

Aus der Klinik für Innere Medizin II
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Frank Lammert

Immundysregulation bei Patienten mit Akut auf Chronischem Leberversagen

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät***

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von: Daniel Stephan Vidaček
geboren am 29.10.1976 in Moers

INHALTSVERZEICHNIS	2
1 <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	5
1.1 Deutsche Fassung	5
1.2 Englische Fassung	6
2 <u>EINLEITUNG</u>	9
2.1 Akut auf chronisches Leberversagen	9
2.2 Sepsis	11
2.2.1 Epidemiologie der Sepsis	12
2.2.2 SIRS-Definition und Klinische Kriterien der Sepsis	12
2.2.3 Genetische Suszeptibilität	14
2.3 Interleukin-6 (IL-6)	17
2.4 Ziele der Arbeit	19
3 <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	20
3.1 Patientenkollektive	20
3.2 Serumspiegel der Zytokine IL-6 und IL-10	23
3.3 <i>Ex vivo</i> -Produktion von TNF- α und IL-6	24
3.4 HLA-DR-Expression auf Monozyten	24
3.5 Genotypisierung des c.-174G>C-Polymorphismus	25
3.5.1 DNA-Isolierung	25
3.5.2 Quantifizierung des DNA-Gehalts	26
3.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27

3.5.4	5'-Nuklease-Assay	28
3.5.5	Design der Primer für den IL-6-Polymorphismus	29
3.6	Klinisch-chemische Parameter	31
3.7	Medizinische Scoring-Systeme	32
3.7.1	SAPS II-Score	32
3.7.2	TISS28-Score	32
3.7.3	Child-Pugh-Score	33
3.7.4	MELD-Score (Model of End Stage Liver Disease)	34
3.8	Statistische Methoden	34
3.9	Geräte und Reagenzien	35
4	<u>ERGEBNISSE</u>	37
4.1	Demographische und klinische Charakteristika der Studienpopulationen	37
4.1.1	ACLF	37
4.1.2	Sepsis	40
4.2	Unspezifische Entzündungsparameter sind bei Patienten mit schwerer Sepsis im Vergleich zu Patienten mit stabiler Leberzirrhose und ACLF erhöht	41
4.3	Patienten mit ACLF, schwerer Sepsis und stabiler Leberzirrhose unterscheiden sich hinsichtlich der pro- und antiinflammatorischen Zytokinspiegel	42
4.4	Die zelluläre Immunfunktion ist bei Patienten mit ACLF und schwerer Sepsis gleichartig gestört	43

4.5	Das C-Allel des IL-6 c.-174G>C-Polymorphismus ist mit dem Auftreten eines septischen Schocks assoziiert	45
4.6	IL-6 Serumkonzentrationen und IL-6 <i>ex vivo</i> Sekretion sind mit dem IL-6 c.-174G>C-Genotypen assoziiert	47
5	<u>DISKUSSION</u>	49
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	59
7	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	68
8	<u>DANKSAGUNG</u>	69
9	<u>PUBLIKATIONEN</u>	70
10	<u>LEBENS LAUF</u>	71

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 DEUTSCHE FASSUNG

Für Patienten mit einer schweren Sepsis wurde gezeigt, dass eine zelluläre Immunsuppression mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist. Das akut auf chronische Leberversagen (ACLF) ist definiert als akute Verschlechterung einer vorbestehenden, chronischen Lebererkrankung, gewöhnlich verursacht durch ein auslösendes Ereignis, verbunden mit einer erhöhten 3-Monats-Mortalität aufgrund eines Multiorganversagens. Eine verminderte HLA-DR-Expression und eine reduzierte TNF- α *ex vivo*-Sekretion finden sich bei Patienten mit einem SIRS und zeigen eine Immunparalyse von prognostischer Bedeutung an. In dieser Arbeit verglichen wir funktionelle Immunparameter bei Patienten mit ACLF, schwerer Sepsis und stabiler Leberzirrhose. 27 Patienten mit ACLF wurden bei Aufnahme auf die Intensivstation in die Studie eingeschlossen. 24 Patienten mit stabiler Zirrhose und 31 Patienten mit schwerer Sepsis dienten als Kontrollgruppe. Erstmals konnte bei Patienten mit akut dekompensierter Leberzirrhose im Vergleich zu Patienten mit stabiler Leberzirrhose eine Abnahme der TNF- α *ex vivo*-Sekretion und der HLA-DR-Expression auf Monozyten nachgewiesen werden. Die Höhe der zellulären Immunsuppression war in diesem ACLF-Kollektiv vergleichbar mit der von Patienten mit schwerer Sepsis. Die Immundysfunktion bei Patienten mit ACLF war unabhängig von der Genese der Lebererkrankung. Die Arbeit bildet eine Grundlage für weitere Studien zu immunmodulierenden Therapien bei Patienten mit ACLF, die eine „sepsisähnliche“ Immunparalyse aufweisen.

Weiter führten wir eine Genotypisierung einer Promotor-Variante des IL-6-Gens durch. Es wurden insgesamt 112 Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock in die Studie eingeschlossen. Bei Aufnahme auf die Intensivstation wurden zusätzlich die IL-6-Serumkonzentrationen und IL-6 *ex vivo* Sekretion nach Stimulation mit LPS in einem Vollblutassay gemessen. Es konnte eine Assoziation des IL-6 c.-174G>C-Promotor-Polymorphismus mit dem Auftreten eines septischen Schocks nachgewiesen werden. Des Weiteren bestand eine inverse Korrelation der systemischen IL-6-Serumkonzentrationen mit dem C-Allel der Promotorvariante. Dieses Allel war zudem mit der stimulierten IL-6 *ex vivo* Sekretion assoziiert. Die Ergebnisse weisen auf ein komplexes regulatorisches Netzwerk hin, welches die IL-6-Expression während des septischen Schocks steuert und von genetischen Faktoren abhängig ist. An diesen Beobachtungen können sich Design und Analyse zukünftiger immunologischer Interventionsstudien bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock orientieren.

1.2 SUMMARY

Immunophenotyping of leucocytes serves to assess the activation of the immune system. In this regard HLA-DR expression on monocyte surface and TNF- α *ex vivo* production after stimulating of peripheral blood mononuclear cells with lipopolysaccharide represent functional immune markers, with a decrease indicating immune paralysis, which is associated with poor prognosis as shown for patients with severe sepsis and septic shock. The aim of the present study was to directly compare functional immune parameters in patients with acute on chronic liver failure (ACLF), severe sepsis, and non-decompensated cirrhosis. Overall, 27 patients with ACLF were investigated at admission to a medical ICU; 24 patients with stable liver cirrhosis and 31 patients with severe sepsis served as control groups. In all subjects, serum levels of IL-6 and IL-10, *ex vivo* production of TNF- α in a whole blood assay and monocyte surface HLA-DR expression were determined. In patients with ACLF or sepsis, *ex vivo* TNF- α production and HLA-DR expression were severely decreased as compared to subjects with stable cirrhosis. Contrary, IL-6 levels were highest in septic patients, followed by subjects with ACLF and cirrhotic patients. Immune dysfunction in ACLF was independent of the aetiology of liver cirrhosis. Patients with ACLF and severe sepsis display a similar degree of immune paralysis. The reduced cellular immune function in subjects with ACLF might contribute to the increased infectious morbidity of these patients and provides a rational basis for prevention strategies.

Furthermore, we systematically investigated the IL-6 c.-174 promoter polymorphism with regard to the presence of shock in patients with sepsis, IL-6 serum levels, and *ex vivo* secretion of IL-6. In total, 112 consecutive subjects with severe sepsis and septic shock according to consensus criteria were enrolled. *Ex vivo* secretion of IL-6 after stimulation with lipopolysaccharide in a whole blood assay and IL-6 serum concentrations were determined after admission. The IL-6 c.-174 promoter polymorphism was associated with septic shock. Additionally, we observed an inverse correlation of systemic IL-6 concentrations and *ex vivo* secretion of IL-6 according to c.-174 promoter genotypes. IL-6 serum concentrations were highest in patients with the GG genotype, followed by genotype CG, and lowest in individuals with the CC genotype. A higher *ex vivo* secretion of IL-6 was detected in heterozygous individuals and patients with the genotype CC as compared to carriers of the genotype GG. This indicates the presence of a complex regulatory network that governs IL-6 expression during septic shock and depends on genetic variation. These findings might have implications for the design and analysis of immune intervention studies in patients with severe sepsis and septic shock.

2 EINLEITUNG

2.1 AKUT AUF CHRONISCHES LEBERVERSAGEN

Die erhöhte Anfälligkeit für Infektionserkrankungen bei Patienten mit Leberzirrhose wurde verschiedenen unspezifischen Störungen der Immunabwehr einschließlich der Funktionsstörung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zugeschrieben (Altin et al. 1983; Bahr and Manns 2001; Gomez et al. 1994; Lahnborg et al. 1981; Rajkovic and Williams 1986). Mehrere Studien haben erhöhte proinflammatorische Zytokinspiegel bei Patienten mit Leberzirrhose nachgewiesen, die wiederum mit Entzündungsparametern und klinischen Komplikationen korreliert werden konnten (Albillos et al. 2004; Byl et al. 1993; Genesca et al. 1999; Le Moine et al. 1994; Navasa et al. 1998; Rodriguez-Ramos et al. 2001). Systemische Zytokinspiegel spiegeln jedoch nur die Höhe der Immunantwort, die sich weiter aufschlüsseln lässt, wider. Zelluläre Immunparameter mögen das Niveau der Aktivierung des Immunsystems besser darstellen. In diesem Zusammenhang hat sich die Fähigkeit mononukleärer Zellen, Zytokine *ex vivo* zu sezernieren, als zuverlässiger Marker für Immunaktivierung in definierten Phasen der Erkrankung erwiesen (Cavaillon et al. 2001; Kox et al. 2000; Muller Kobold et al. 2000; Oberhoffer et al. 1999). Es ist gezeigt worden, dass sich bei Patienten mit äthyltoxischer Leberzirrhose die Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) durch mononukleäre Zellen aus peripherem Blut *ex vivo* als Antwort auf die Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) erhöhen lässt (Daniluk et al. 1996; Deviere et al. 1990; Le Moine et al. 1995; Yoshioka et al. 1989). Bei diesen Patienten ist auch die Expression verschiedener Adhäsions- und Zelloberflächenmoleküle, z.B. HLA-DR, gesteigert (Albillos et al. 2004; Luna-Casado et al. 1997; Santos-Perez et al. 1996).

Die meisten dieser Studien wurden allerdings bei Patienten durchgeführt, die sich zwar im Endstadium, aber in einem stabilen Zustand einer Lebererkrankung befanden. Hingegen ähnelt das klinische Bild des akuten Leberversagens bzw. der dekompensierten Leberzirrhose eher dem einer schweren Sepsis bzw. eines SIRS (systemic inflammatory response syndrome) mit Multiorganversagen (Albillos et al. 2003; Harry et al. 2002; Rolando et al. 2000). Das akut auf chronische Leberversagen (ACLF) definiert einen Zustand, bei dem ein auslösender Faktor zu einer akuten Dekompensation einer stabilen Leberzirrhose führt. Diese bedingt eine akute Reduktion der Lebersyntheseleistung und führt zu einer Einschränkung der metabolischen Aktivität sowie zu hämodynamischen Veränderungen. Zu den auslösenden Faktoren zählen die akute Ösophagusvarizenblutung, infektiöse Komplikationen, beispielsweise die spontan-bakterielle Peritonitis oder die Sepsis, sowie direkte hepatotoxische Einflüsse, wie z.B. Alkohol und Medikamente. Das ACLF weist klinische Gemeinsamkeiten mit einer Leberzirrhose im Endstadium auf, zu denen die Hyperbilirubinämie, die Hypalbuminämie, eine Zunahme der Aszitesentwicklung, eine Koagulopathie und das Fortschreiten einer hepatischen Enzephalopathie zählen. Diese Parameter werden bei der Kalkulation des Child-Pugh-Stadiums berücksichtigt und drücken die Erkrankungsschwere aus. Allerdings unterscheiden sich Patienten mit ACLF von Patienten mit einer Leberzirrhose im Endstadium durch eine Reversibilität des Erkrankungsstadiums (Olson and Kamath 2012).

Das SIRS wird häufig von einer Repression der HLA-DR Expression auf Monozyten und einer herabgesetzten *ex vivo* Zytokinproduktion nach LPS-Stimulation begleitet (Cavaillon et al. 2001; Muller Kobold et al. 2000).

Es ist gezeigt worden, dass diese Deaktivierung der Monozyten im Rahmen einer Sepsis mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert ist (Hynninen et al. 2003; Lekkou et al. 2004; Muller Kobold et al. 2000; Oberhoffer et al. 1999). Dies wurde bisher nicht für Patienten mit ACLF beschrieben.

2.2 SEPSIS

Infektionserkrankungen begleiten den Menschen von je her. Das klinische Erscheinungsbild der Sepsis mit Fieber und Schüttelfrost wurde bereits von Ärzten wie Hippokrates 400 v. Chr. beschrieben. Anfang des 20. Jahrhunderts formulierte der deutsche Internist Schottmüller, dass „eine Sepsis dann vorliegt, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitsbeschwerden ausgelöst werden“ und schuf somit die Grundlage unseres heutigen pathophysiologischen Verständnisses der Sepsisentwicklung (Budermann 1969). Thomas beschrieb 1972 den Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Immunantwort und dem septischen Verlauf einer Infektionskrankheit und stellte fest: „It is our response that makes the disease“ (Thomas 1972).

Die Entdeckung der Antibiotika führte in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts zu einem Durchbruch auf dem Gebiet der Infektionskrankheiten. Es breitete sich zunächst der Optimismus aus, Infektionen zukünftig beherrschen und damit zu einer untergeordneten Angelegenheit machen zu können. Hingegen sind wir heute mit dem Problem einer wachsenden Zahl an multiresistenten Keimen, wie z.B. *Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus*, *Vancomycin-resistenten Enterokokken*

und *ESBL-Keimen* konfrontiert und benötigen daher neue antibiotische Therapien. Trotz unseres besseren Verständnisses der Pathophysiologie der Sepsis zeigten gezielte Therapiestrategien bisher nur enttäuschende Ergebnisse.

2.2.1 EPIDEMIOLOGIE DER SEPSIS

Trotz des Einsatzes potenter antimikrobieller Substanzen und eines zunehmenden pathophysiologischen Verständnisses stellt die Sepsis mit einer Inzidenz von 76-110/100.000 Einwohnern und unverändert hohen Morbidität sowie Mortalität nach wie vor ein komplexes medizinisches und gesundheitsökonomisches Problem dar. Nach nationalen Daten aus dem SepNet (www.kompetenznetz-sepsis.de) entwickeln in Deutschland jährlich ca. 58.000 bis 79.000 Menschen eine Sepsis, entsprechend 52.000 bis 75.000 eine schwere Sepsis oder einen septischen Schock. Auf Intensivstationen beträgt die Letalität der schweren Sepsis bzw. des septischen Schocks 40% bzw. 56 % (Engel et al. 2007).

