Bezüglich Chit 1 existieren in der Literatur Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang mit dem Immunsystem, insbesondere mit der unspezifischen Immunabwehr^{26 27 28}. Weltweite genetische Untersuchungen haben gezeigt, dass unter mikrobiologisch unterschiedlichen Lebensbedingungen die Prävalenz des Chit 1-Polymorphismus variiert. Eine hohe Prävalenz von chitinhaltigen Pathogenen (z.B. Plasmodien), scheint zu einem erhöhten Selektionsdruck gegen eine Chit 1-Defizienz zu führen. Andererseits ist unklar, ob das häufigere Auftreten der Chit 1-Defizienz in Mitteleuropa durch geringeren Selektionsdruck entsteht oder ein unbekannter Mechanismus umgekehrt zu positiver Selektion der Träger geführt hat^{23 24 32 33 34 61 67}.

Eine signifikant erhöhte Suszeptibilität gegenüber Infektionen konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

4.6.1. Fokus

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei den Fokussen (Lunge, Abdomen- mit Weichteil- und Wund-Infektionen, Harnwege, Bakteriämie oder andere, d.h. nicht eindeutig zuzuordnende Fokusse). Auch in der Unterscheidung zwischen ‚Infektion‘ und ‚keine Infektion‘ zeigte sich kein signifikant erhöhtes Risiko für Träger oder Nichtträger des Chit 1-Polymorphismus.

4.6.2. Gram-negative und gram-positive Erreger, Biofilmbildner

Weiterhin wurden die nachgewiesenen Infektionen nach den Untergruppen Infektion durch ‚Biofilm-Bildner‘, ‚gram-positive‘ und ‚gram-negative Erreger‘ untersucht:

Chitin ist ein Polysaccharid, welches aus einer Kette von β (1→4)-verbundenen N-Acetylglucosaminen besteht (dem Ort, an dem die Hydrolyse durch Chit 1 ansetzt). Gram-positive und gram-negative Erreger besitzen eine – unterschiedlich dicke – Hülle aus Strängen von ebenfalls β (1→4) glycosidisch miteinander verknüpften Zuckerderivatmolekülen⁶⁸. Auch bei Kapselbildnern besteht die Biofilm-Hülle aus einer wiederholten, β (1→4) glycosidisch verknüpften Disaccharideinheit^{68 69}. Es handelt sich also um dem Chitin verwandte Strukturen, und somit besteht die Möglichkeit, dass die hydrolytische Wirkung der Chit 1 auch hier angreift.

Bei Clusterung der nachweisbaren Infektionen nach gram-positiven, gram-negativen Erregern oder nach Kapselbildnern als Verursacher zeigte sich bei den Infektionen mit gram-positiven Erregern bei Nichtträgern bzw. Trägern des untersuchten Polymorphismus prozentual ein annähernder Gleichstand.

Anders sah es aus bei Infektionen mit gram-negativen Erregern: Hier war die Inzidenz bei Trägern der Chit 1-Defizienz 12,1 % höher, als bei Nichtträgern. Auch bei Infektionen mit Biofilmbildnern betrug der prozentuale Unterschied 7,2 % zum Nachteil der Träger. Dennoch ließ sich statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen Trägern und Nichtträgern des untersuchten Polymorphismus darstellen.

Dieses statistische Ergebnis ist zwar formal konform mit dem Ergebnis einer Studie, welche zeigt, dass rekombinante Chit 1 bakterielles Wachstum in Tränenflüssigkeit nicht inhibieren konnte⁷⁰. Der prozentuale Unterschied deckt sich jedoch in seiner Tendenz vor allem mit der Arbeit von Lehrnbecher et. al., die bei iatrogener

Immundefizienz ein signifikant erhöhtes Risiko für gram-negative Bakteriämien bei Trägern des Chit 1-Gen-Polymorphismus nachweisen konnte ²⁹.

Miteinzubeziehen ist auch ein Einschluss-Bias in der vorliegenden Arbeit: das relativ seltene Vorkommen der Mutation in unserer Kohorte bewirkt möglicherweise, dass sich statistisch keine signifikante Benachteiligung durch die Chit 1-Defizienz darstellen lässt. Bei den nicht unbeträchtlichen Unterschieden von 7,2 % bzw. sogar 12,1 % ist es durchaus möglich, dass sich bei einer größeren Fallzahl ein signifikanter Nachteil für die Träger des Chit 1-Polymorphismus nachweisen ließe.

4.6.3. Mykosen

Von besonderem Interesse waren Mykosen, da Chitin, das Substrat der Chit 1, Baustein der Zellwände von Pilzen ist ²⁶.

Innerhalb unserer Kohorte ließ sich kein signifikanter Vor- oder Nachteil für Inzidenz und Verlauf manifester Mykosen für die unterschiedlichen Chit 1-Genotypen nachweisen. Bei diesen Ergebnissen ist zu berücksichtigen, dass auch bei vorhandener Infektion oft kein mikrobiologischer Nachweis möglich ist. Insbesondere der Nachweis von Mykosen ist nicht stets eindeutig möglich und davon abhängig, dass gezielt und wiederholt danach gesucht wird. Bei Nachweis eines entsprechenden Erregers ist die Trennung zwischen Besiedelung und Infektion schwierig, sodass auch hier das Ergebnis verzerrt werden kann. Man muss also falsch-negative bzw. falsch-positive Nachweise oder fehlende Diagnostik in seine Überlegungen mit einbeziehen.