2.2.1 SIRS-DEFINITION UND KLINISCHE KRITERIEN DER SEPSIS

Klinisch unterscheiden wir einen beginnenden septischen Krankheitsverlauf von einer schweren Sepsis mit Organversagen bzw. einem septischen Schock. Von entscheidender prognostischer Bedeutung ist eine rasche Diagnosestellung, damit therapeutische Maßnahmen unmittelbar eingeleitet werden können. Dies stellt aber bei heterogenem Krankheitsbeginn und -verlauf gleichzeitig die größte Herausforderung dar.

Zur Vereinfachung der Diagnosestellung wurde der Begriff SIRS als Systemic Inflammatory Response Syndrom geprägt (Bone et al. 2009). Ein SIRS liegt vor, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien gegeben sind:

- Hypo- oder Hyperthermie ($> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$)
- Tachykardie (Herzfrequenz $> 90/\text{min}$)
- Tachypnoe (Atemfrequenz $> 20/\text{min}$ bzw. $p_{\text{a}}\text{CO}_2 < 32 \text{ mmHg}$)
- Leukozytose ($> 12.000 \text{ Zellen}/\mu\text{l}$) oder Leukozytopenie ($< 4.000 \text{ Zellen}/\mu\text{l}$) oder unreife Neutrophile im Differentialblutbild.

Sind die SIRS-Kriterien auf dem Boden einer Infektion (mit Erregernachweis, z.B. in der Blutkultur) oder dem hochgradigem Verdacht auf eine Infektion erfüllt, liegt nach den Internationalen Konsensuskriterien (Levy et al. 2003) eine Sepsis vor. Entwickelt der Patient zusätzlich ein Organversagen, z.B. ein akutes Nierenversagen, eine Encephalopathie, eine Hypoxie, eine metabolische Azidose oder eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIG), so sprechen wir von einer schweren Sepsis. Ein septischer Schock ist gegeben, wenn eine Stabilisierung des Kreislaufes trotz adäquater Volumensubstitution nur durch Katecholamingabe zu erreichen ist. Laborchemische Parameter wie C-reaktives Protein (CRP) und Procalcitonin (PCT) können die Diagnose stützen (Oberhoffer et al. 1999). Procalcitonin-Konzentrationen $\leq 0,5 \text{ ng/ml}$ machen das Vorliegen einer schweren Sepsis bzw. eines septischen Schocks unwahrscheinlich, Konzentrationen $> 2,0 \text{ ng/ml}$ wahrscheinlich und $> 10,0 \text{ ng/ml}$ hoch wahrscheinlich. Eine Sepsis kann von unterschiedlichen Organen ihren Ausgang nehmen. Die pneumonische Genese stellt mit 65% den größten Anteil dar. Ferner liegen häufig Infektionen aus dem Urogenital- und dem Gastrointestinaltrakt, hier insbesondere postoperativ, zugrunde.

Eine spezielle Entität wird durch die Endokarditis repräsentiert. Als Erreger kommen eine Vielzahl grampositiver und gramnegativer Bakterien, aber auch Pilze und selten Viren in Frage. Patienten aller Altersgruppen können eine Sepsis im Rahmen einer Infektionserkrankung oder auch nach einem Trauma (z.B. Verbrennung) entwickeln. Verschiedene Komorbiditäten der Patienten, z.B. Immunsuppression oder kardiale Vorbelastung, erhöhen die Anfälligkeit für bestimmte Erreger und letztlich schwere klinische Verläufe.

2.2.3 GENETISCHE SEPSISSUSZEPTIBILITÄT

Die Sepsis ist dadurch gekennzeichnet, dass eine Infektion durch die eigene Immunabwehr nicht lokal begrenzt beherrscht werden kann, sondern die Entzündungsreaktion durch eine überschießende Aktivierung des Immunsystems mit Ausschüttung humoraler und zellulärer Mediatoren generalisiert. Liegt eine bakterielle Genese zugrunde, lässt sich regelmäßig eine Bakteriämie durch Asservation von Blutkulturen nachweisen. Im Allgemeinen verlaufen unzählige Infektionen, z.B. unkomplizierte Harnwegsinfektionen, aber auch Pneumonien, häufig nicht septisch. Genetisch epidemiologische Studien lassen vermuten, dass eine unterschiedliche Anfälligkeit für die Entwicklung einer Sepsis und letztlich die heterogenen klinischen Verläufe der Sepsis mit unterschiedlichem Ausgang einem starken genetischen Einfluss unterliegen. Sorensen et al. (Sorensen et al. 1988) untersuchten anhand des dänischen Adoptionsregisters die Todesursache von Adoptierten, welche zwischen 1924 und 1926 geboren wurden. Es fand eine Nachbeobachtung der Adoptivkinder, ihrer biologischen Eltern und ihrer Adoptiveltern bis in das Jahr 1982 statt.

Starb ein biologisches Elternteil vor dem fünfzigsten Lebensjahr an einer Infektion, so lag ein 5,8-fach erhöhtes Risiko für das Kind vor, ebenfalls an einer Infektionserkrankung zu versterben (95% Konfidenzintervall, 2,5-13,7). Ein erhöhtes Risiko konnte auch für Nachkommen, deren biologischen Eltern an einer kardiovaskulären Ursache verstarben, aufgezeigt werden. Im Gegensatz hierzu lag für Kinder von Adoptiveltern, welche aufgrund einer infektiologischen oder kardiovaskulären Ursache verstarben, kein erhöhtes Risiko, an der gleichen Ursache zu versterben, vor.

Das menschliche Genom enthält eine Vielzahl die Immunantwort regulierender Gene mit individuell unterschiedlichen genetischen Mustern (Burgner et al. 2006). Ein Beispiel für einen monogenetischen Selektionsvorteil stellt die Sichelzellanämie in Hinblick auf die Anfälligkeit gegenüber Malaria mit *Plasmodium falciparum* dar. Eine Punktmutation im β -Globin-Gen (*HBB*) führt über einen Aminosäureaustausch (p.Glu6Val) zu einer abnormen Hämoglobinausbildung (HbS-Hämoglobin, $\alpha_2\beta^S_2$) (Steinberg 2009). Heterozygote Anlageträger der Sichelzellanämie weisen in Malaria-Endemiegebieten eine signifikant niedrigere Inzidenz an Infektionen mit *Plasmodium falciparum* im Vergleich zu Nicht-Anlageträgern auf (Allison 1954). Im Rahmen von Kandidaten-Genuntersuchungen konnten eine Reihe von Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) mit Auftreten und Outcome der schweren Sepsis assoziiert werden. Für Träger des TNF2-Allels eines TNF- α -Promotorpolymorphismus (c.-308G>A) wurde erstmalig in einem Sepsiskollektiv von 98 Patienten eine Assoziation mit dem Auftreten eines septischen Schocks ($P = 0,002$) und mit einer im Rahmen dessen erhöhten Mortalität ($P = 0,01$; OR = 3,75) nachgewiesen (Mira et al. 1999).

Kandidatengenuntersuchungen setzen profunde Kenntnisse über die Pathophysiologie der entsprechenden Erkrankung voraus, so dass gezielt Gene bekannter Signalwege in Hinblick auf die genetische Variabilität untersucht werden können. Einen neuen Ansatz stellen genomweite Assoziationsstudien (GWAS) dar, die erst durch technischen Fortschritt und damit verbundenen geringeren Kosten der Gensequenzierung möglich geworden sind. Dabei werden in einer Fall-Kontroll-Untersuchung die Allelfrequenzen mehrerer hunderttausend SNPs entlang des gesamten Genoms im Hinblick auf ein Merkmal analysiert. Um statistisch eine verlässliche Aussagekraft zu erreichen, sind große Studienkollektive und strenge Grenzwerte für das Signifikanzniveau erforderlich. Es lassen sich mit dieser Methode genauere Einblicke in komplexe Erkrankungsgeschehen gewinnen und häufige genetische Varianten mit geringen bis moderaten phänotypischen Effekten ($OR < 1,5$) identifizieren (Krawczyk et al. 2010). Eine genomweite Assoziationsstudie bei 293 australischen Probanden mit einer chronischen Hepatitis C-Virusinfektion vom Genotyp 1 untersuchte das Therapieansprechen einer antiviralen Kombinationstherapie bestehend aus pegyliertem Interferon- α und Ribavirin (Suppiah et al. 2009, Ge et al. 2009). Die Arbeitsgruppe fand eine Assoziation des homozygoten C-Allels des IL28B-Polymorphismus rs12979860 mit einem dauerhaften Therapieansprechen (SVR) ($P = 9,25 \times 10^{-9}$; $OR = 1,98$). Die Ergebnisse ließen sich in Kontrolluntersuchungen reproduzieren. Diese Erkenntnis fand Eingang in den klinischen Alltag und wird in speziellen Situationen zur Therapieevaluation herangezogen.

2.3 INTERLEUKIN-6 (IL-6)

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass der Ablauf der Immunantwort und die Expression immunologischer Schlüsselmediatoren während der Sepsis deutlich durch die genetische Heterogenität regulatorischer Gene beeinflusst werden (Arcaroli et al. 2005; Holmes et al. 2003; Lin and Albertson 2004). In dem komplexen Zusammenspiel der Zytokine wird dem Interleukin 6 (IL-6) als proinflammatorischem Zytokin hinsichtlich der Pathogenese der schweren Sepsis und des septischen Schocks eine entscheidene Rolle zugemessen. IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin mit vielfältigen biologischen Effekten. Es vermag effektiv Makrophagen, B- und T-Lymphozyten zu stimulieren, febrile Temperaturen zu erzeugen und die hepatische Akut-Phase-Reaktion einzuleiten (Borden and Chin 1994). Die Serumkonzentrationen von IL-6 werden vornehmlich auf Transkriptionsebene reguliert.

IL-6 unterliegt einer raschen Clearance aus dem Blut (Castell et al. 1988). Die Expression von IL-6 wird streng durch verschiedene Transkriptionsfaktoren – einen wichtiger Vertreter stellt Nuclear factor- κ B dar – gesteuert (Akira et al. 1992). Durch Fishmann et al. wurde 1998 ein Single nucleotide polymorphism (SNP) in der Promotor-Region des IL-6 Gens durch einen Basenaustausch von G durch C an der Stelle -174 beschrieben. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass das Vorliegen des C-Allels des c.-174G>C-Polymorphismus mit einer verminderten IL-6 Produktion nach Stimulation von transfizierten HeLa-Zellen mit IL-1 oder Lipopolysaccharid (LPS) vergesellschaftet ist. In einer Gruppe gesunder Probanden konnten abhängig vom IL-6-Genotypen unterschiedliche IL-6-Plasmakonzentrationen gefunden werden, welches die funktionelle Relevanz dieses Polymorphismus belegte (Fishman et al. 1998).

Eine Vielzahl klinischer Studien beobachteten erhöhte IL-6-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit einer Sepsis. Die meisten Daten sprechen für eine Assoziation von Plasmakonzentrationen und einer erhöhten Sepsismortalität (Hack et al. 1989; Heesen et al. 2002; Martin et al. 1997; Schluter et al. 2002; Watanabe et al. 2005). Die *ex vivo*-Sekretion von IL-6 als Antwort auf Endotoxin hat einen prädiktiven Wert für die Entwicklung einer schweren Sepsis bei Traumapatienten (Heesen et al. 2002). Zudem wurde eine negative Korrelation zwischen IL-6-Plasmakonzentrationen und der *ex vivo*-IL-6-Antwort auf Endotoxin bei Traumapatienten beobachtet (Majetschak et al. 1997; Riese et al. 2000). In Zusammenschau der Daten konnten signifikante, individuelle Unterschiede der IL-6-Gesamtserumkonzentration und der *ex vivo*-Sekretion von IL-6 aufgezeigt werden.

Es wird angenommen, dass diese Unterschiede zumindest partiell auf genetische Varianten, die die Transkription von IL-6 beeinflussen, zurückgeführt werden können. Dennoch wird die genaue Rolle des IL-6-174-Promoter-Polymorphismus bei Patienten mit schwerer Sepsis kontrovers diskutiert. Während in einer 2006 veröffentlichten Studie keine Assoziation zwischen diesem Polymorphismus und Inzidenz sowie Mortalität von Sepsispatienten gefunden werden konnte (Sipahi et al. 2006), wurden der IL-6-Promotor-Genotyp und Haplotypen in einer weiteren Studie als prädiktiver Faktor für die Entwicklung einer Sepsis bei Kindern (Ahrens et al. 2004) und Erwachsenen (Sutherland et al. 2005) identifiziert.

2.4 ZIELE DER ARBEIT

Um die Rolle von IL-6 und seines Promoterpolymorphismus zu untersuchen, führten wir eine prospektive klinische Studie durch, in die Patienten mit Sepsis und septischem Schock auf einer internistischen Intensivstation eingeschlossen wurden. Ziel war es, den Einfluss des IL-6 c.-174G>C-Polymorphismus auf die *ex vivo*-Sekretion von IL-6 zu bestimmen und klinische Korrelationen aufzudecken. Desweiteren verglichen wir Serum-Zytokinspiegel, die *ex vivo*-Produktion von TNF- α und die HLA-DR-Expression auf Monozyten zwischen Patienten mit ACLF, schwerer Sepsis und nicht-dekompensierter Leberzirrhose, um Gemeinsamkeiten zwischen dem Krankheitsbild der Sepsis und ACLF herauszuarbeiten und von der stabilen Leberzirrhose abzugrenzen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 PATIENTENKOLLEKTIVE

In die Studie wurden einerseits Probanden mit ACLF ($n=27$) und schwerer Sepsis ($n=31$) bei Aufnahme auf die medizinische Intensivstation, andererseits Patienten mit stabiler, nicht dekompensierter Leberzirrhose ($n=24$) aus der Poliklinik oder von peripheren Stationen des Universitätsklinikums Aachen eingeschlossen. In das Kontrollkollektiv wurden 100 gesunde, dem Labor-, Ärzte- und Pflegepersonal angehörige Probanden (medianes Alter 40 Jahre, Intervall von 22 - 71 Jahre, 51 Frauen), die keine Anzeichen für eine Erkrankung oder Infektion zeigten, aufgenommen.

ACLF-Patienten mussten folgende Kriterien erfüllen:

- (1) Leberzirrhose entweder basierend auf einer histopathologischen Diagnostik oder auf einem sonographischem Befund mit vereinbaren Laborparametern,
- (2) Komplikationen wie Ikterus, Aszites, hämodynamische Instabilität und/oder Enzephalopathie Grad III-IV, vereinbar mit der Definition der hepatischen Dekompensation und konsekutiv erforderlicher intensivmedizinischer Betreuung,
- (3) Ausschluss eines hepatozellulären Karzinomes (HCC) und hepatischer Metastasierung, die Einfluss auf die Leberfunktion haben könnten, und
- (4) Ausschluss einer immunsuppressiven Therapie in den letzten 3 Monaten vor Studieneintritt.

Keinem der Patienten wurden in den letzten 5 Tagen vor Studienbeginn Blutprodukte verabreicht.

Der mediane Child-Pugh-Score (Child and Turcotte 1964; Pugh et al. 1973) in dieser Patientengruppe betrug vor Dekompensation sieben Punkte (Variationsbreite 5 - 9 Punkte).

Im Studienprotokoll wurden zwei Vergleichsgruppen definiert:

(1) Gruppe 1 schloss Patienten mit stabiler, nicht dekompensierter Leberzirrhose ein. Die Diagnose stützte sich auf folgende Kriterien: (a) Leberzirrhose entweder basierend auf einer histopathologischen Diagnostik oder auf einem sonographischem Befund mit vereinbaren Laborparametern, (b) keine klinischen Zeichen einer akuten hepatischen Dekompensation wie oben beschrieben, (c) keine immunsuppressive Therapie für die Zeit während der Studie und (d) Ausschluss eines HCC.

(2) Gruppe 2 (Kontrollgruppe) bestand aus Patienten mit schwerer Sepsis oder septischen Schock definiert nach den Internationalen Konsensuskriterien (Levy et al. 2003). Septische Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, wenn sie folgende Kriterien erfüllten: (a) Beginn einer Sepsis mit mindestens zwei Organversagen oder septischen Schock und Verdacht auf einen bzw. Nachweis eines infektiösen Herdes, (b) Ausschluss eines Tumorleidens oder einer hämatologischen Grunderkrankung, und (c) Ausschluss einer immunsuppressiven Therapie vor Beginn der Sepsis.

Zur Bestimmung von biochemischen und immunologischen Parametern wurden den Patienten unmittelbar nach Aufnahme auf die Intensivstation oder bei Vorstellung in der Poliklinik bzw. auf den peripheren Stationen Blutproben entnommen.

Für alle Probanden wurde der „Simplified acute physiology score II“ (SAPS II) berechnet und zur Validierung hinsichtlich Prognose des Patienten herangezogen (Le Gall et al. 1993).

Weiter wurden 112 Patienten mit schwerer Sepsis oder mit septischem Schock bei Aufnahme auf die internistische Intensivstation in die prospektive klinische Studie aufgenommen. Alle eingeschlossenen Patienten erfüllten die oben angegebenen Kriterien (Levy et al. 2003). Ausgeschlossen wurden Patienten mit hämatologischen und autoimmunen Grunderkrankungen oder einer immunsuppressiven Therapie. Diese Kriterien führten zu einem Ausschluss von annähernd 25% aller untersuchten Patienten. Bei Aufnahme auf die Intensivstation wurden vor Initiierung einer Therapie Blutproben zur Bestimmung der IL-6-Plasmakonzentrationen und der *ex vivo*-Sekretion von IL-6 sowie zur genetischen Untersuchung entnommen. Für alle Patienten wurde der SAPS II-Score innerhalb der ersten 24 Stunden nach Ankunft auf der Intensivstation berechnet (Le Gall et al. 1993).

Das Studienprotokoll wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

3.2 SERUMSPIEGEL DER ZYTOKINE IL-6 UND IL-10

Die Serumspiegel von Interleukin (IL-) 6 und IL-10 wurden mit einem vollautomatischen System in Chemilumineszenz-Assaytechnologie bestimmt (Immulite™, DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim). Der Eichungsbereich wurde wie folgt definiert: IL-6 5-1000 pg/ml und IL-10 2-1000 pg/ml. Eine interne Qualitätskontrolle wurde täglich durchgeführt; dabei ergaben sich Variationskoeffizienten von 6,7 % für 428 pg/ml IL-6 und 5,6 % für 28,2 pg/ml IL-10.

3.3 EX VIVO PRODUKTION VON TNF- α UND IL-6

Nach Stimulation mit aus *Salmonella abortus equi* gewonnenem Lipopolysaccharid (LPS) im Vollblut-Assay (Milenia Biotec GmbH, Bad Nauheim, Deutschland) erfolgte die Analyse der *ex vivo* Produktion von TNF- α und IL-6. Zur Herstellung der Stammlösung mit einer Konzentration von 500 ng LPS/ml wurde lyophilisiertes LPS unter Zugabe von Glutamin in pyrogenfreie Lösung (RPMI 1640) gebracht. Das mit Ammonium heparinisierte Vollblut wurde zu jeweils 500 μ l Stammlösung in pyrogenfreie Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Es folgte eine vierstündige Inkubation bei 37°C. Nach anschließender Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 g wurden der TNF- α Gehalt und die IL-6-Konzentrationen in den Überständen mittels Chemilumineszenz-Assays (Immulite™) wie oben beschrieben bestimmt.

3.4 HLA-DR-EXPRESSION AUF MONOZYTEN

Zur Bestimmung der quantitativen HLA-DR-Expression auf Monozyten (als Ausdruck der Antikörper-Bindungs-Kapazität, ABC) wurde ein zytometrischer Flow Assay (BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) verwendet. Zu 50 µl EDTA-Vollblut wurden 20 µl Antikörperlösung (QuantiBRITE™ anti-HLA-DR-PE/antimonocyte PerCP-Cy5.5) hinzugegeben. Nach vorsichtigem Vermengen folgte die Inkubation der Lösung für 25 Minuten bei Raumtemperatur. Die Antikörper binden spezifisch an die auf humanen Monozyten exprimierten Oberflächenproteine CD14 und CD64 (Cluster of differentiation). Durch Hinzugabe von 450 µl FACS™ Lysing solution wurden die Erythrozyten lysiert. Die Probenmessung erfolgte mittels Fluorescence activated cell sorter (FACS). Dazu wurden das Gerät FACS™ Calibur und die Software CellQuest™ (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet. Das Gerät wurde entsprechend der Herstellerempfehlung täglich unter Anwendung der QuantiBRI-TE™ PE Beads (Perlen) kalibriert. QuantiBRI-TE™ PE beads sind lyophilisierte Perlen, die vier Kügelchen-Populationen mit unterschiedlich definierten Anteilen von Phytoerythrin-Molekülen (1.700, 14.000, 39.000 und 133.000 Moleküle/Kügelchen) enthalten. Die Fluoreszenz-Messung liefert Kalibrationskurven, mit denen man anschließend die Anzahl der Antigenmoleküle pro Zelle als Maß für die Antikörper-Bindungs-Kapazität für die individuellen Proben ermitteln kann. Da es keine international standardisierte Technik zur Messung der HLA-DR-Expression auf Monozyten gibt, musste zunächst ein Normbereich für diese Analyse etabliert werden. Dazu wurde die Messung bei 100 freiwilligen Probanden durchgeführt. In diesem Kollektiv ergab sich eine mediane HLA-DR-Expression von 24.990 ABC/Zelle (Variationsbreite 12.710-44.543 ABC/Zelle).

3.5 GENOTYPISIERUNG DES IL-6 c.-174G>C-POLYMORPHISMUS

3.5.1 DNA-ISOLIERUNG

Die genomische DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut erfolgte mittels QIAamp® DNA Blood Mini Kit. Das Prinzip der Isolierung beruht auf vier Schritten, der Lyse, dem Anheften der DNA an der Membran, der Waschprozedur und dem Elution der gereinigten DNA. Dazu werden 200 µl EDTA-Vollblut in das bereits mit 20 µl Proteinase K versetzte Eppendorfröhrchen pipettiert, anschließend 200 µl AL-Puffer (Lysepuffer) hinzugegeben und gut durchmischt. Nach 10minütiger Inkubation bei 56°C, dem Lyseschritt, werden der Lösung 200 µl reines Ethanol zugefügt, nochmals gründlich durchmischt und die Lösung auf die QIAamp Spin Column pipettiert. Salzgehalt und pH-Wert der Pufferlösung sind so gewählt, dass DNA optimal an der Kieselgelmembran anhaftet, jedoch Protein und andere zu eluierende Substanzen beim Zentrifugieren herausgewaschen werden. Es wird 1 Minute lang bei 8.000 U/min zentrifugiert. Das Zentrifugat wird verworfen, und die Spin-Column wird mit einem neuen Auffanggefäß versehen.

Zur zweistufigen Reinigung werden zunächst 500 µl des Waschpuffers AW1 in die Spin-Column gegeben und bei 8.000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Das Zentrifugat wird erneut verworfen. Waschschrift 2 erfolgt analog zum Ersten, jedoch mit AW2-Puffer und 3minütiger Zentrifugierung bei 13.000 U/min. Die in der Silikalgelmembran gebundene DNA ist nach diesem Schritt vollends von Protein und anderen Verunreinigungen gereinigt und kann nun herausgewaschen werden. Dazu werden 200 µl Elutionpuffer in die Spin-Column gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei anschließender Zentrifugation (8.000 U/min, 1 Minute) wird die im Elutionspuffer gelöste DNA in ein Reaktionsgefäß eluiert. Nach Herstellerangaben beträgt die Ausbeute 4-12 µg DNA, ungefähr einer Konzentration von 30 ng/µl entsprechend. Die DNA wurde bei –20°C gelagert.

3.5.2 QUANTIFIZIERUNG DES DNA-GEHALTS

Die Quantifizierung des DNA-Gehalts erfolgte mit einem Fluorometer (*Biorad*) unter Verwendung des Farbstoffes PicoGreen, einem Fluorochrom, das an doppelsträngige DNA bindet und seine Extinktions- und Emissionseigenschaften abhängig vom DNA-Gehalt ändert. Es wurde eine Lösung, bestehend aus 1000 µl TE-Puffer und 2 µl DNA des Bakteriophagen λ (2 ng/l, Molecular Probes) bzw. 2 µl der zu messenden DNA, hergestellt. Mit Hilfe eines Leerwerts und einer Standardprobe wurde das Fluorometer geeicht. Der DNA-Gehalt der zu untersuchenden Proben wurde durch den Fluoreszenzunterschied zwischen Probe und Standardprobe mittels UV-Licht mit einer Wellenlänge von 360 nm ermittelt.

3.5.3 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Im Jahre 1986 stellten Mullis et al. (Mullis et al. 1986) ihre neu entwickelte Methode zur enzymatischen in-vitro-Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte vor, die sogenannte Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Mit Hilfe dieser war es nicht nur gelungen, Kopien spezifischer Abschnitte der DNA anzulegen, sondern erstmals diese auch in exponentieller Höhe zu vervielfältigen. Das Prinzip beruht auf der Elongation von komplementären Oligonukleotiden (Primern) mittels der Taq-Polymerase, einem hitzestabilen Enzym. Die Primer haben die Aufgabe, den zu amplifizierenden Bereich zu flankieren und der Taq-Polymerase als Initiationsimpuls zu dienen. Die Polymerase kann nun analog zur Matrize mit der Synthese des neuen Strangs beginnen, wobei sie sich immer nur in Richtung von 5' nach 3' durch Anheften von Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTP) vorarbeitet. Der PCR-Zyklus vollzieht sich in drei Schritten:

1. Denaturierung: Durch Erhitzen der Reaktionslösung auf 95°C, bestehend aus DNA, den Primern, der Polymerase und den dNTP, trennen sich die beiden komplementären Stränge.
2. Hybridisierung (Annealing): Durch Absenken der Temperatur auf 50-60°C können sich die Primer an die Einzelstränge anlagern.
3. Extension: Bei 72°C katalysiert die hitzestabile Taq-Polymerase den Anbau einzelner dNTP an die entstehenden DNA-Stränge so, dass zum Ende der Reaktion die doppelte Anzahl an Doppelsträngen vorliegt.

Durch Wiederholung dieser drei Teilschritte kommt es zur exponentiellen Zunahme der amplifizierten DNA-Kopien. Den Zyklen wird eine Denaturierungsphase vorangestellt, damit die gesamte DNA in einzelsträngiger Form vorliegt. Die Extensionszeit des letzten Zyklus wird zur Vervollständigung aller PCR-Produkte verlängert.

3.5.4 5' Nuklease-Assay

Die Alleldiskriminierung des IL-6 c.-174G>C-SNP wurde mit dem 5' Nuklease-Assay durchgeführt (Heid et al. 1996). Zusätzlich zu den Primern enthält dieser Assay jeweils zwei Sonden (TaqMan MGB probes). Diese tragen an ihrem 5'-Ende einen Reporter, VIC für Allel 1 und FAM für Allel 2 und an ihrem 3'-Ende einen Quencher (NFQ, nonfluorescent quencher). Ist die Sonde intakt, wird die Fluoreszenz von VIC und FAM durch den Quencher unterdrückt. Während der PCR lagern sich die Sonden spezifisch ihrer komplementären Sequenz zwischen die Primer an. Dabei werden sie von der DNA-Polymerase gespalten, und die Reporter VIC oder FAM fluoreszieren (Abb. 1). Im Falle eines Mismatches – die Sonde kann nicht mit ihrem Ziel hybridisieren – kommt es nicht zur Spaltung der Sonde und damit auch nicht zur Fluoreszenzfreisetzung.

3.5.5 DESIGN DER PRIMER FÜR DEN IL-6 c.-174G>C-POLYMORPHISMUS

Für das Design der Primer und Sonden des IL-6-SNP an der Stelle c.-174 verwendeten wir die Software Primer Express[®] (Version 1.5, Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA).

In Tabelle 1 sind die Nukleotidsequenzen der Primer und Sonden aufgeführt, der entsprechende SNP durch Unterstrich gekennzeichnet.

IL-6 c.-174G>C

Forward primer	5' – CTAGCCTCAATGACGACCTAAGC – 3'
Reverse primer	5' – GGGCTGATTGGAAACCTTATTAAG – 3'
Sonde VIC	5' – TGTCTTGCC <u>G</u> ATGCTA – 3'
Sonde FAM	5' – TGTCTTGCC <u>C</u> ATGCTA – 3'

Tabelle 1.

Zur PCR-Reaktion des 5' Nuklease-Assays wurde folgendes Pipettierschema angewendet:

Invitrogen Platinum qPCR Supermix UDG	12,50 µl
ROX	0,50 µl
VIC	0,50 µl
FAM	0,50 µl
Primer F	2,25 µl
Primer R	2,25 µl
DNA (1-20ng)	6,50 µl
Gesamt	25,00 µl

Tabelle 2.

Mit dem ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Fa. Applied Biosystems) führten wir sowohl die PCR-Reaktion als auch die anschließende Fluoreszenzmessung der Sonden VIC und FAM durch.

Die PCR-Reaktion lief unter Standardbedingungen ab. Dem ersten Denaturierungsschritt von zehnminütiger Dauer bei 95°C folgten vierzig Zyklen mit jeweils fünfzehnsekündigen Denaturierungsphasen bei 95°C und einminütigen Anlagerungs- und Verlängerungsphasen bei 60°C. Die Extensionszeit des letzten Zyklus wurde verlängert. Die Sonde VIC repräsentierte den Wildtyp, FAM zeigte die Mutation an (Tabelle 3).

Signifikanter Fluoreszenzanstieg	Ergebnis des Probanden
VIC	Homozygot für IL-6 c.-174G (Wildtyp)
FAM	Homozygot für IL-6 c.-174C (Mutation)
Beider Signale	Heterozygot

Tabelle 3.

3.6 KLINISCH-CHEMISCHE STANDARDPARAMETER

Erfüllten Patienten die Einschlusskriterien bei Aufnahme auf die Intensivstation, wurde die Erhebung folgender Laborparameter veranlasst:

1. Blutbild
2. Kalium im Serum
3. Natrium im Serum
4. Gesamtbilirubin im Serum
5. Kreatinin im Serum
6. Harnstoff im Serum
7. Lactatdehydrogenase (LDH)
8. C-reaktives Protein (CRP)
9. Procalcitonin (PCT)
10. Nüchternglucose
11. C-Peptid im Serum
12. Cortisol im Serum
13. Bicarbonat im Serum

Die Analyse erfolgte im Institut für Klinische Chemie und Pathophysiologie des Universitätsklinikums Aachen.