In der Literatur gibt es dazu widersprüchliche Untersuchungsergebnisse: einerseits konnten im Zuge von Aspergilleninfektionen signifikant erhöhte Chit 1-Spiegel nachgewiesen werden ^{28 71}. Auch eine Assoziation zwischen Chit 1-Defizienz und dem Nachweis von Aspergillus-Antigenen bei Cystische Fibrose-Patienten wird beschrieben, allerdings ohne Nachweis eines kausalen Zusammenhangs ⁷².

In einem In-Vitro Versuch gelang es, das Wachstum chitinhaltiger Fungi, das Knospen der Hyphen und den Hyphen-Hefe-Switch durch Applikation von rekombinanter Chit 1 einzuschränken. Im In-Vivo-Modell ließ sich sogar die Überlebenswahrscheinlichkeit neutropener Mäusen, die an systemischer Candidiasis oder Aspergillosis litten, durch die mehrfache Applikation rekombinanter Chit 1 verbessern ¹⁵.

Andererseits war retrospektiv bei den Überlebenden einer Candidasepsis kein Vorteil zugunsten von Trägern oder Nichtträgern des hier untersuchten Polymorphismus zu sehen ⁷³.

Letztendlich sind weitere Untersuchungen mit systematischer Suche nach Mykosen notwendig, um zu einem eindeutigeren Ergebnis zu gelangen.

4.6.4. Multiresistente Erreger

Bei 45 % der Nicht-Träger der Chit 1-Inaktivierung ließ sich eine Infektion oder Besiedelung mit multiresistenten Erregern nachweisen, im Gegensatz zu 49,3 % der Träger. Allerdings waren ohnehin nur bei 60 von 200 der eingeschlossenen Patienten multiresistente Erreger nachweisbar (entsprechend 30 %), sodass sich auch hier rechnerisch kein signifikanter Unterschied zu Gunsten oder Nachteil der Polymorphismus-Träger darstellen ließ. Eine vergleichbare Studie war im Rahmen der Literaturrecherche für diese Arbeit nicht auffindbar. Zusätzlich besitzen multiresistente Erreger nicht zwingend eine erhöhte Virulenz, sondern die namensgebenden Resistenzmechanismen beziehen sich auf das Verhalten der entsprechenden Erreger gegenüber einer antimikrobiellen Therapie unabhängig vom Immunstatus des betroffenen Patienten.

4.6.5. Krankheitsschwere

Zur Beurteilung der Krankheitsschwere waren die Mediane der Scores SAPS II, SOFA und TISS-28 am Aufnahmetag und im Verlauf ermittelt worden. Beim SAPS II gilt die Annahme, dass bei erhöhten Werten am Aufnahmetag, das Mortalitätsrisiko ansteigt⁴⁴⁴⁵. Ähnlich zeigt der SOFA-Score bei erhöhten Werten eine Korrelation mit erhöhter Letalität der Patienten an⁴⁴⁴⁸. Der TISS-28 ist validiert, die Krankheitsschwere eines Patienten anhand der Pflegeintensität einordnen zu können⁵⁰.

In der vorliegenden Beobachtung zeigte sich bei SOFA₁ und TISS-28₁ (erhoben jeweils am ersten intensivstationären Tag) signifikant geringere Werte bei den Trägern - also im Median eine rechnerisch geringere Krankheitsschwere bzw. geringeres Letalitätsrisiko bei Patienten mit Chit 1-Defizienz. Beim SAPS II war am Aufnahmetag kein signifikanter Unterschied zwischen Chit 1-Polymorphismus-Trägern und Nicht-Trägern nachweisbar. Aber auch hier zeigten die Träger des Polymorphismus rechnerisch eine geringere Krankheitsschwere.

Im Gegensatz dazu zeigt sich bei allen drei Scores in einer longitudinalen Verlaufsanalyse⁵⁴ während der ersten 20 Tage nach Aufnahme ein signifikanter Unterschied der Krankheitsschwere zu Lasten der Träger des Polymorphismus.

In der grafischen Umsetzung der Analyse kann man beobachten, wie die Scores, als Surrogatparameter der Krankheitsschwere, bei Trägern des Polymorphismus annähernd gleich hoch bleiben, während bei Patienten mit intakter Enzymfunktion die Krankheitsschwere sukzessive abnimmt. Allerdings ließ sich dieser Verlauf mangels ausreichender Fälle nach Tag 20 nicht weiter verfolgen.

Interessant ist hierbei die Umkehr der Situation im Verlauf besonders beim SAPS II, da vor allem der erste Wert nach Aufnahme als prognoserelevant gilt ⁴⁴.

Ein kausaler Hintergrund für schlechtere oder bessere Scores ließ sich, abgesehen von der Tendenz zu erhöhter Empfindlichkeit gegenüber gram-negativen Erregern und Kapselbildnern in dieser Arbeit nicht darstellen.

In einer Konfounderanalyse zur Beurteilung des Zusammenhangs der Krankheitsschwere (nach Scores) und einer neurologischen Aufnahmediagnose in Bezug auf den Endpunkt Mortalität zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Kohorten unabhängig von dieser Form der Erkrankung. Es gibt zwar vielfältige Hinweise für den Zusammenhang einer erhöhten Chit 1-Aktivität mit zentraldegenerativen Erkrankungen, eine Veröffentlichung bezüglich eines kausal-funktionellen Zusammenhangs war in der zugänglichen Literatur nicht auffindbar ^{1 63 65 66}.

4.7. Behandlungsqualität

Als ein möglicher Parameter für die generelle Behandlungsqualität und das Behandlungsergebnis betrachteten wir die Liegedauer auf den fünf beobachteten Intensivstationen, die Liegedauer innerhalb der Charité und die Mortalität im Zuge des ITS-Aufenthaltes. Dabei waren die Aufenthaltsdauern der von einer Chit 1-Defizienz Betroffenen und Nichtbetroffenen annähernd gleich. Jedoch zeigten in der beobachteten Kohorte die Nichtträger des Polymorphismus während ihres ITS-Aufenthaltes eine Mortalitätsrate von 34,9 % während bei Trägern des Polymorphismus die Rate um 8 % höher war.

Doch auch hier ergab sich, womöglich auf Grund der niedrigen Prävalenz und der entsprechend geringen Fallzahlen (Träger n = 71, Nichtträger n = 129), kein rechnerisch signifikanter Unterschied. Ein Auswahl-Bias analog zur Prävalenz der Mutation in der vorliegenden Arbeit und zu den Ergebnissen der Infektionsraten ist auch hier nicht ausschließbar.

Die Mortalität während des gesamten Krankenhausaufenthaltes ließ sich nicht nachverfolgen, da die Verlegungsziele der einzelnen Patienten keine vergleichbaren

Bedingungen boten (Normalstation, Intensivstation anderer Disziplin oder nach Extern (Rehabilitations-Einrichtungen, Intensivrehabilitationen, andere Krankenhäuser etc.).

4.8. SIRS, Sepsis

Im Gegensatz zum dichotomen Outcomeparameter Versterben vs. Nichtversterben interessierte uns als kontinuierlicher Wert das Auftreten und die Dynamik im Verlauf von SIRS und Sepsis und dies in Bezug auf eine mögliche Funktion der Chit 1 in der Immunabwehr.

Wieder zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Betroffenen einer Chit 1-Defizienz und Patienten mit intakter Enzymfunktion. Der Zustand SIRS trat im allgemeinen am 1. Tag nach Übernahme auf eine der Intensivstationen auf. Dies ist auch in Zusammenhang damit zu sehen, dass der überwiegende Teil der Patienten auf den hier beobachteten Intensivstationen postoperativ übernommen wurde oder eine operative Anamnese in der jüngsten Vergangenheit hatte. Es ist deshalb nicht zu trennen, ob die Veränderungen im Sinne eines SIRS infektiöser oder rein reaktiver Genese waren. Aber auch ein formell septischer Zustand trat, wenn er vorlag (bei 81,4 % der Nicht-Träger bzw. 80,3 % der Träger des Chit 1-Polymorphismus), in der Regel am dritten Tag nach Übernahme auf, unabhängig von der Funktion der Chit 1. In einer Kaplan-Meier-Analyse⁷⁴ zeigt sich besonders in der grafischen Darstellung ein fast paralleles Verlaufen der Kurven von Polymorphismus-Trägern und -Nichtträgern zum Auftreten von SIRS und Sepsis. In dieser Darstellung wird deutlich, dass es in der vorliegenden Studie innerhalb der ersten 20 Tage nach Aufnahme eines Patienten keine Unterschiede in der Dynamik des Auftretens von SIRS und Sepsis gab.

Dies spiegelt sich in verschiedenen Publikationen mit widersprüchlichen Ergebnissen zum Behandlungsergebnis von Patienten mit Infektionen bei defizitärem Chit 1-Gen wieder: Masoud et al. konnten 2002 keinen signifikanten Unterschied nachweisen in der Prävalenz von Chit 1-defizienten und Chit 1-intakten Überlebenden einer Candida-Sepsis⁷³. Demgegenüber konnten Choi et al. 2001 den hier untersuchten Polymorphismus von Chit 1 identifizieren, als assoziiert mit erhöhter Suszeptibilität für eine humane Filarieninfektion durch *Wucheria bancroftii* und systemischer Inflammation. Dies wiederum war von Hise et al. 2003 in einer differenten Population nicht nachweisbar^{75 76}. Van Eijk et al. zeigten 2005, dass neutropene Mäuse mit systemischer Mykose ein dosisabhängiges verbessertes Überleben zeigten nach Applikation von rekombinanter humaner Chitotriosidase¹⁵.

Eine Aussage zum Einfluss des Chit 1-Polymorphismus auf eine Suszeptibilität gegenüber Infektionen und deren Verlauf ist entsprechend den variierenden Ergebnissen der Literatur nicht sicher möglich.