3.7 MEDIZINISCHE SCORING SYSTEME

3.7.1 SAPS II-SCORE

Der von Le Gall et al. 1993 entwickelte „Simplified Acute Physiology Score“ (SAPS II) dient der Einschätzung der Krankheitsschwere und des Letalitätsrisikos eines Patienten bei Aufnahme auf eine Intensivstation (Le Gall et al. 1993). In die Kalkulation werden die folgenden, innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme des Patienten und jeweils vom Normbereich am stärksten abweichenden, Parameter einbezogen:

1. Alter
2. Herzfrequenz
3. Systolischer Blutdruck
4. Körpertemperatur
5. PaO₂/FiO₂-Ratio (bei Beatmung)
6. Urinvolumen pro Tag
7. Serumharnstoff
8. Leukozytenwert im Blut
9. Serumkalium
10. Serumnatrium
11. Serumbicarbonat
12. Serumbilirubin
13. Definierte chronische Erkrankung (z.B. AIDS)
14. Elektive vs. notfallmäßige Aufnahme
15. Glasgow-Coma-Scale.

3.7.2 TISS 28-SCORE

1996 präsentierte Reis Miranda (Miranda et al. 1996) die vereinfachte Version des von Cullen (Cullen et al. 1974) 1974 entwickelten „Therapeutic Intervention Scoring System“ (TISS), den TISS 28. Dieser beschreibt ausschließlich das Ausmaß therapeutischer, diagnostischer und pflegerischer Maßnahmen. Der Score ist leicht zu erheben und hilft, neben der Kostenevaluation, auch den Zustand des Patienten besser einzuschätzen.

3.7.3 CHILD-PUGH-SCORE

Der Child-Pugh-Score klassifiziert das Ausmaß der Leberfunktionseinschränkung und errechnet sich wie folgt (Child and Turcotte 1964; Pugh et al. 1973).

Punkte	1	2	3
Serumalbumin [g/l]	>35	28-35	<28
Bilirubin [mg/dl] bei cholestat. Erkrankungen	≥ 2	2,1 – 2,9	> 3,0
Quick [%]	≥ 4	4,1 – 9,7	> 9,7
Aszites	> 60	40 – 60	< 40
Hepatische Enzephalopathie	nicht oder wenig	kontrolliert	refraktär
	Keine	Grad I-II	Grad III-IV

Tabelle 4.

1. Child A – Stadium	5 - 6	Punkte
2. Child B – Stadium	7 - 9	Punkte
3. Child C – Stadium	10 - 15	Punkte

3.7.4. MELD-SCORE (MODEL OF END STAGE LIVER DISEASE)

Der MELD-Score ist als Algorithmus zur Abschätzung der Mortalität von Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose an der Mayo Clinic entwickelt worden und errechnet sich nach der Formel $3,8 \times \log_e(\text{Bilirubin [mg/dl]}) + 11,2 \times \log_e(\text{INR}) + 9,6 \times \log_e(\text{Kreatinin [mg/dl]}) + 6,4 \times (0 \text{ bei cholestatischer oder alkoholischer Lebererkrankung, } 1 \text{ bei anderer Genese})$ (Kamath et al. 2001). Er dient als Instrument zur Organallokation im Rahmen der Lebertransplantation. Zur Berechnung stehen verschiedene Online-Kalkulatoren zur Verfügung (bspw. <http://www.mayoclinic.org/meld/mayomodel5.html>).

3.8 STATISTISCHE METHODEN

Die Daten werden als Median und Variationsbreite angegeben. Kontinuierliche Variablen zwischen Patienten mit und ohne septischen Schock wurden mit dem Student's t-Test verglichen. Bei ungleichen Varianzen wurde eine Welsh-Korrektur durchgeführt. Kontinuierliche Variablen wurden ansonsten durch Varianzanalyse (ANOVA) verglichen und im Anschluss daran wurde der Newman-Keuls-Test durchgeführt. Variablen in Kontingenztafeln wurden mit dem exakten Test nach Fisher analysiert. Die multivariate Varianzanalyse mit zellulären Immunparametern als abhängige Variablen erfolgte unter Anwendung der logistischen Regression. Ein zweiseitiger p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad 3.0 (San Diego, USA) und SPSS 11.5 (Chicago, USA).

3.9 GERÄTE UND REAGENZIEN

3.9.1 Allgemeine Laborinstrumente

Pipetten 2,5 µl, 10 µl, 100 µl und 1.000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf
H ₂ O LiChrosolv	Merck
Zentrifuge	Eppendorf
Vortexer	Heidolph
Thermomixer compact	Eppendorf

2.9.2 DNA-Isolierung und -Quantifizierung

QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
Ethanol absolut	Merck
Pico Green dsDNA quantification reagent	Molecular Probes
TE-Puffer 10 nM (Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,5)	Molecular Probes
Lambda-DNA	Molecular Probes
Fluorometer	Biorad

3.9.3 PCR

Primer	MWG Biotech
PCR-Nukleotid-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	
2,5 mM je dNTP; pH 8,3	Peglab
10x PCR-Puffer ohne Magnesiumchlorid	Invitrogen
Magnesiumchlorid (50 mM)	Invitrogen
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	Invitrogen
PCR-Thermocycler	Biometra

3.9.4 5' Nuklease-Assay

Platinum qPCR SuperMix UDG	Invitrogen
ROX Reference Dye	Invitrogen
Primer	MWG Biotech
MGB-Sonden	Applera
MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate	Applera
MicroAmp Optical Adhesive Covers	Applera
ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applera

4 ERGEBNISSE

4.1 DEMOGRAPHISCHE UND KLINISCHE CHARAKTERISTIKA DER STUDIENPOPULATION

4.1.1 ACLF

Während der Studiendauer erfüllten 27 Patienten die nach dem Studienprotokoll definierten Kriterien für ACLF. Tabelle 5 fasst die klinischen und biochemischen Charakteristika der Patienten sowie die Genese der Leberzirrhose zusammen.

Klinische und laborchemische Parameter der Studienpatienten

	Stabile Leberzirrhose (n=24)	ACLF (n=27)	Schwere Sepsis (n=31)
Alter [Jahre]	63 (27-85)	57 (37-82)	66 (18-97)
Männliches Geschlecht [n (%)]	12 (50,0)	14 (51,8)	21 (65,6)
Ätiologie der Zirrhose			
Viral [n (%)]	6 (25,0)	9 (33,3)	
Äthyltoxisch [n (%)]	13 (54,2)	14 (33,3)	
PBC/PSC [n (%)]	3 (12,5)	2 (7,4)	
Kryptogen [n (%)]	2 (8,3)	2 (7,1)	
Aszites [n (%)]	2 (8,3)	14 (51,8) ^a	
Enzephalopathie Grad III/IV [n (%)]	0 (0,0)	16 (59,3) ^a	
Albumin [g/l]	39 (28-45)	27 (12-46) ^a	29 (18-44) ^a
Gesamtbilirubin [mg/dl]	0,9 (0,4-4,0)	7,7 (0,9-64,0) ^a	0,8 (0,4-2,7)
Prothrombinzeit (Quick) [%]	83 (30-99)	46 (21-100) ^{a,b}	70 (42-100)
Procalcitonin (PCT) [µl/l]	0,3 (0-1,2)	0,9 (0,1-64,8) ^b	9,5 (0-417,0) ^a
CRP [mg/dl]	7 (0-21)	33 (0-230) ^a	179 (10-230) ^a
SAPS II Score [Punkte]	20 (6-32)	36 (13-69) ^a	36 (10-61) ^a
Mortalität [n (%)]	0 (0,0)	8 (29,6) ^a	10 (31,3) ^a

Tabelle 5. ^a $P < 0,05$ versus stabile Zirrhose; ^b $P < 0,05$ versus schwere Sepsis

Bei 23 von 27 Patienten konnte die Dekompensation der Leberzirrhose auf eine gastrointestinale Blutung bzw. Lokalinfection zurückgeführt werden. Eine genauere Darstellung über die Ätiologie der Dekompensation bietet Tabelle 6.

Klinische Ursachen für die Dekompensation der Leberzirrhose

	Anzahl der Patienten	Bakterienisolate
Ösophagusvarizenblutung ^a	3	Keine
Blutung aus gastralen Varizen ^a	5	Keine
Extraintestinale Blutung	2	Keine
Pneumonie ^b	5	<i>Haemophilus influenzae</i> (n=2); <i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=2); negative Kulturen (n=1)
Erysipel ^b	2	Keine, positive Antistreptolysintiter
Spontan bakterielle Peritonitis ^b	6	<i>E. coli</i> (n=2); <i>Enterococcus</i> (n=1); negative Kulturen (n=3)
Unbekannt	4	Keine

Tabelle 6. ^aPatienten mit Blutungskomplikationen und Aszites erhielten eine prophylaktische antibiotische Therapie mit einem Drittgeneration-Cephalosporin (Ceftriaxon); ^bBlutkulturen blieben in allen Fällen ohne Wachstum

Bei 10 Patienten führte eine akute Varizenblutung zu einem ACLF, welche in drei Fällen im Ösophagus und in fünf Fällen im Magen ihren Ursprung hatte. Bei zwei Patienten trat eine extraintestinale Blutung auf. Bei fünf Patienten konnte eine Pneumonie als Ursache der akuten Dekompensation nachgewiesen werden. Es konnten bei jeweils zwei Patienten *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae* aus dem Trachealsekret kultiviert werden. Eine spontan bakterielle Peritonitis war in sechs Fällen verantwortlich für das ACLF. Aus der Aszitesflüssigkeit konnten bei zwei Patienten *Escherichia coli* und bei einem Patienten *Enterococcus faecalis* angezüchtet werden. Ferner waren zwei Patienten an einem Erysipel mit Nachweis eines erhöhten Antistreptolysintiters erkrankt. In vier Fällen blieb die Genese der dekompenzierten Leberzirrhose unklar.

Bedeutsam ist, dass zum Zeitpunkt der Blutprobenabnahmen, welche für die Erhebung der immunologischen Parameter verwendet wurden, keiner der in das ACLF-Kollektiv eingeschlossenen Patienten klinische oder laborchemische Hinweise für das Vorliegen einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks zeigte.

Es wurden zwei Gruppen von Patienten zum Vergleich der immunologischen Parameter mit den ACLF-Patienten gebildet. In die erste Gruppe wurden 24 Patienten mit einem stabilen Verlauf der Leberzirrhose eingeschlossen. Diese Patienten wiesen keine klinischen oder laborchemischen Zeichen für eine hepatische Dekompensation auf. Die zweite Vergleichsgruppe umfasste 31 Personen, welche im Rahmen einer schweren Sepsis bzw. eines septischen Schockes auf eine Intensivstation aufgenommen werden mussten. Septische Patienten wurden als Vergleichsgruppe ausgewählt, da für sie bereits in vorausgehenden Studien deutliche Veränderungen der Serumzytokinkonzentrationen und der zellulären Immunparameter als Marker für die Immunaktivierung im Vergleich zu gesunden Patienten nachgewiesen werden konnten (Lekkou et al. 2004; Cavaillon et al. 2001; Oberhoffer et al. 1999).

Der SAPS II-Score als Maß für die Krankheitsschwere lag bei Patienten mit ACLF und schwerer Sepsis in vergleichbarer Höhe, während Patienten mit stabiler Leberzirrhose signifikant ($P < 0,001$) niedrigere Werte aufwiesen. Es fällt auf, dass keiner der Patienten mit schwerer Sepsis ein Leberversagen entwickelt hat und dass das Gesamtbilirubin im Sepsiskollektiv im Vergleich zu den Patienten mit kompensierter Leberzirrhose nicht signifikant erhöht war ($P > 0,05$, Tabelle 1). Die Mortalität unterschied sich zwischen ACLF- (30%) und Sepsis-Patienten (32%) nicht, während im Laufe der Studienzeit kein Patient mit stabiler Leberzirrhose verstarb ($P < 0,001$ für beide Vergleiche).

4.1.1 SEPSIS

In Tabelle 7 werden die demographischen und die klinischen Daten der Sepsispopulation dargestellt. Von den insgesamt 112 in die Studie eingeschlossenen Sepsispatienten erfüllten 85 Kandidaten (76%) die Kriterien für einen septischen Schock (Levy et al. 2003). Zwischen Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock wurden hinsichtlich der Alters- und Geschlechtsverteilung keine signifikanten Unterschiede beobachtet. In beiden Gruppen lag der Sepsis am häufigsten eine Pneumonie zugrunde. Die Krankheitsschwere, welche mit Hilfe des SAPS II-Scores objektiviert wurde, und die Häufigkeit eines akuten Nierenversagens waren in der Gruppe der Patienten mit einem septischen Schock signifikant erhöht ($P < 0,01$). Das Überleben auf der Intensivstation lag für Patienten mit septischem Schock (38,8 %) im Vergleich zu der Patientengruppe ohne septischen Schock (77,8 %) signifikant niedriger ($P < 0,001$; OR = 0,18).

Demographische und klinische Parameter der Studienpatienten

Variablen	Sepsispatienten mit septischem Schock (n = 85)	Sepsispatienten ohne septischen Schock (n = 27)	P-Wert
Alter [Jahre]	62 (21-80)	60 (21-91)	NS
Männliches Geschlecht	57 (67,1 %)	17 (63 %)	NS
Sepsisfokus			
Pneumonie	55 (64,7 %)	18 (66,7 %)	NS
Akute Pankreatitis	12 (14,1 %)	3 (11,1 %)	NS
Andere	18 (21,2 %)	6 (22,2 %)	NS
Akutes Nierenversagen	43 (50,6%)	5 (18,5 %)	$P = 0,004$
Überlebende	33 (38,8 %)	21 (77,8 %)	$P < 0,001$
SAPS II	50 (22-84)	33 (20-56)	$P < 0,01$

Tabelle 7. NS, nicht signifikant.

4.2 UNSPEZIFISCHE ENTZÜNDUNGSPARAMETER SIND BEI PATIENTEN MIT SCHWERER SEPSIS IM VERGLEICH ZU PATIENTEN MIT STABILER LEBERZIRRHOSE UND ACLF ERHÖHT

Das Hauptziel dieser Studie bestand in dem Vergleich immunologischer Parameter zwischen den drei unterschiedlichen Patientengruppen. Bei allen Patienten wurden zu Beginn CRP und PCT als etablierte Marker für lokale und systemische Entzündungen (Povoa 2002; Pugin 2002) im Serum bestimmt, um unsere Ergebnisse hinsichtlich einer bei Aufnahme auf die Intensivstation klinisch nicht auffälligen zugrundeliegenden infektiösen Komplikation zu untersuchen. Tabelle 1 zeigt deutlich erhöhte Werte für CRP und PCT in der Sepsisgruppe verglichen mit Patienten der ACLF-Gruppe ($P < 0,05$ für CRP, $P < 0,001$ für PCT). Obgleich sich ein Trend zu höheren Werten beider Entzündungsmarker bei Patienten mit ACLF im Vergleich zu denen mit kompensierter Leberzirrhose abzeichnete, erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz.