Bei allen statistischen Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit ist zu bedenken, dass bei einer Fallzahl von $n = 200$, nur $n = 71$ Patienten (64 heterozygote und 7 homozygote Träger) von der Mutation betroffen waren. Insofern sind die Berechnungen bei der vergleichsweise geringen Fallzahl Betroffener insgesamt mit einem eher hohen Zufallseffekt versehen. Auch zeigt sich trotz der großen Breite der untersuchten Parameter kein deutlicher Trend dahingehend, worin die Ursache für Unterschiede zwischen Individuen mit intakter oder defizitärer Funktion der Chit 1 zum Vor- oder Nachteil für eine der beiden Populationen besteht.

4.9. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit ließ sich zwischen Trägern eines inaktivierenden Polymorphismus des Chit 1-Gens und nichtbetroffenen Individuen ein signifikanter Unterschied der Krankheitsschwerescores bei Aufnahme und im intensivstationären Verlauf darstellen. Eine erhöhte Empfindlichkeit von Individuen mit defizitärer Chit 1-Funktion gegenüber gram-negativen und kapselbildenden Erregern war manifest, aber nicht signifikant.

Mögliche Ursachen bei Diagnosen, Infektionen, Inzidenz und Dynamik von SIRS und Sepsis, Liegedauer und Mortalität ließen sich nicht mit statistischer Signifikanz belegen. Dennoch gibt es in der Literatur und der vorliegenden Studie Hinweise darauf, dass eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber gramnegativen Erregern und Biofilmbildnern bestehen könnte. Welche Rolle eine defiziente Funktion von Chitinasen für die erhöhte Suszeptibilität gegenüber diesen Erregern und Mykosen spielt, sollte weiter untersucht werden. Gerade die schwierig diagnostizier- und therapierbaren invasiven Mykosen eröffnen ein weites Feld, sowohl was eine mögliche Prophylaxe bei Chit 1-Defizienz, als auch was eventuelle Therapieoption durch die Gabe rekombinanter Chit 1 angeht.

Auch der Zusammenhang zwischen neurodegenerativen Erkrankungen und einer erhöhten Chit 1-Aktivität ist auffällig, aber noch wenig erforscht. Besonders der Nachweis von chitinartigen Polysaccharid-Strukturen in Amyloid-Plaques in Gehirnen von an Morbus Alzheimer erkrankten Individuen⁶⁶ eröffnet die Möglichkeit weiterer fokussierter Forschungsansätze.

Eine Beurteilung welche Ursachen und Therapieoptionen bestehen, ist zu diesem Zeitpunkt und Stand der Forschung jeweils nicht möglich.

4.10. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob ein aktivitätsreduzierender Polymorphismus des Chit 1-Gens bei Patienten in intensivmedizinischer Behandlung eine qualitative Veränderung der Behandlungsergebnisse zur Folge hat.

Die Hypothese war, dass sich unter erhöhtem Stress, damit reduzierter Immunkompetenz und bei zusätzlich eingeschränkter Funktion der Chit 1 ggf. deren physiologische Funktion demaskiert und der Krankheitsverlauf modifiziert würde.

Weiteres Ziel diesbezüglich war es, den Krankheitsverlauf anhand von Krankheitsschwere-Scores und Parametern, die das Behandlungsergebnis beschreiben, qualitativ zu bewerten, sowie das Auftreten und die Dynamik des Verlaufs von SIRS und Sepsis und eine möglicherweise veränderte Infektanfälligkeit zu erkennen.

Dazu wurden 200 Patienten von 5 Intensivstationen am Campus Virchow Klinikum und Campus Mitte in die Untersuchung eingeschlossen. Diese wurden nach Abschluss der Datenerhebung entsprechend ihres Genotyps in 2 Gruppen aufgeteilt. Die Verteilung betrug n = 129 Patienten mit regulärem Chit 1-Gen zu n = 71 Trägern des untersuchten Polymorphismus.

Es handelt sich um eine prospektive, kontrollierte, nicht-interventionelle, klinische Observationsstudie.

Die einzelnen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass im Vergleich zwischen den beiden untersuchten Populationen, kein statistisch signifikanter Unterschied darstellbar war bezüglich Basischarakteristika, Infektionsverteilung, Fokussen, Erregern, Vorkommen bzw. Dynamik im Auftreten von SIRS und Sepsis, der intensivstationären Behandlungsdauer und der Mortalität.

Die Krankheitsschwere-Scores SOFA und TISS-28 zeigten bei Aufnahme signifikant höhere Werte bei Individuen, die nicht von einer Chit 1-Mutation betroffen waren. Im Verlauf ließ sich im Gegensatz dazu für SAPS II, SOFA und TISS-28 darstellen, dass ein signifikanter Unterschied in der Krankheitsschwere bestand: Während unter intakter Enzymfunktion die Score-Werte sanken, blieben bei Polymorphismus-Betroffenen diese Werte gleich hoch. Ursachen hierfür ließen sich nicht darstellen.

Abschließend lässt sich sagen, dass aus der vorliegenden Untersuchung trotz signifikanter Unterschiede der Krankheitsschwere im Verlauf keine mögliche Funktion der Chitotriosidase 1 oder Folgen des Chitotriosidase 1-Polymorphismus ableitbar waren.