4.3 PATIENTEN MIT ACLF, SCHWERER SEPSIS UND STABILER LEBERZIRRHOSE UNTERSCHIEDEN SICH HINSICHTLICH DER PRO- UND ANTIINFLAMMATORISCHEN ZYTOKINSPIEGEL

Ein ähnliches Muster wie bei den unspezifischen Entzündungsparametern zeigten die Studiengruppen hinsichtlich der pro- und antiinflammatorischen Serumzytokinespiegel. In Abbildung 1 wird deutlich, dass das Sepsiskollektiv signifikant höhere Serumkonzentrationen von IL-6 (oberes Diagramm) und IL-10 (unteres Diagramm) im Vergleich zur ACLF-Gruppe ($P < 0,01$ für beide Zytokine) oder zur Gruppe mit kompensierter Zirrhose ($P < 0,001$ für beide Zytokine) aufwies.

Im Gegensatz zum CRP und PCT lagen die medianen Werte für IL-6 und IL-10 bei Patienten mit ACLF im Vergleich zu den Patienten mit stabiler Leberzirrhose signifikant höher ($P < 0,05$ für beide Zytokine, Abbildung 1).

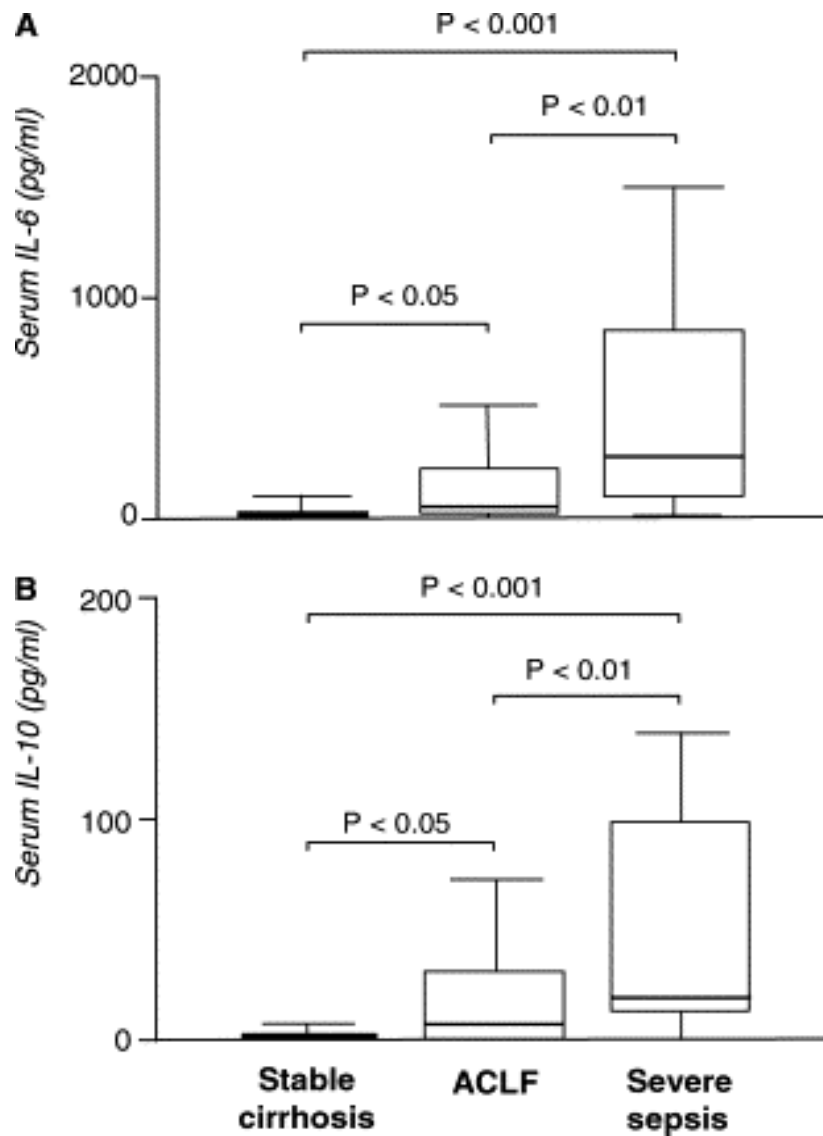


Abbildung 1

IL-6-Serumkonzentrationen (A) und IL-10-Serumkonzentrationen (B) im Vergleich zwischen Patienten mit stabiler Zirrhose, ACLF und schwerer Sepsis. Die Boxen markieren das untere Quartil, den Median und das obere Quartil; die Whisker zeigen die 10. bzw. 90. Perzentile an. Die Konzentrationen der pro- und antiinflammatorischen Zytokine unterscheiden sich signifikant in den unterschiedlichen Patientengruppen.

4.4 DIE ZELLULÄRE IMMUNFUNKTION IST BEI PATIENTEN MIT ACLF UND SCHWERER SEPSIS GLEICHARTIG GESTÖRT

Das obere Boxplotdiagramm in Abbildung 2 zeigt im Gegensatz zu den Serumzytokinspiegeln eine verminderte *ex vivo*-Sekretion von TNF- α nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) bei Patienten mit ACLF und schwerer Sepsis verglichen mit dem Kollektiv der kompensierten Leberzirrhose (für beide $P < 0,001$). Auch nach Anwendung einer multivariaten Regressionsanalyse mit Einschluss von CRP, PCT und den Serumzytokinkonzentrationen ließen sich die Ergebnisse reproduzieren (Tabelle 8).

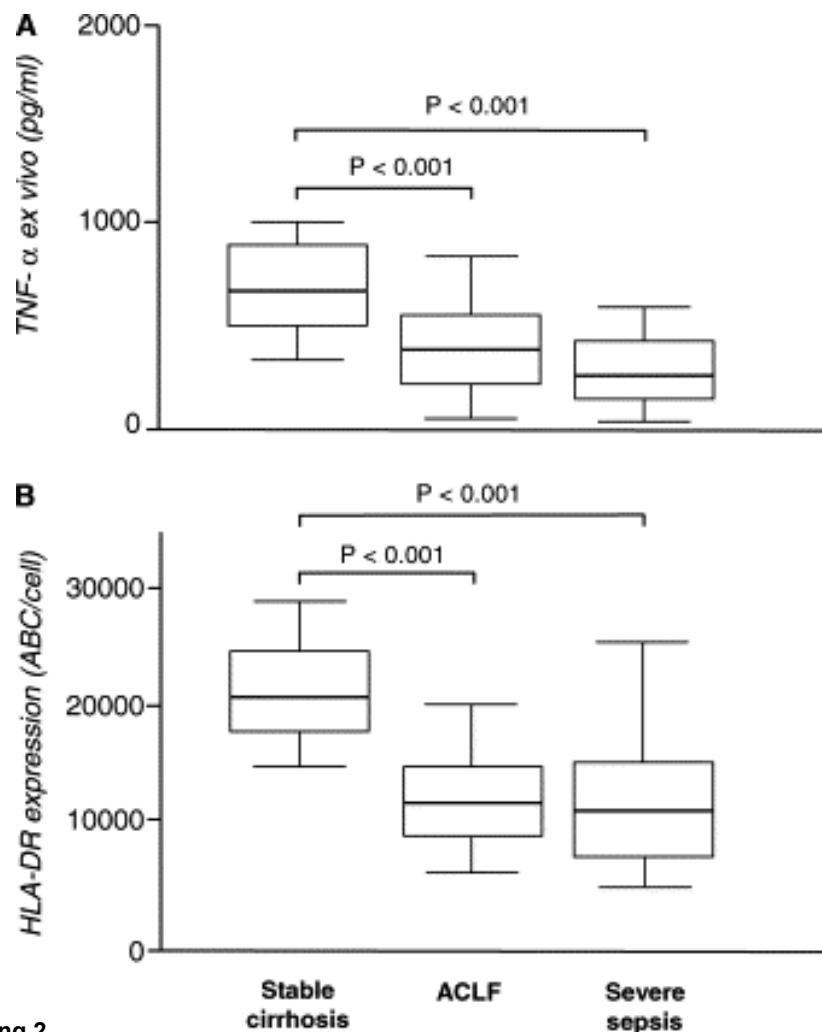


Abbildung 2

TNF- α *ex vivo* Sekretion (A) und HLA-DR Expression (B) bei Patienten mit stabiler Zirrhose, ACLF und schwerer Sepsis. Die Boxen markieren das untere Quartil, den Median und das obere Quartil; die Whisker zeigen die 10. bzw. 90. Perzentile an. Im Vergleich zu Patienten mit stabiler Zirrhose sind die beiden Parameter bei ACLF (und Sepsis) signifikant vermindert.

Im unteren Diagramm der Abbildung 2 werden die Resultate der monozytären HLA-DR-Expression der verschiedenen Gruppen dargestellt. Hier zeigte sich ein mit der *ex vivo*-Sekretion von TNF- α vergleichbares Verteilungsmuster. Sowohl die Sepsisgruppe als auch das ACLF-Kollektiv wiesen im Vergleich zu den Patienten mit stabiler Leberzirrhose eine signifikant verminderte HLA-DR-Expression auf (für beide $P < 0,001$). Zwischen den Patienten mit ACLF und schwerer Sepsis bestand kein Unterschied in der HLA-DR-Expression ($P > 0,05$). Auch in diesem Fall änderten sich die Ergebnisse nach Abgleich von CRP, PCT und Serumzytokinspiegeln mittels multivariater Regressionsanalyse nicht (Tabelle 8).

Multivariate Analyse

	Signifikanzniveau (<i>P</i> -Wert)	
	Stabile Zirrhose vs. ACLF	Stabile Zirrhose vs. Sepsis
TNF- α <i>ex vivo</i>	0,036	0,022
CRP	0,119	0,352
Serumzytokinspiegel	0,797	0,067
PCT	0,169	0,525

Tabelle 8.

Patienten mit nicht-dekompensierter Leberzirrhose (21,366 ABC/Zelle, Variationsbreite 13,638-37,881 ABC/Zelle) zeigten im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv (24,990 ABC/Zelle, Variationsbreite 12,710-44,543 ABC/Zelle) eine leichte, dennoch signifikant ($P < 0,01$) herabgesetzte mediane HLA-DR-Expression.

Vergleicht man ACLF- und Sepsisgruppe mit gesunden Probanden, fällt eine beachtliche Verminderung der monozytären HLA-DR-Expression für Patienten mit dekompenzierter Leberzirrhose (11,135 ABC/Zelle, Variationsbreite 5835-18,598 ABC/Zelle, $P < 0,0001$) und für Patienten mit schwerer Sepsis (10,856 ABC/Zelle, Variationsbreite 4788-32,492 ABC/Zelle, $P < 0,0001$) auf. In einer Subgruppenanalyse konnten keine signifikanten Unterschiede in der HLA-DR-Expression und der *ex vivo*-Sekretion von TNF- α zwischen Patienten mit nutritiv-toxischer Leberzirrhose und Patienten anderer Genese der Leberzirrhose detektiert werden (für beide $P > 0,05$).

4.5 DAS C-ALLEL DES IL-6 c.-174G>C-POLYMORPHIMUS IST MIT DEM AUFTRETEN EINES SEPTISCHEN SCHOCKS ASSOZIIERT

Die Genomverteilung des IL-6 c.-174G>C-Promotor-Polymorphismus in der gesamten Studienpopulation ergab, dass 30,4 % (34 Patienten) den homozygoten Wildtyp GG, 49,1 % (55 Patienten) eine Heterozygotie GC und 20,5 % (23 Patienten) das homozygot mutierte Allel C aufwiesen. Es wurde keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beobachtet ($P < 0,05$). In der Gruppe der Patienten mit septischem Schock trugen 21 Probanden (24,7%) den Genotypen GG, 45 (52,9 %) den Genotypen GC und 19 (22,4 %) den Genotypen CC. Von den 27 Sepsispatienten ohne septischen Schock war bei 13 Kandidaten (48,1%) der homozygote Wildtyp, bei 10 (37,0%) beide Allele und bei vier Patienten (14,8 %) das mutierte homozygote C-Allel an Position c.-174 im IL-6 Gen nachzuweisen.

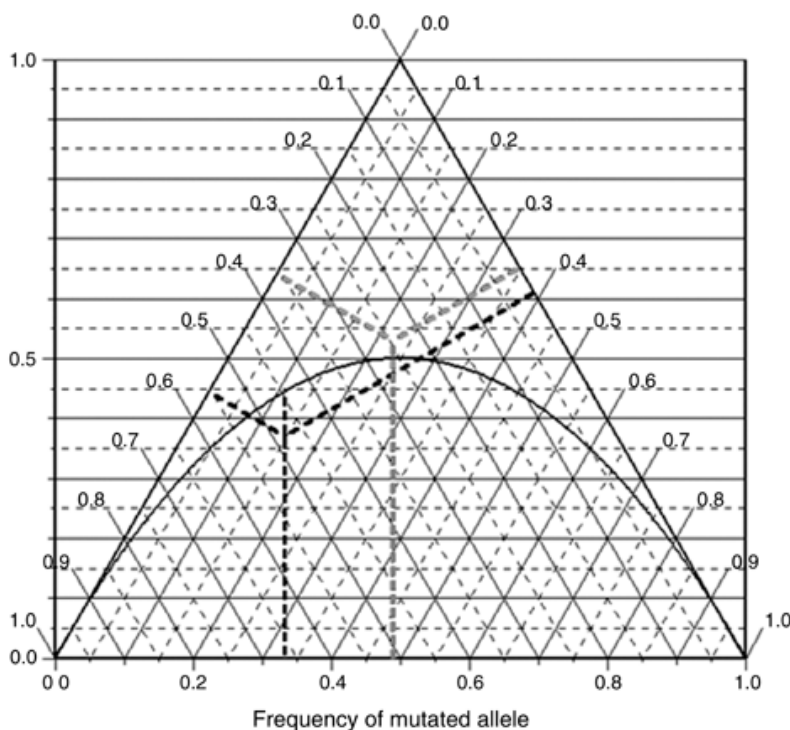


Abbildung 3

Das Finetti-Diagramm mit der Hardy-Weinberg-Parabel für den IL-6 c.-174G>C-Promotor-Polymorphismus für Patienten mit septischem Schock (grau gestrichelte Linie) und Sepsispatienten ohne septischen Schock (schwarz gestrichelte Linie). Die Genotypfrequenzen beider Gruppen liegen in der Nähe der Hardy-Weinberg-Parabel. Die Ordinate gibt die Heterozygotenfrequenz an. Die Seiten des Dreiecks zeigen die Homozygotenfrequenzen an. Auf der Abszisse sind die Allelfrequenzen aufgetragen. Das Lot des Populationspunktes auf die Abszisse unterteilt diese in die Allelfrequenzen Allel 1 und Allel 2.

Insgesamt zeigte sich eine signifikant erhöhte Prävalenz von Trägern des C-Allels (CC und GC) in der Gruppe von Patienten mit septischem Schock (75,3 %) im Vergleich zu Patienten ohne septischen Schock (51,8 %). Die Darstellung der Ergebnisse im Finetti-Diagramm (Abb. 3) verdeutlicht den signifikanten Unterschied in der Allelfrequenz des C-Allels im Vergleich beider Gruppen ($P = 0,04$). Während das C-Allel mit dem Auftreten eines septischen Schocks assoziiert ist, ergab sich keine Korrelation hinsichtlich der Entwicklung eines akuten Nierenversagens oder hinsichtlich des Überlebens.

4.6 IL-6 SERUMKONZENTRATIONEN UND IL-6 EX VIVO SEKRETION SIND MIT DEM IL-6 c.-174G>C-GENOTYPEN ASSOZIIERT

Für eine Subgruppe von 61 Patienten mit schwerer Sepsis wurden die IL-6-Serumkonzentrationen bei Ankunft auf der Intensivstation vor Beginn einer therapeutischen Intervention bestimmt. 18 (29,5 %) dieser Patienten waren homozygot für das IL-6 c.-174G-Allel, 31 (50, 8%) waren heterozygot (GC), und 12 Patienten (19,7 %) trugen den CC-Genotypen. Die höchsten IL-6-Serumkonzentrationen wurden in der Patientengruppe mit dem GG-Genotypen (Wildtyp) gemessen (Mittelwert 2209 pg/ml; Variationsbreite 0-14.000), gefolgt vom GC-Genotyp (Mittelwert 1113 pg/ml; Variationsbreite 0-11.000). Die niedrigsten Konzentration fanden sich in der CC-Genotyp-Gruppe (Mittelwert 256 pg/ml; Variationsbreite 0-850) (Abbildung 4).

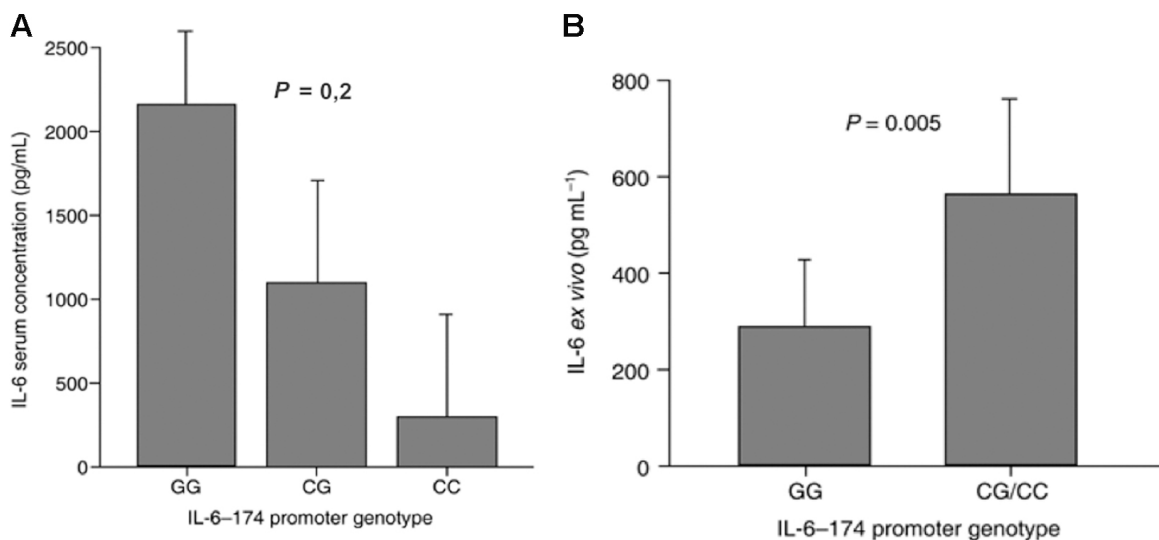


Abbildung 4

IL-6-Serumkonzentrationen (A) bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock in Abhängigkeit vom IL-6 c.-174-Genotypen. Die mittleren IL-6-Konzentrationen unterscheiden sich deutlich, aber nicht signifikant ($p = 0,2$). IL-6 ex vivo Sekretion (B) nach Stimulation mit LPS in einem Vollblut-Assay in Abhängigkeit vom IL-6 c.-174-Genotypen bei 61 Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock. Signifikant ($p = 0,005$) höhere IL-6 ex vivo Konzentrationen wurden bei Patienten mit den CG/CC-Genotypen ($n = 43$) im Vergleich zu Patienten mit dem homozygoten Wildtyp-Allel ($n = 18$) gefunden.

Die aufgezeigten Unterschiede zwischen den drei Genotypgruppen ergaben – wahrscheinlich aufgrund der insgesamt hohen Variabilität in den einzelnen Gruppen – keine Signifikanz ($P = 0,2$ in der ANOVA). In unserer Studie konnten die IL-6-Serumkonzentrationen weder mit dem Überleben noch mit der Entwicklung eines septischen Schocks assoziiert werden.

Die Bestimmung der IL-6 *ex vivo*-Sekretion erfolgte mit Hilfe eines zellbasierten Vollblut-Assays nach Stimulation mit Endotoxin in einer Subgruppe von 61 Patienten mit septischem Schock. In Abbildung 4 werden die mittleren IL-6-Konzentrationen nach LPS-Stimulation in Abhängigkeit von den IL-6 c.-174-Genotypen dargestellt. Für 18 Patienten mit homozygotem Wildtyp-Allel (GG) betrug die mittlere IL-6-Konzentration 276 pg/ml (Variationsbreite 33-1180). Signifikant höhere Konzentrationen ($p = 0,005$) wurden in der zusammengefassten Gruppe aus 31 Patienten mit heterozygotem Genotypen und 12 Patienten mit homozygotem C-Allel gefunden (Mittelwert 545 pg/ml; Variationsbreite 21-1550). Trotz dieser signifikanten Assoziation des C-Allels mit der IL-6 *ex vivo*-Sekretion konnte eine Korrelation der IL-6 *ex vivo*-Konzentration mit dem Auftreten eines septischen Schocks bzw. mit dem Gesamtüberleben der Patienten nicht nachgewiesen werden.

5 DISKUSSION

Eine einheitliche, international gültige Definition des ACLF existiert nach wie vor nicht. EASL und AASLD (European und American Association for the Study of the Liver) bezeichnen das ACLF in einer gemeinsamen Konsensus-Definition als akute Verschlechterung einer vorbestehenden, chronischen Lebererkrankung, gewöhnlich verursacht durch ein auslösendes Ereignis, verbunden mit einer erhöhten 3-Monats-Mortalität aufgrund eines Multiorganversagens (Olson et al. 2011). Nach der APASL (Asian Pacific Association for the Study of the Liver) wird das ACLF als eine akute Leberschädigung, die sich als Ikterus und Koagulopathie manifestiert und innerhalb von vier Wochen einen komplizierten Verlauf aufgrund der Entwicklung von Aszites und/oder einer hepatischen Enzephalopathie bei Patienten mit bekannter oder noch nicht diagnostizierter chronischer Lebererkrankung nimmt, definiert (Sarin et al. 2009). Beide Definitionen sind ungenau und geben keine eindeutigen diagnostischen Kriterien, die eine klare Einteilung des Krankheitsbildes ermöglichen, vor. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie des Krankheitsbildes könnte die Identifizierung potenzieller Biomarker und therapeutischer Angriffsziele ermöglichen (Jalan et al. 2012). Diese Arbeit zeigt auf, dass das Ausmaß der zellulären Immunsuppression zwischen Patienten mit akut auf chronischem Leberversagen und Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock bei Beginn einer intensivmedizinischen Behandlung vergleichbar ist. Für beide Gruppen konnte nachgewiesen werden, dass die *ex vivo* TNF- α Produktion und HLA-DR-Expression auf Monozyten als Marker des Ausmaßes der zellulären Immunaktivierung im Vergleich zu Patienten mit stabiler Leberzirrhose und zu gesunden Patienten deutlich vermindert ist.

Bisher wurden diese immunologischen Parameter für Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose noch nicht systematisch untersucht, hingegen für spezifische Krankheitsbilder wie Sepsis, Hyperglykämie und Polytrauma (Adrie et al. 2002; Cavaillon et al. 2001; Lekkou et al. 2004; Wasmuth et al. 2004; Woiciechowsky et al. 1998). Es zeigte sich eine Korrelation der beiden zellulären Immunmarker mit Morbidität und Mortalität (Le Moine et al. 1995; Muller Kobold et al. 2000, Berry et al. 2011). In dieser Arbeit wird deutlich, dass Ausmaß und Art der zellulären Immunsuppression von der zugrundeliegenden Ätiologie der Leberzirrhose unabhängig sind. Dieser Umstand lässt darauf schließen, dass diese Veränderungen allgemeine Charakteristika bei Patienten mit ACLF darstellen. In vorausgegangenen Studien konnten für Patienten mit überwiegend äthyltoxischer Lebererkrankung ebenfalls verschiedene Veränderungen der Leukozytenfunktion detektiert werden. Interessanterweise zeigten viele dieser Arbeiten eher eine Aktivierung als eine Suppression der peripheren mononukleären Zellen bei alkoholischer Leberzirrhose (Daniluk et al. 1996; Deviere et al. 1990; Hanck et al. 2000; Le Moine et al. 1995; Nouri-Aria et al. 1986; Yoshioka et al. 1989), auch wenn die Mehrzahl der Untersuchungen Patienten mit fortgeschrittener, aber klinisch stabiler Leberzirrhose analysierte. Andererseits helfen unsere Ergebnisse, die auf eine verminderte TNF- α -Synthese und eine reduzierte HLA-DR-Expression auf Monozyten bei einer akuten hepatischen Dekompensation hinweisen, den Immunstatus dieser kritisch kranken Patienten zu verstehen. Die deutlich reduzierte HLA-DR-Expression bei Patienten mit ACLF im Vergleich zu Patienten mit stabiler Leberzirrhose und gesunden Patienten ist hierbei von besonderer Bedeutung, da bekannt ist, dass der antigenpräsentierende HLA-DR-Rezeptorkomplex eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf verschiedene Pathogene spielt (Sorg 1991).

Es zeigte sich in unserer Analyse tendenziell eine eingeschränkte TNF- α *ex vivo*-Sekretion in dem Kollektiv der auf der Intensivstation verstorbenen im Vergleich zu den überlebenden Patienten. Der gleiche Trend konnte für die HLA-DR-Expression bei Verstorbenen im Vergleich zu den Überlebenden beobachtet werden. Die kleine Anzahl von Todesfällen in dem ACLF-Kollektiv erlaubte es jedoch nicht, signifikante Unterschiede festzustellen. Eine neuere Studie untersuchte die HLA-DR-Expression auf Monozyten in einem Kollektiv aus 38 Patienten mit ACLF bei Ankunft auf der Intensivstation sowie an den Tagen 3, 6 und 9 (Berres et al. 2009). Unser Ergebnis einer reduzierten HLA-DR-Expression auf Monozyten bei Patienten mit dekompenzierter Leberzirrhose im Vergleich zu stabil Lebererkrankten und Gesunden wurde in dieser Arbeit bestätigt. Darüber hinaus wiesen Patienten mit einem stabilem Verlauf der HLA-DR-Expression an Tag 3 und einem erneuten Anstieg der HLA-DR-Expression an Tag 9 einen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zu Patienten mit anhaltend abnehmender HLA-DR-Expression auf (Berres et al. 2009). In einer weiteren Arbeit wurde die HLA-DR-Expression in einem ACLF-Patientenkollektiv (n = 100) innerhalb von 48 Stunden nach Ankunft auf der Intensivstation sowie erneut an Tag 21 bestimmt (Berry et al. 2011). Bei Patienten mit stabilem Verlauf der Erkrankung betragen die relativen HLA-DR Spiegel 71%, bei Patienten mit einem Organversagen hingegen 53% und bei Patienten mit einem Multiorganversagen 34% (p < 0,02). Allerdings bestand zwischen diesen Gruppen kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf das Überleben. Patienten mit einem HLA-DR-Spiegel < 40% wiesen eine erhöhte 100-Tages-Mortalität auf. Ein fehlender Anstieg der HLA-DR Expression an Tag 21 war zudem mit einer erhöhten 30-Tages-Mortalität assoziiert (OR 6,9; p < 0,01).

Damit konnten sowohl die HLA-DR-Expression bei Ankunft auf Intensivstation als auch der Trend der HLA-DR-Expression im weiteren Krankheitsverlauf als potenzielle Prognosemarker für Patienten mit ACLF identifiziert werden. Des Weiteren zeigte sich eine negative Korrelation zwischen Leukozytenzahl und HLA-DR-Expression (Berry et al. 2011). Eine erhöhte Leukozytenzahl bei Diagnose eines ACLF war wiederum in einer kürzlich erschienenen Arbeit signifikant und unabhängig mit einer erhöhten Mortalität an Tag 28 assoziiert (Moreau et al. 2013). Besonders schwere Verläufe eines ACLF wurden bei Patienten ohne vorausgegangene Dekompensation der Lebererkrankung und hoher Leukozytenzahl beobachtet.

In Übereinstimmung mit früheren Studien (Le Moine et al. 1994) wies die Mehrzahl der Patienten mit ACLF und nachgewiesener Infektion hohe IL-6-Spiegel auf. In weiteren Pilotstudien konnte gezeigt werden, dass Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) und Interferon- γ die TNF- α *ex vivo*-Expression der Monozyten beeinflussen (Williams et al. 1995) und eine herabgesetzte HLA-DR *in vivo*-Expression bei septischen Patienten induzieren können (Docke et al. 1997; Nierhaus et al. 2003). Interessanterweise beeinflusst die Gabe von G-CSF bei Patienten mit Leberzirrhose positiv die Neutrophilenfunktion im Sinne einer verbesserten transendothelialen Migration (Fiuza et al. 2002). G-CSF führt zu einer Mobilisation von CD34⁺-Stammzellen aus dem Knochenmark und zu einer Proliferation hepatischer Progenitorzellen, welche als Ausdruck einer hepatischen Regeneration verstanden werden kann. Bei Patienten mit einer alkoholischen Steatohepatitis führte eine Behandlung mit G-CSF über 5 Tage nicht zu einer Verbesserung der Leberfunktion und verbesserte nicht das Überleben (Spahr et al. 2008).

In einer Doppelblindstudie wurde kürzlich die subkutane Gabe von 5 µg/kgKG G-CSF an 12 hintereinanderfolgenden Tagen im Vergleich zu Placebo in einem Kollektiv von 70 ACLF-Patienten untersucht (Garg et al. 2012). Das ACLF wurde nach den Kriterien der APASL definiert. Es zeigte sich ein signifikant ($p = 0,01$) verbessertes Überleben in der mit G-CSF behandelten Gruppe. Nach Stimulation mit G-CSF ließ sich nicht nur im peripheren Blut, sondern ebenfalls in den Sinusoiden der Leber ein Anstieg des Gehalts an CD34⁺-Stammzellen immunhistochemisch nachweisen. Der positive Effekt der G-CSF-Therapie spiegelte sich in sämtlichen klinisch-laborchemischen Scores (Child-Pugh und MELD) wider. Mit G-CSF stimulierte Patienten entwickelten seltener septische Komplikationen und ein hepatorenales Syndrom. Diese Ergebnisse konnten durch eine chinesische Arbeitsgruppe bei Patienten mit HBV-assoziiertem ACLF reproduziert werden (Duan et al. 2013). Die 3-Monats-Mortalität lag in der mit G-CSF behandelten Gruppe signifikant ($p = 0,02$) niedriger als in der Placebogruppe. Weitere Studien mit konsensierten ACLF-Definitionen sind erforderlich, um herauszuarbeiten, welche Patienten von einer Therapie mit G-CSF profitieren. Möglicherweise ließe sich insbesondere für Patienten mit reduzierter HLA-DR-Expression ein Vorteil einer G-CSF-Behandlung nachweisen.