5. Verzeichnisse

5.1. Literatur

1. Malaguarnera L. Chitotriosidase: The ying and yang. Cellular and molecular life sciences : CMLS 2006;63:3018-29.
2. Structure and properties of carbohydrates (sugars) ii. Webmaster, Department of Chemistry, University of Maine, Orono, ME 04469. (Accessed 26.09.2013, 2013, at <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Basics/Sugars2.html>.)
3. Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, et al. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. J Biol Chem 1998;273:25680–5.
4. Fusetti F, von Moeller H, Houston D, et al. Structure of human chitotriosidase: Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. Journal of Biological Chemistry 2002/07/12:25537 - 44.
5. Flach J, Pilet PE, Jollès P. What's new in chitinase research. Experientia 1992;48:701-16.
6. Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK. Bacterial chitinases: Properties and potential. Critical reviews in biotechnology 2007;27:21-8.
7. Boot RG, Renkema GH, Strijland A, van Zonneveld AJ, Aerts JM. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. J Biol Chem 1995;270:26252-6.
8. Boussac M, Garin J. Calcium-dependent secretion in human neutrophils: A proteomic approach. Electrophoresis 2000;21:665-72.
9. Renkema GH, Boot RG, Strijland A, et al. Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. Eur J Biochem 1997;244:279-85.
10. Tjoelker L, Gosting L, Frey S, et al. Structural and functional definition of the human chitinase chitin-binding domain. The Journal of Biological Chemistry 2000;275, No.1:514-20.
11. Merzendorfer H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. Eur J Cell Biol 2011;90:759-69.
12. Shen Z, Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. A gut-specific serine protease from the malaria vector *Anopheles gambiae* is downregulated after blood ingestion. Insect Molecular Biology 2000;9:223-9.

13. Malaguarnera L, Musumeci M, Licata F, Di Rosa M, Messina A, Musumeci S. Prolactin induces chitotriosidase gene expression in human monocyte-derived macrophages. *Immunology letters* 2004;94:57-63.
14. Malaguarnera L, Musumeci M, Di Rosa M, Scuto A, Musumeci S. Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages. *Journal of clinical laboratory analysis* 2005;19:128-32.
15. van Eijk M, van Roomen CP, Renkema GH, et al. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *International immunology* 2005;17:1505-12.
16. Di Rosa M, Musumeci M, Scuto A, Musumeci S, Malaguarnera L. Effect of interferon-gamma, interleukin-10, lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha on chitotriosidase synthesis in human macrophages. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2005;43:499-502.
17. Barone R, Simporé J, Malaguarnera L, Pignatelli S, Musumeci S. Plasma chitotriosidase activity in acute plasmodium falciparum malaria. *Clinica Chimica Acta* 2003;331:79-85.
18. Hollak CEM, van Weely S, van Oers MHJ, et al. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of gaucher' disease. *JClin Invest* 1994;93:1288-92.
19. Brinkmann J, Wijburg FA, Hollak CE, et al. Plasma chitotriosidase and ccl 18: Early biochemical surrogatemarkers in typ b niemann-pick disease. *J Inherited Metab Dis* 2005;28:13-22.
20. Michelakakis H, Dimitriou E, Labadaridis I. Short report: The expanding spectrum of disorders with elevated plasma chitotriosidase activity: An update. *J Inherit MetabDis* 2004;27:705-6.
21. Boot RG, van Achterberg TA, van Aken BE, et. al. Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:687-94.
22. Guo Y, He W, Boer AM, et al. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis* 1995;18:717-22.
23. Barone R, Di Gregorio F, Romeo MA. Plasmachitotriosidase activity in patients with β -thalassemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 1998;25:1-8.

24. Sotgiu S, Musumeci S, Marconi S, Gini B, Bonetti B. Different content of chitin-like polysaccharides in multiple sclerosis and alzheimer's disease brains. *Journal of neuroimmunology* 2008;197:70-3.
25. Sotgiu S, Barone R, Arru G, et al. Intrathecal chitotriosidase and the outcome of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2006;12:551-7.
26. Debono M, Gordee RS. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:471-7.
27. Overdijk B, Van Steijn GJ, Odds FC. Chitinase levels in guinea pig blood are increased after systemic infection with *aspergillus fumigatus*. *Glycobiology* 1996;6:627-34.
28. Labadaridis I, Dimitriou E, Theodorakis M, Kafalidis G, Velegraki A, Michelakakis H. Chitotriosidase in neonates with fungal and bacterial infections. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition* 2005;90:F531-2.
29. Lehrnbecher T, Bernig T, Hanisch M, et al. Common genetic variants in the interleukin-6 and chitotriosidase genes are associated with the risk for serious infection in children undergoing therapy for acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005;19:1745-50.
30. Pan XQ, Harday J, Lee R, Shih CC. Chitinase induces lysis of mcf-7 cells in culture and of human breast cancer xenograft b11-2 in scid mice. *AnticancerRes* 2005;25:3167-72.
31. Eiberg H, Den Tandt WR. Assignment of human plasma methylumbelliferyl-tetra-n-acetylchitotetraoside hydrolase or chitinase to chromosome 1q by a linkage study. *Hum Genet* 1997;101:205-7.
32. Malaguarnera L, Simpore J, Prodi DA, et al. A 24-bp duplication in exon 10 of human chitotriosidase gene from the sub-saharan to the mediterranean area: Role of parasitic diseases and environmental conditions. *Genes and immunity* 2003;4:570-4.
33. Piras I, Melis A, Ghiani ME, et al. Human chit1 gene distribution: New data from mediterranean and european populations. *Journ. of human genetics* 2007;52:110-6.
34. Arndt S, Hobbs A, Sinclair I, Lane AB. Chitotriosidase deficiency: A mutation update in an african population. *JIMD reports* 2013;10:11-6.
35. Schneemilch CE, Schilling T, Bank U. Effects of general anaesthesia on inflammation. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 2004;18:493-507.