Die molekularen Mechanismen für die beobachtete Depression der zellulären Immunfunktion sind noch nicht vollständig aufgeklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen. In vorangehenden Studien konnte die unterdrückte Monozytenaktivierung bei Sepsis mehrfach mit einer übermäßigen Produktion antiinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-10 und TGF-β1, assoziiert werden (Marchant et al. 1994; Marie et al. 1996).

Um diese Ergebnisse in unserem Patientenkollektiv nachzuvollziehen, bestimmten wir Serumspiegel pro- und antiinflammatorischer Zytokine zum Zeitpunkt der Bestimmung der HLA-DR-Expression und der LPS-induzierten *ex vivo* TNF- α Sekretion. In unserer Arbeit waren die Spiegel von IL-6 und IL-10 bei Patienten mit Sepsis und ACLF im Vergleich zu Patienten mit kompensierter Zirrhose erhöht. Im Gegensatz zu den zellulären Immunmarkern lagen sowohl die IL-6- als auch die IL-10-Konzentrationen im Sepsiskollektiv höher als bei Patienten mit ACLF. Da auch andere Entzündungsparameter (CRP, PCT) bei septischen Patienten erhöht sind, lassen sich unsere Daten zu den IL-6/-10-Spiegeln als Ausdruck einer noch ausgeprägteren systemischen Entzündung in der Sepsisgruppe erklären (Cavaillon et al. 2001). Bei Patienten mit ACLF spielen möglicherweise andere unbekannte Serumfaktoren eine Rolle, die an der Hemmung der HLA-DR-Expression und LPS-induzierten TNF- α *ex vivo*-Sekretion beteiligt sind. Ein solcher könnte das Serumbilirubin, dessen Spiegel bei ACLF-Patienten im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöht gemessen wurden, darstellen (Broome et al. 1992; Marschall et al. 2003; Puntis and Jiang 1996). Für Bilirubin konnten aber auch zytoprotektive Effekte nachgewiesen werden (Baranano et al. 2002; Greenberg 2002). Der Einfluss von Bilirubin auf die zelluläre Immunregulation sollte daher in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Das pleiotrope Zytokin IL-6 spielt eine wichtige Rolle in der Einleitung der Akut-Phase-Antwort und der Immunregulation während akuter und chronischer Entzündungen (Oldenburg et al. 1993, Woo et al. 2013). Vor dem Hintergrund, dass IL-6 rasch aus dem Blutkreislauf eliminiert und nicht in Zellen gespeichert wird, wird deutlich, dass die Konzentration von IL-6 im Blut einer präzisen Genregulation auf Transkriptions-

und Translationsebene bedarf. In diesem Zusammenhang könnten genetische Varianten in regulatorischen Regionen für individuelle Unterschiede der IL-6-Serumkonzentrationen während eines immunvermittelten Gewebeschadens verantwortlich sein.

In der Tat konnten klinische Studien eine Assoziation zwischen dem IL-6-Promotor-Polymorphismus c.-174G>C und den IL-6-Konzentrationen, aber auch der Prognose verschiedener entzündlicher Erkrankungen, aufzeigen (Fishman et al. 1998; Georges et al. 2001; Vickers et al. 2002, Giannitrapani et al. 2013). Die genaue Rolle von IL-6 und dessen Promotor-Polymorphismus c.-174G>C bei schwerer Sepsis wurde allerdings noch nicht definiert. Während einige Arbeiten keine Assoziation zwischen diesem Polymorphismus und der Inzidenz sowie der Mortalität schwerer Sepsis fanden (Heesen et al. 2002; Sipahi et al. 2006), konnten andere Untersucher eine Assoziation von IL-6-Varianten mit der Entwicklung einer Sepsis bei Kindern (Ahrens et al. 2004) und Erwachsenen (Sutherland et al. 2005) nachweisen. Dennoch hat keine dieser Studien die Assoziation des c.-174G>C-SNPs mit dem Auftreten des septischen Schocks untersucht. Es ist daher interessant, dass sich in unserer Patientenkohorte eine unterschiedliche Allelverteilung des IL-6 c.-174G>C-Polymorphismus bei Patienten mit schwerer Sepsis und Patienten mit septischem Schock fand. Das Minorallel (C) war mit dem Auftreten eines septischen Schockes assoziiert. Diese Daten ergänzen Untersuchungen, bei denen ein IL-6-Haplotyp, welcher das c.-174C-Allel trug, mit einem Organversagen bei kritisch kranken Patienten mit SIRS assoziiert war (Sutherland et al. 2005). In unserer Arbeit korrelierte die Verteilung des IL-6 c.-174-Genotyps weder mit dem Überleben der Patienten noch mit der Entwicklung eines Nierenversagens. Dies steht im Gegensatz zu einer Veröffentlichung, welche eine Assoziation des

IL-6-Polymorphismus mit dem Überleben nachweisen konnte (Schlüter et al. 2002). Diese Assoziation des GG-Genotyps mit verbessertem Überleben war auf Intensivpatienten mit Sepsis beschränkt, wohingegen bei nicht septischen Patienten kein Einfluss des IL-6-Promotor-Polymorphismus nachgewiesen wurde. Der Unterschied zwischen der zuletzt genannten Studie und unseren Ergebnissen könnte einerseits auf die geringere Patientenzahl in der Arbeit von Schlüter et al. (Schlüter et al. 2002) und andererseits darauf zurückzuführen sein, dass wir die Mortalität nur während des intensivpflichtigen Zeitraums zugrunde gelegt haben. Da sich das C-Allel in unserer Studie mit dem septischen Schock korrelieren ließ, welcher *per se* mit einer erhöhten Mortalität einhergeht, könnten möglicherweise größere Fallzahlen den Einfluss des IL-6 c.-174G>C-Polymorphismus auf die Prognose des septischen Schocks bestätigen.

Wir stellten im Weiteren die Hypothese auf, dass sich die phänotypischen Effekte mit der Höhe der IL-6-Expression korrelieren lassen. Daher untersuchten wir die IL-6-Serumkonzentrationen und die *ex vivo*-Sekretion von IL-6 nach Stimulation mit LPS bei Trägern verschiedener IL-6-Promotor-Genotypen. Patienten mit dem GG-Genotypen wiesen im Vergleich zu Probanden mit GC- und CC-Genotypen signifikant höhere IL-6-Serumspiegel auf. Unsere Ergebnisse stimmen mit anderen Untersuchungen überein (Fishman et al. 1998, Woo et al. 2013). Hier zeigten Individuen mit homozygotem GG-Genotypen die höchsten, heterozygote Probanden intermediäre und solche mit homozygotem CC-Genotypen die niedrigsten IL-6-Serumkonzentrationen. Mit dieser Arbeit ist es uns gelungen, eine Genotyp-Phänotyp-Assoziation bei Sepsispatienten nachzuweisen.

Ein weiteres interessantes Untersuchungsergebnis unserer Studie ist die starke Assoziation des c.-174C-Allels mit einer erhöhten IL-6-Sekretion nach LPS-Stimulation in einem Vollblut-Assay. Von Bedeutung ist, dass die *ex vivo*-Analysen unmittelbar nach Aufnahme der Patienten auf die Intensivstation vor Einleitung jeglicher spezifischer Therapie durchgeführt wurden, um mögliche störende Einflüsse auszuschließen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Daten, die von Hessen et al. (Heesen et al. 2002) präsentiert wurden, welche keine Assoziation zwischen dem IL-6-Promoter-Polymorphismus und den *ex vivo*-IL-6-Spiegeln in einem Kollektiv schwer verletzter Traumapatienten ohne Sepsis fanden. Möglicherweise scheint diese Korrelation auf septische Patienten mit einer exzessiven Aktivierung von multiplen Immunkaskaden begrenzt zu sein. In die erwähnte Studie wurde zudem nur eine sehr kleine Anzahl von homozygoten c.-174CC-Allelträgern eingeschlossen (Heesen et al. 2002).

Interessanterweise zeigen unsere Daten eine gegenläufige Korrelation von Serum- und *ex vivo*-IL-6-Konzentrationen in Abhängigkeit von IL-6 c.-174G>C-Genotypen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wurden diese inverse Beziehung zwischen systemischen IL-6-Spiegeln und den IL-6-Konzentration nach *ex vivo*-Stimulation mit LPS im Vollblut zuvor bei Traumapatienten beobachtet (Riese et al. 2000). Patienten mit hohen systemischen IL-6-Spiegeln wiesen niedrige stimulierte IL-6-Konzentrationen und umgekehrt auf. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Immunantwort unter systemischen Entzündungsbedingungen während einer Sepsis in mehrere Phasen aufgeteilt ist und die IL-6-Serumkonzentrationen von der Sekretion durch unterschiedliche Zelltypen sowie von genetischen Varianzen abhängig sind.

Die Sepsis mit ihrem unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbild ist in ihrem Verlauf abhängig von zahlreichen Einflüssen. Dazu zählen die Infektionsquelle, das zugrundeliegende Pathogen, das unterschiedliche Ausmaß des Organversagens, die Komorbiditäten des Patienten und der Zeitpunkt der Therapieeinleitung (Angus et al. 2013). Unsere Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung einer genetischen Suszeptibilität im Hinblick auf die Variabilität des septischen Krankheitsbildes. Wir wiesen eine Assoziation des homozygoten C-Allels des IL6 c.-174G>C-Polymorphismus mit dem Auftreten eines septischen Schocks bei Patienten mit schwerer Sepsis und zudem eine funktionelle Bedeutung des Promotorpolymorphismus nach. Da komplexe Signalkaskaden Entzündungsgeschehen und Immunantwort im menschlichen Organismus steuern, ist anzunehmen, dass die genetische Suszeptibilität in Bezug auf die Sepsis nicht das Ergebnis eines einzelnen Polymorphismus sondern eines Zusammenspiels vieler Gene ist (Chung et al. 2011). Zukünftige Studien sollten daher insbesondere Gen-Gen-Interaktionen bzw. Gen-Muster unter Zuhilfenahme genomweiter Assoziationsstudien untersuchen.

6 **LITERATURVERZEICHNIS**

- Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I, Monchi M, Vinsonneau C, Fitting C, Fraisse F, Dinh-Xuan AT, Carli P, Spaulding C, Dhainaut JF, Cavaillon JM (2002) Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-like" syndrome. *Circulation* 106: 562-8
- Ahrens P, Kattner E, Kohler B, Hartel C, Seidenberg J, Segerer H, Moller J, Gopel W (2004) Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 55: 652-6
- Akira S, Isshiki H, Nakajima T, Kinoshita S, Nishio Y, Natsuka S, Kishimoto T (1992) Regulation of expression of the interleukin 6 gene: structure and function of the transcription factor NF-IL6. *Ciba Found Symp* 167: 47-62;
- Albillos A, de la Hera A, Gonzalez M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, Ruiz-del-Arbol L, Alvarez-Mon M (2003) Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 37: 208-17
- Albillos A, Hera Ad Ade L, Reyes E, Monserrat J, Munoz L, Nieto M, Prieto A, Sanz E, Alvarez-Mon M (2004) Tumour necrosis factor-alpha expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. *J Hepatol* 40: 624-31
- Allison AC (1954) Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J* 1: 290-4
- Altin M, Rajkovic IA, Hughes RD, Williams R (1983) Neutrophil adherence in chronic liver disease and fulminant hepatic failure. *Gut* 24: 746-50
- Angus DC, van der Poll T (2013) Severe sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med* 369: 840-51
- Arcaroli J, Fessler MB, Abraham E (2005) Genetic polymorphisms and sepsis. *Shock* 24: 300-12
- Bahr MJ, Manns MP (2001) Function of the immune system in liver cirrhosis. *Z Gastroenterol* 39: 601-7
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH (2002) Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16093-8

- Berres ML, Schnyder B, Yagmur E, Inglis B, Stanzel S, Tischendorf JJ, Koch A, Winograd R, Trautwein C, Wasmuth HE (2009) Longitudinal monocyte human leukocyte antigen-DR expression is a prognostic marker in critically ill patients with decompensated liver cirrhosis. *Liver Int* 29: 536-543
- Berry PA, Antoniadou CG, Carey I, McPhail MJW, Hussain MJ, Davies ET, Wendon JA, Vergani D (2011) *Int Care Med* 37: 453-469
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (2009) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest* 136: e28
- Borden EC, Chin P (1994) Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. *J Lab Clin Med* 123: 824-9
- Broome U, Eriksson LS, Sundin U, Sundqvist KG (1992) Decreased in vitro production of tumor necrosis factor in primary biliary cirrhosis patients. *Scand J Gastroenterol* 27: 124-8
- Budelmann G (1969) Hugo Schottmüller, 1867-1936. The problem of sepsis. *Internist (Berl)* 10: 92-101
- Burgner D, Jamieson SE, Blackwell JM (2006) Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect Dis* 6: 653-63
- Byl B, Roucloux I, Crusiaux A, Dupont E, Deviere J (1993) Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 plasma levels in infected cirrhotic patients. *Gastroenterology* 104: 1492-7
- Castell JV, Geiger T, Gross V, Andus T, Walter E, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC (1988) Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-6/hepatocyte-stimulating factor in the rat. *Eur J Biochem* 177: 357-61
- Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Cloez-Tayarani I, Fitting C (2001) Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review. *J Endotoxin Res* 7: 85-93
- Child CG, Turcotte JG (1964) Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg* 1: 1-85
- Cullen DJ, Civetta JM, Briggs BA, Ferrara LC (1974) Therapeutic intervention scoring system: a method for quantitative comparison of patient care. *Crit Care Med* 2: 57-60

- Chung LP, Waterer WW (2011) Genetic predisposition to respiratory infection and Sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*: 48(5-6): 250-68
- Daniluk J, Kandefler-Szerszen M, Borowska L (1996) Tumor necrosis factor and interferon production by peripheral blood leukocytes of patients with alcoholic cirrhosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 44: 97-101
- Deviere J, Content J, Denys C, Vandenbussche P, Schandene L, Wybran J, Dupont E (1990) Excessive in vitro bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis. *Hepatology* 11: 628-34
- Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W (1997) Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 3: 678-81
- Duan XC, Liu FF, Tong JJ, Yang HZ, Chen J, Liu XY, Mao YL, Xin SJ, Hu JH (2013) Granulocyte-colony stimulating factor therapy improves survival in patients with hepatitis B virus-associated acute-on-chronic liver failure. *World J Gastroenterol* 19 (7): 1104-1110
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K (2007) Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 33: 606-18
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102: 1369-76
- Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM (2002) Granulocyte colony-stimulating factor improves deficient in vitro neutrophil transendothelial migration in patients with advanced liver disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 433-9
- Garg V, Garg H, Khan A, Trehanpati N, Kumar A, Sharma BC, Sakhuja P, Sarin SK (2012) Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34⁺ cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. *Gastroenterology* 142: 505-512
- Genesca J, Gonzalez A, Segura R, Catalan R, Marti R, Varela E, Cadelina G, Martinez M, Lopez-Talavera JC, Esteban R, Groszmann RJ, Guardia J (1999) Interleukin-6, nitric oxide, and the clinical and hemodynamic alterations of patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 94: 169-77