36. Sotgiu S, Angius A, Embry A, Rosati G, Musumeci S. Hygiene hypothesis: Innate immunity, malaria and multiple sclerosis. *Medical Hypotheses* 2008;70:819-25.
37. Copra. 1993. at [http://www.copra-system.de/.](http://www.copra-system.de/))
38. MedVision AG Heinrich-Hertz-Str. 9 D-59423 Unna. Medvision 3.40.3. 3.40.3. ed2000
39. Sun Microsystems GmbH. Mysql. 5.0 ed.
40. Microsoft Office. Access database program 2002.
41. Access-tutorial. at [http://www.access-tutorial.de/.](http://www.access-tutorial.de/))
42. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness: A practical scale. *The Lancet* 1974;304:81-4.
43. Sternbach GL. The glasgow coma scale. *The Journal of Emergency Medicine* 2000;19:67-71.
44. Lewandowski K, Lewandowski M. Scoring-systeme auf der intensivtherapiestation. *Der Anaesthetist* 2003;52:965-90.
45. Le Gall J LSSF. A new simplified acute physiology score (saps ii) based on a european/north american multicenter study. *JAMA* 1993;270:2957-63.
46. Kriwet DIfMDul. Berechnung der aufwandspunkte für die intensivmedizinische komplexbehandlung. In: *Gesundheit I i G d B f*, ed. DIMDI-Website2007.
47. Scoring systems for icu and surgical patients: Saps ii (new simplified acute physiology score) SFAR. (Accessed 30.05.2013, 2013, at <http://www.sfar.org/scores2/saps2.html#haut.>)
48. Vincent J-L, Moreno R, Takala J, et al. The sofa (sepsis.Related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 1996;22:707-10.
49. Ferreira F, Bota D, Bross A, Mélot C, Vincent J. Serial evaluation of the sofa score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA* 2001;286:1754-8.
50. Miranda D-R, MD, de Rijk AB, Schaufeli WP. Simplified therapeutic intervention scoring system: The tiss-28 items--results from a multicenter study. *Critical Care Medicine* 1996;24:64-73.
51. Moreno R, Morais P. Validation of the simplified therapeutic intervention scoring system on an independent database. *Intensive Care Med* 1997;23:640-4.

52. Keene A-R, RN, Cullen D-J, MD. Therapeutic intervention scoring system: Update 1983. *Critical care medicine* 1983;11:1-3.
53. Fachgesellschaften AdWM. Prävention, diagnose, therapie und nachsorge der sepsis. AWMF-Leitlinien-Register: Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
Koordination: Prof. Dr. med. K. Reinhart, Anästhesiologie u. Intensivtherapie, Friedrich-Schiller-Universität Jena; 2010:1-28.
54. Brunner E, Domhof S, Langer F. Nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. University of Michigan: J. Wiley; 2002.
55. Ogawa K, Hirai M, Katsube T, et al. Suppression of cellular immunity by surgical stress. *Surgery* 2000;127:329-36.
56. Decker D, Schöndorf M, Bidlingmaier F, Hirner A, von Ruecker AA. Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 t-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell-mediated and up-regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma. *Surgery* 1996;119:316-25.
57. Kurosawa S, Kato M. Anesthetics, immune cells, and immune responses. *Journal of Anesthesia* 2008;22:263-77.
58. Den Tandt WR, Inaba T, Verhamme I, Overdyk B, Brouwer J, Prieur D. Non-identity of human plasma lysozyme and 4-methylumbelliferyl-tetra-n-acetyl- β -d-chitotetraoside hydrolase. *International Journal of Biochemistry* 1988;20:713-9.
59. Overdijk B, Van Steijn G. Human serum contains a chitinase: Identification of an enzyme, formerly described as 4-methylumbelliferyl-tetra-n-acetylchitotetraoside hydrolase (μ -tact hydrolase). *Glycobiology* 1994;4:797-803.
60. Renkema GH, Boot RG, Muijsers AO, Donker-Koopman WE, Aerts JMFG. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:2198-202.
61. Rodrigues M, Muller K, Pereira V, Martins A, D'Almeida V. Chitotriosidase deficiency in brazil: Evaluation of enzyme activity and genotypes. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2010;44:305-6.
62. Canudas J, Cenarro A, Civeira F, et al. Chitotriosidase genotype and serum activity in subjects with combined hyperlipidemia: Effect of the lipid-lowering agents, atorvastatin and bezafibrate. *Metabolism* 2001;50:447-50.

63. Watabe-Rudolph M, Song Z, Lausser L, et al. Chitinase enzyme activity in csf is a powerful biomarker of alzheimer disease. *Neurology* 2012;78:569-77.
64. Sotgiu S, Barone R, Zanda B, et al. Chitotriosidase in patients with acute ischemic stroke. *European Neurology* 2005;54:149-53.
65. Olsson B, Malmeström C, Basun H, et al. Extreme stability of chitotriosidase in cerebrospinal fluid makes it a suitable marker for microglial activation in clinical trials. *Journal of Alzheimer's Disease* 2012;32:273-6.
66. Castellani R, Perry G, Smith M. The role of chitin-like polysaccharides in alzheimer disease. *Neurotoxicity Research* 2007;12:269-74.
67. Lee P, Waalen J, Crain K, Smargon A, Beutler E. Human chitotriosidase polymorphisms g354r and a442v associated with reduced enzyme activity. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2007;39:353-60.
68. Thomas C, Hagedorn M, Kolesnikova L, Salfelder K, Weyers I, Grimm I. Atlas der infektionskrankheiten. Stuttgart, Germany: Schattauer GmbH, Stuttgart; 2010.
69. Hermann J. Kombinierte quanten- und molekularmechanische untersuchungen zur acetylierung von klasse a β -lactamasen. Göttingen: Cuvillier Verlag; 2004.
70. Hall AJ, Morroll S, Tighe P, Götz F, Falcone FH. Human chitotriosidase is expressed in the eye and lacrimal gland and has an antimicrobial spectrum different from lysozyme. *Microbes and Infection* 2008;10:69-78.
71. Coskun O, Ozturk M, Erdem H, et al. Can chitotriosidase be a surrogate marker for invasive fungal disease? *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology* 2012;22:256-60.
72. Livnat G, Bar-Yoseph R, Mory A, et al. Duplication in chit1 gene and the risk for aspergillus lung disease in cf patients. *Pediatric Pulmonology* 2013:n/a-n/a.
73. Masoud M, Rudensky B, Elstein D, Zimran A. Chitotriosidase deficiency in survivors of candida sepsis. *Blood Cells, Molecules, Diseases* 2001;29(1):116-8.
74. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association* 1958;53:457-81.
75. Choi E, Zimmerman P, Foster C, et al. Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with wuchereria bancrofti in south india. *Genes and immunity* 2001;2:248-53.

76. Hise AG, Hazlett FE, Bockarie MJ, Zimmerman PA, Tisch DJ, Kazura JW.
Polymorphisms of innate immunity genes and susceptibility to lymphatic filariasis.
Genes and immunity 0000;4:524-7.

5.2. Abbildungen

Abbildung 1:	Kristalline Struktur der Chitotriosidase1	S. 10
Abbildung 2:	Strukturformel Chitin	S. 10
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Mutation im Chit 1-Gen	S. 12
Abbildung 4:	Einschlussbaum	S. 15
Abbildung 5:	Beispielhafte Seiten der Datenbank der Outcome-Studie	S. 18
Abbildung 6:	Banden des Chit 1 Gens nach Gel-Elektrophorese	S. 26
Abbildung 7:	Enzymaktivität korreliert mit dem Genotyp	S. 29
Abbildung 8:	Grafische Darstellung der nach Kaplan-Meier geschätzten Überlebenskurven bezüglich des Auftretens von SIRS	S. 38
Abbildung 9:	Grafische Darstellung der nach Kaplan-Meier geschätzten Überlebenskurven bez. des erstmaligen Auftretens von Sepsis	S. 39

5.3. Grafiken

Grafik A:	Longitudinale Analyse zum Krankheitsschwere-Score SAPS II im Verlauf der ersten 20 Tage ITS-Aufenthalt	S. 33
Grafik B:	Longitudinale Analyse zum Krankheitsschwere-Score SOFA im Verlauf der ersten 20 Tage ITS-Aufenthalt	S. 34
Grafik C:	Longitudinale Analyse zum Krankheitsschwere-Score TISS-28 im Verlauf der ersten 20 Tage ITS-Aufenthalt	S. 34

5.4. Tabellen

Tabelle 1:	Mikrobiologisch untersuchte Materialien	S. 22
Tabelle 2:	Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock entsprechend den ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz-Kriterien	S. 23
Tabelle 3:	Temperaturen und Zeiten der PCR	S. 25
Tabelle 4:	Basischarakteristika	S. 28
Tabelle 5:	Vorerkrankungen, Aufnahmediagnosen und Co-Morbiditäten	S. 29

Tabelle 6:	Infektionen nach Fokussen	S. 31
Tabelle 7:	Infektionen nach Erregergruppen	S. 31
Tabelle 8:	Mediane der Krankheitsschwere-Scores am Aufnahmetag	S. 32
Tabelle 9:	Dauer des stationären Aufenthaltes, Mortalität	S. 35
Tabelle 10:	Logistische Regression, Endpunkt Mortalität	S. 36
Tabelle 11:	Inzidenz und Zeitraum bis zum Auftreten von SIRS oder Sepsis	S. 37
Tabelle 12:	Rechnerische Kaplan-Meier-Analyse des Überlebens bis zum Auftreten von SIRS	S. 38
Tabelle 13:	Rechnerische Kaplan-Meier-Analyse des Überlebens bis zum erstmaligen Auftreten einer Sepsis	S. 39

5.5. Abkürzungen

Chit 1	Chitotriosidase 1
DNA	Desoxyribonucleid Acid (Desoxyribonukleinsäure)
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
GCS	Glasgow Coma Scale
ID	Identität
ITS	Intensivstation(en)
ICU	Intensive Care Unit
MAP	mittlerer arterieller Druck
OP	Operation / Operationssaal
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCT	Procalcitonin
SAPS II	Simplified Akute Physiologie Score
SAPS II ₁	entsprechender Score am Aufnahmetag
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SOFA ₁	entsprechender Score am Aufnahmetag
TISS-28	Therapeutic Intervention Scoring System von 1996
TISS-28 ₁	entsprechender Score am Aufnahmetag

6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Susanne Heim, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Untersuchung zur Outcome-Relevanz einer Chitotriosidase 1-Mutation bei intensivstationär behandelten Patienten 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 kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM 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

Unterschrift

6.1. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Susanne Heim hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

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

Polymorphisms of the toll-like receptor 2 and 4 genes are associated with faster progression and a more severe course of sepsis in critically ill patients.

J. Int. Med. Res. 2014 Jan;42(1):93-110.

Beitrag im Einzelnen:

Datenerhebung

Publikation 2:

Teilergebnisse dieser Promotion sind vor Abschluss des Promotionsverfahrens mit Genehmigung des Promotionsausschusses der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin als Abstrakt für die Posterpublikation eingereicht und als Kurzvortrag ausgewählt worden:

Tamarkin A, Tafelski S, Heim S, Nachtigall I and Spies C.

Untersuchung zur Outcome-Relevanz einer Chitotriosidase 1-Mutation bei intensivstationär behandelten Patienten.

Vorgetragen am 09.05.2014 auf dem Deutschen Anästhesiekongress 2014, 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin in Leipzig

Beitrag im Einzelnen:

Datenerhebung, Bearbeitung und Auswertung im Rahmen der vorliegenden Promotion

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

7. Lebenslauf

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

8. Wissenschaftliche Veröffentlichungen/Artikel

1.

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

Polymorphisms of the toll-like receptor 2 and 4 genes are associated with faster progression and a more severe course of sepsis in critically ill patients.

J. Int. Med. Res. 2014 Jan;42(1):93-110.

2.

Teilergebnisse dieser Promotion sind vor Abschluss des Promotionsverfahrens mit Genehmigung des Promotionsausschusses der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin als Abstrakt für die Posterpublikation eingereicht und als Kurzvortrag ausgewählt worden:

Tamarkin A, Tafelski S, Heim S, Nachtigall I and Spies C.

Untersuchung zur Outcome-Relevanz einer Chitotriosidase 1-Mutation bei intensivstationär behandelten Patienten.

Vorgetragen am 09.05.2014 auf dem Deutschen Anästhesiekongress 2014, 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin in Leipzig

9. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. med. Claudia Spies, die mir das vorliegende hochinteressante Thema zur Verfügung stellte. Dabei unterstützte sie stets unsere Arbeitsgruppe und inspirierte uns durch lehrreiche und anregende Diskussionen mit neuen Impulsen zur Mitkonzeption der Fragestellung und großen Freude am wissenschaftlichen Arbeiten. Auch für die Unterstützung der Arbeitsgruppe während der Datenerhebung sowie der finalen Korrektur der Veröffentlichung und der Dissertationsarbeit gilt ihr mein Dank. Ich möchte an dieser Stelle auch meine Wertschätzung für die mir in ihrer Klinik zuteilwerdende fundierte klinische Ausbildung und das qualitätsorientierte Klima ausdrücken, was mir die Arbeit an der Fragestellung sehr erleichtert hat.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich natürlich auch bei Dr. Irit Nachtigall bedanken für die Mitkonzeption des Themas, ihre exzellente Betreuung, konstruktive Kritik und blitzschnelle Durchsicht des Manuskripts. Ohne ihren stets engagierten Einsatz, ihre engmaschige und kreative Begleitung, Geduld und außerordentliche Motivation wäre diese Studienarbeit nicht entstanden.

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

Insbesondere fühle ich mich meinem Mitdoktoranden und Kollegen Dr. med. Sascha Tafelski für die Hilfe bei der Dateninterpretation und für seine stets motivierte Unterstützung herzlich zu Dank verpflichtet. Auch meinem Kollegen Dr. med. Andrey Tamarkin gebührt mein Dank für die geduldige Hilfe bei der Aufklärung der Patienten, die motivierenden Worte und nicht zuletzt die abschließende Beratung und Korrektur.

Den Doktoranden des ABx Teams 2007-2008 und den aufklärenden Studien- und Stationsärzten sei für ihre Mitwirkung bei der Datenerhebung gedankt.

Auch den Mitarbeitern des Labor Berlin, Herrn Kettelgerdes und Frau Felsch, welche im Auftrag von PD Dr. Weimann die Analysen von Genotyp und Enzymaktivität zeitnah und engagiert vornahmen, bin ich sehr zu Dank verpflichtet. Des Weiteren möchte ich mich bei den Patientinnen und Patienten bzw. ihren betreuenden Angehörigen für ihre Bereitschaft, diese Studie durch eine Teilnahme zu unterstützen, bedanken.