- Georges JL, Loukaci V, Poirier O, Evans A, Luc G, Arveiler D, Ruidavets JB, Cambien F, Tired L (2001) Interleukin-6 gene polymorphisms and susceptibility to myocardial infarction: the ECTIM study. Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde. *J Mol Med* 79: 300-5
- Giannitrapani L, Soresi M, Balasus D, Licata A, Montalto G (2013) Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174G/C) with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 19 (16): 2449-2455
- Gomez F, Ruiz P, Schreiber AD (1994) Impaired function of macrophage Fc gamma receptors and bacterial infection in alcoholic cirrhosis. *N Engl J Med* 331: 1122-8
- Greenberg DA (2002) The jaundice of the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15837-9
- Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, Thijs LG, Aarden LA (1989) Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 74: 1704-10
- Hanck C, Glatzel M, Singer MV, Rossol S (2000) Gene expression of TNF-receptors in peripheral blood mononuclear cells of patients with alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 32: 51-7
- Harry R, Auzinger G, Wendon J (2002) The clinical importance of adrenal insufficiency in acute hepatic dysfunction. *Hepatology* 36: 395-402
- Heesen M, Obertacke U, Schade FU, Bloemeke B, Majetschak M (2002) The interleukin-6 G(-174)C polymorphism and the ex vivo interleukin-6 response to endotoxin in severely injured blunt trauma patients. *Eur Cytokine Netw* 13: 72-7
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-94
- Holmes CL, Russell JA, Walley KR (2003) Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest* 124: 1103-15
- Hynninen M, Pettila V, Takkunen O, Orko R, Jansson SE, Kuusela P, Renkonen R, Valtonen M (2003) Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis. *Shock* 20: 1-4
- Jalan R, Gines P, Olson JC, Mookerjee RP, Moreau R, Garcia-Tsao G, Arroyo V, Kamath PS (2012) Acute-on chronic liver failure. *Hepatology* 57: 1336-1348
- Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR (2001). A model to predict survival in patient with end-stage liver disease. *Hepatology* 33(2): 464-70

- Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD (2000) Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med* 26 Suppl 1: S124-8
- Krawczyk M, Müllenbach R, Weber SN, Zimmer V, Lammert F (2010) Genome-wide association studies and genetic risk assessment of liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7: 669-81
- Lahnborg G, Friman L, Berghem L (1981) Reticuloendothelial function in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 16: 481-9
- Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F (1993) A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 270: 2957-63
- Le Moine O, Deviere J, Devaster JM, Crusiaux A, Durand F, Bernuau J, Goldman M, Benhamou JP (1994) Interleukin-6: an early marker of bacterial infection in decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 20: 819-24
- Le Moine O, Marchant A, De Groote D, Azar C, Goldman M, Deviere J (1995) Role of defective monocyte interleukin-10 release in tumor necrosis factor-alpha overproduction in alcoholics cirrhosis. *Hepatology* 22: 1436-9
- Lekkou A, Karakantza M, Mouzaki A, Kalfarentzos F, Gogos CA (2004) Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 161-7
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31: 1250-6
- Lin MT, Albertson TE (2004) Genomic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Med* 32: 569-79
- Luna-Casado L, Diez-Ruiz A, Gutierrez-Gea F, Santos-Perez JL, Rico-Irles J, Wachter H, Fuchs D (1997) Increased peripheral mononuclear cells expression of adhesion molecules in alcoholic cirrhosis: its relation to immune activation. *J Hepatol* 27: 477-83
- Majetschak M, Flach R, Heukamp T, Jennissen V, Obertacke U, Neudeck F, Schmit-Neuerburg KP, Schade FU (1997) Regulation of whole blood tumor necrosis factor production upon endotoxin stimulation after severe blunt trauma. *J Trauma* 43: 880-7
- Marchant A, Deviere J, Byl B, De Groote D, Vincent JL, Goldman M (1994) Interleukin-10 production during septicemia. *Lancet* 343: 707-8

- Marie C, Cavaillon JM, Losser MR (1996) Elevated levels of circulating transforming growth factor-beta 1 in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 125: 520-1
- Marschall HU, Trauner M, Lammert F (2003) Jaundice. *Scand J Gastroenterol* 38: 233-4
- Martin C, Boisson C, Haccoun M, Thomachot L, Mege JL (1997) Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma. *Crit Care Med* 25: 1813-9
- Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riche F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpesch M, Dhainaut JF (1999) Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 282: 561-8
- Miranda DR, de Rijk A, Schaufeli W (1996) Simplified Therapeutic Intervention Scoring System: the TISS-28 items-results from a multicenter study. *Crit Care Med* 24: 64-73
- Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, Durand F, Gustot T, Saliba F, Domenicali M, Gerbes A, Wendon J, Alessandria C, Laleman W, Zeuzem S, Trebicka J, Bernardi M, Arroyo V (2013) Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* 144: 1426-1437
- Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, Tervaert JW (2000) Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med* 26: 883-92
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73
- Navasa M, Follo A, Filella X, Jimenez W, Francitorra A, Planas R, Rimola A, Arroyo V, Rodes J (1998) Tumor necrosis factor and interleukin-6 in spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: relationship with the development of renal impairment and mortality. *Hepatology* 27: 1227-32
- Nierhaus A, Montag B, Timmler N, Frings DP, Gutensohn K, Jung R, Schneider CG, Pothmann W, Brassel AK, Schulte Am Esch J (2003) Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 29: 646-51
- Nouri-Aria KT, Alexander GJ, Portmann BC, Hegarty JE, Eddleston AL, Williams R (1986) T and B cell function in alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2: 195-207

- Oberhoffer M, Vogelsang H, Russwurm S, Hartung T, Reinhart K (1999) Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis. *Clin Chem Lab Med* 37: 363-8
- Oldenburg HS, Rogy MA, Lazarus DD, Van Zee KJ, Keeler BP, Chizzonite RA, Lowry SF, Moldawer LL (1993) Cachexia and the acute-phase protein response in inflammation are regulated by interleukin-6. *Eur J Immunol* 23: 1889-94
- Olson JC, Wendon JA, Kramer DJ, Vincente A, Jalan R, Garcia-Tsao G, et al. Intensive Care of the patient with cirrhosis (2011). *Hepatology* 54: 1864-1872
- Olson JC, Kamath PS (2012) Acute-on-Chronic Liver Failure: What are the Implications? *Curr Gastroenterol Rep* 14: 63-6
- Povoa P (2002) C-reactive protein: a valuable marker of sepsis. *Intensive Care Med* 28: 235-43
- Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R (1973) Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 60: 646-9
- Pugin J (2002) Biomarkers of sepsis: is procalcitonin ready for prime time? *Intensive Care Med* 28: 1203-4
- Puntis MC, Jiang WG (1996) Plasma cytokine levels and monocyte activation in patients with obstructive jaundice. *J Gastroenterol Hepatol* 11: 7-13
- Rajkovic IA, Williams R (1986) Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 6: 252-62
- Riese J, Denzel C, Mehler C, Zowe M, Hohenberger W, Haupt W (2000) The diminished postoperative capacity of blood leukocytes to produce IL-6 is associated with high concentrations of IL-6 in the circulation. *Cytokine* 12: 531-4
- Rodriguez-Ramos C, Galan F, Diaz F, Elvira J, Martin-Herrera L, Giron-Gonzalez JA (2001) Expression of proinflammatory cytokines and their inhibitors during the course of spontaneous bacterial peritonitis. *Dig Dis Sci* 46: 1668-76
- Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R (2000) The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* 32: 734-9
- Santos-Perez JL, Diez-Ruiz A, Luna-Casado L, Soto-Mas JA, Wachter H, Fuchs D, Gutierrez-Gea F (1996) T-cell activation, expression of adhesion molecules and response to ethanol in alcoholic cirrhosis. *Immunol Lett* 50: 179-83

- Sarin SK, Kumar A, Almeida JA, Chawla YK, Fan ST, Garg H, et al. (2009) Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL). *Hepatol Int* 3: 269-282
- Schlüter B, Raufhake C, Erren M, Schotte H, Kipp F, Rust S, van Aken H, Assmann G, Berendes E (2002) Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis. *Crit Care Med* 30: 32-7
- Sipahi T, Pocan H, Akar N (2006) Effect of various genetic polymorphisms on the incidence and outcome of severe sepsis. *Clin Appl Thromb Hemost* 12: 47-54
- Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW (1988) Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 318: 727-32
- Sorg C (1991) Macrophages in acute and chronic inflammation. *Chest* 100: 173-175
- Steinberg MH (2009) Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *Scientific World Journal* 9: 46-67
- Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Muller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J (2009) IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41: 1100-4
- Sutherland AM, Walley KR, Manocha S, Russell JA (2005) The association of interleukin 6 haplotype clades with mortality in critically ill adults. *Arch Intern Med* 165: 75-82
- Thomas L (1972) Germs. *N Engl J Med* 287: 553-5
- Vickers MA, Green FR, Terry C, Mayosi BM, Julier C, Lathrop M, Ratcliffe PJ, Watkins HC, Keavney B (2002) Genotype at a promoter polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein. *Cardiovasc Res* 53: 1029-34
- Wasmuth HE, Kunz D, Graf J, Stanzel S, Purucker EA, Koch A, Gartung C, Heintz B, Gressner AM, Matern S, Lammert F (2004) Hyperglycemia at admission to the intensive care unit is associated with elevated serum concentrations of interleukin-6 and reduced ex vivo secretion of tumor necrosis factor-alpha. *Crit Care Med* 32: 1109-14
- Watanabe E, Hirasawa H, Oda S, Matsuda K, Hatano M, Tokuhisa T (2005) Extremely high interleukin-6 blood levels and outcome in the critically ill are associated with tumor necrosis factor- and interleukin-1-related gene polymorphisms. *Crit Care Med* 33: 89-97; discussion 242-3

- Williams MA, Kouroumoussis I, Syndercombe-Court D, Hendry L, Newland AC, Kelsey SM (1995) Administration of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after chemotherapy regulates the expression and secretion of monocyte tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptors p55 and p75. *Blood* 86: 4234-42
- Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Schoning B, Glockner F, Docke WD, Volk HD (1998) Diminished monocytic HLA-DR expression and ex vivo cytokine secretion capacity in patients with glioblastoma: effect of tumor extirpation. *J Neuroimmunol* 84: 164-71
- Woo P, Humphries SE (2013) IL-6 polymorphism: a useful genetic tool for inflammation research. *The Journal of Clinical Investigation* 123 (4): 1413-1414
- Yoshioka K, Kakumu S, Arao M, Tsutsumi Y, Inoue M (1989) Tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic liver disease. *Hepatology* 10: 769-73

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	–	Antibody binding capacity
ACLF	–	Akut auf chronisches Leberversagen
AIDS	–	Aquired immune deficiency syndrome
CD	–	Cluster of differentiation
CRP	–	C-reaktives Protein
DNA	–	Deoxyribonucleic acid
FACS	–	Fluorescence activated cell sorter
HLA	–	Human leukocyte antigen
G-CSF	–	Granulocyte colony stimulating factor
ICU	–	Intensive care unit
IL	–	Interleukin
LPS	–	Lipopolysaccharid
PBC	–	Primär biliäre Zirrhose
PCR	–	Polymerase-Kettenreaktion
PCT	–	Procalcitonin
PSC	–	Primär sklerosierende Cholangitis
rpm	–	Rounds per minute
SAPS II	–	Simplified acute physiology score II
SBP	–	Spontan bakterielle Peritonitis
SIRS	–	Systemic inflammatory response syndrome
SNP	–	Single nucleotide polymorphism
TISS	–	Therapeutic intervention scoring system
TGF- β	–	Transforming growth factor β
TNF- α	–	Tumor necrosis factor α

8 **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. med. Frank Lammert möchte ich für sein Vertrauen und die Unterstützung bei der Verwirklichung meiner Forschungsarbeit und bei der Fertigstellung dieser Arbeit besonders danken. Seine unermüdliche Förderung und Motivation weiß ich sehr zu schätzen.

Herrn Prof. Dr. med. Hermann E. Wasmuth möchte ich für insbesondere für die klinische Einarbeitung in das Thema und die fortwährende Unterstützung danken.

Frau Prof. Dr. med. Sester danke ich für die Übernahme des Korreferats und wertvolle Hinweise.

Frau Dr. med. Alexa Werth gilt mein Dank für die Einarbeitung und Unterstützung während meiner experimentellen Arbeit.

Herrn Dr. med. Peter Minko danke ich als Freund für seine motivierende Unterstützung und nützliche Ratschläge.

Abschließend bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Vincent Zimmer für seine beratende Mitwirkung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

9 PUBLIKATIONEN**Patients with acute on chronic liver failure display
'sepsis-like' immune paralysis**

Hermann E. Wasmuth¹, Dagmar Kunz², Eray Yagmur², Annette Timmer-Stranghöner¹,
Daniel Vidacek¹, Elmar Siewert¹, Jens Bach¹, Andreas Geier¹, Edmund A. Purucker¹,
Axel M. Gressner², Siegfried Matern¹, Frank Lammert^{1,*}

¹Department of Medicine III, University Hospital Aachen (UKA), Aachen University (RWTH), Pauwelsstrasse 30, D-52074 Aachen, Germany

²Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, University Hospital Aachen (UKA), Aachen University (RWTH), Pauwelsstrasse 30,
D-52074 Aachen, Germany

Journal of Hepatology **42** (2005), 195-201

The interleukin-6 (*IL6*)-174 G/C promoter genotype is associated with the presence of septic shock and the *ex vivo* secretion of IL6

J. J. W. Tischendorf,* E. Yagmur,† D. Scholten,* D. Vidacek,* A. Koch,* R. Winograd,*
A. M. Gressner,† C. Trautwein,* H. E. Wasmuth* & F. Lammert‡

International Journal of Immunogenetics **34** (2007), 413-418

10 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Vidaček
 Vornamen: Daniel Stephan
 Geburtsort: Moers
 Geburtsdatum: 29.10.1976
 Familienstand: verheiratet
 Konfession: römisch katholisch

Schullaufbahn

08/1983 – 06/1987 Einschulung in die Eichendorff Grundschule, Moers
 08/1987 – 06/1997 Gymnasium Adolfinum, Moers
 06/1997 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

07/1997 – 08/1998 Zivildienst bei der Johanniter-Unfall-Hilfe Duisburg e.V.

Universitätslaufbahn

10/1999 – 09/2002 Universität des Saarlandes - Homburg/Saar
 09/2001 Physikum
 08/2002 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 10/2002 – 09/2004 Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
 Doktorand im Forschungslabor der Medizinischen Klinik III,
 Universitätsklinikum Aachen
 08/2004 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 10/2004 – 10/2005 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Heidelberg
 12/2005 Ärztliche Prüfung
 12/2005 Approbation als Arzt

Berufsausbildung

01/2006 – 06/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Hygiene und
 Mikrobiologie der Universität Heidelberg, Sektion Infektiologie
 08/2006 – 08/2008 Assistenzarzt am St. Josef Krankenhaus Moers, Abteilung für
 Innere Medizin
 seit 08/2008 Wissenschaftlicher Assistent in der Klinik für Innere Medizin II,
 Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg