

**Explorative Studie zur Quantifizierung frei
zirkulierender Nukleinsäuren und deren Einfluss auf
die Gerinnung im Rahmen der humanen Sepsis und
postoperativer Inflammationsreaktion**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Omar Samara

aus Hamburg

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zentrum für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin
und Schmerztherapie

Gutachter:

Priv.-Doz. Dr. Schneck

Gutachter:

Prof. Dr. Bräuninger

Tag der Disputation:

05.06.2023

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Geschichte und Definition der Sepsis	1
1.2	Epidemiologie	5
1.3	Pathophysiologie	6
1.3.1	Immunreaktionen im Rahmen der Sepsis	6
1.3.2	Mechanismen der septischen Koagulopathie	8
1.3.3	Mechanismen zur Freisetzung von Nukleinsäuren im Rahmen der Sepsis	9
1.4	Herausforderung Sepsis nach großen abdominalchirurgischen Eingriffen	11
1.5	Diagnostik der Sepsis	12
1.6	Grundlagen der Sepsis-Therapie	13
1.7	Biomarker und Relevanz von frei zirkulierenden Nukleinsäuren im Rahmen der Sepsis	15
1.8	Fragstellungen	18
2	<u>Material und Methoden</u>	19
2.1	Studiendesign	19
2.2	Ethikvotum, Einwilligung der Patienten und Pseudonymisierung	21
2.3	Methodik	21
2.3.1	Blutentnahmen	21
2.3.2	Gerinnungsanalyse	21
2.3.2.1	Rotationsthrombelastometrie	22
2.3.2.2	Thrombozytenaggregometrie	25
2.3.3	Isolation der Nukleinsäuren	27
2.3.3.1	Isolation und Quantifizierung der cfDNA	27
2.3.3.2	Isolation und Quantifizierung der exRNA	28
2.3.4	Laborchemische Parameter, Blutbild und Globalgerinnungsparameter	30
2.3.5	Erfassung klinischer Parameter	30

2.3.6	Statistik	31
2.4	Materialliste	31
3	<u>Ergebnisse</u>	32
3.1	Charakterisierung des Studienkollektivs	32
3.2	Hypothese I - Die Menge an freien Nukleinsäuren ist im Plasma septischer Patienten im Vergleich zu postoperativen Patienten und gesunden Probanden erhöht	33
3.3	Hypothese II - Die Menge an freien Nukleinsäuren korreliert mit dem Schweregrad der vorliegenden Gerinnungsstörung	35
3.4	Hypothese III - Je höher die Menge an freien Nukleinsäuren, desto höher ist die Stabilität der Gerinnsel	38
3.5	Hypothese IV - Die Menge an freien Nukleinsäuren korreliert mit der Schädigung von Leber und Niere der Patienten	39
3.6	Hypothese V - Eine persistierend erhöhte Menge an Nukleinsäuren im Verlauf stellt einen negativ prognostischen Faktor dar	43
4	<u>Diskussion</u>	44
4.1	Hypothese I: Freie Nukleinsäuren im Vergleich von Sepsis und operativem Trauma	44
4.1.1	Frei zirkulierende DNA	45
4.1.2	Frei zirkulierende RNA	48
4.2	Hypothese II und III: Der Einfluss der Nukleinsäuren auf die septische Koagulopathie	49
4.3	Hypothese IV: Die Assoziation zwischen frei zirkulierende Nukleinsäuren und septischen Endorganschäden	52
4.4	Hypothese V: Frei zirkulierende Nukleinsäuren als prognostische Biomarker in der Sepsis	54
5	<u>Limitationen</u>	55
6	<u>Ausblick</u>	56
7	<u>Zusammenfassung</u>	58

<u>8</u>	<u>Summary</u>	<u>59</u>
<u>9</u>	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>60</u>
<u>10</u>	<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>63</u>
<u>11</u>	<u>Tabellenverzeichnis</u>	<u>64</u>
<u>12</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>65</u>
<u>13</u>	<u>Anhang</u>	<u>74</u>
13.1	Materialverzeichnis	74
13.2	Abdruckgenehmigung ROTEM®	80
13.3	Abdruckgenehmigung Multiplate®	81
<u>14</u>	<u>Publikationsverzeichnis</u>	<u>82</u>
<u>15</u>	<u>Ehrenwörtliche Erklärung</u>	<u>83</u>
<u>16</u>	<u>Danksagung</u>	<u>84</u>

1 Einleitung

1.1 Geschichte und Definition der Sepsis

Im Jahr 1992 publizierten das American College of Chest Physicians und die Society of Critical Care Medicine eine internationale Definition der Sepsis, welche eine systemische Inflammationsreaktion (Systemic Inflammatory Response Syndrome [SIRS]) als Ursache voraussetzt (siehe Tabelle 1). Ein SIRS konnte entweder ohne eine Infektion, zum Beispiel durch ein Trauma oder eine Verbrennung, ausgelöst werden oder in Kombination mit einer Infektion eine Sepsis verursachen. Nach den damaligen Kriterien wurden zwei weitere Schweregrade unterschieden. Im Falle eines akuten Organausfalls waren die Kriterien einer schweren Sepsis erfüllt. Das schwerwiegendste Bild der Sepsis war nach der damaligen Definition der septische Schock, welcher als „persistierende Sepsis-induzierte Hypotension trotz adäquater Flüssigkeitstherapie mit einhergehenden Perfusionsabnormalitäten“ definiert wurde¹. Zusammenfassend stand die zu Grunde liegende Infektion im Fokus der Sepsisdefinition und nicht die körpereigene Reaktion auf die Infektion.

Körpertemperatur	$\geq 38^{\circ}\text{C}$ oder $\leq 36^{\circ}\text{C}$
Herzfrequenz	Tachykardie von $\geq 90/\text{min}$
Atemfrequenz	Tachypnoe von $\geq 20/\text{min}$ bzw. $\text{paCO}_2 \leq 32 \text{ mmHg}$ ($< 4,3 \text{ kPa}$)
Blutbild	Leukozytose von $> 12\ 000 \text{ Zellen}/\mu\text{l}$ oder Leukopenie von weniger als $4\ 000/\mu\text{l}$ oder $\geq 10\%$ unreife neutrophile Granulozyten im Differenzialblutbild

Tabelle 1 Definition des Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Es müssen mindestens 2 Kriterien erfüllt sein, damit ein SIRS vorliegt.¹

Einleitung

Durch stetig neue wissenschaftliche Erkenntnisse rückte die körpereigene Immunantwort auf die Infektion zunehmend in den Fokus mit dem Resultat, dass keine international einheitliche Definition und Therapieempfehlung der Sepsis existierten. Die Expertise über das Krankheitsbild der Sepsis verteilte sich im Jahre 2002 insbesondere auf drei große Gesellschaften: die „European Society of Intensive Care Medicine“ (ESICM), die „Society of Critical Care Medicine“ (SCCM) und das „International Sepsis Forum“ (ISF). Bei der 15. Jahrestagung der ESCIM wurde daher entschieden, dass diese Expertise gebündelt werden sollte, was zur Gründung der Surviving Sepsis Campaign (SSC) führte². Ziel der Surviving Sepsis Campaign war es, die Mortalität der Sepsis durch evidenzbasierte Leitlinien zur Diagnostik und Therapie weltweit zu reduzieren. Die erste Version dieser Leitlinien wurde im Jahr 2004 publiziert, im Jahr 2008 wurde eine überarbeitete Version der Leitlinien herausgegeben. In einer Studie von Levy et al. aus dem Jahre 2010 konnte bereits nachgewiesen werden, dass mit Anwendung der empfohlenen Maßnahmen aus der SSC-Leitlinie eine signifikante Reduktion der Sepsismortalität in Krankenhäusern erreicht werden konnte³. Für diese Dissertationsschrift wurden als Grundlage die Diagnosekriterien der dritten Version der internationalen Leitlinien zur Behandlung der schweren Sepsis und des septischen Schocks der Surviving Sepsis Campaign aus dem Jahre 2012 genutzt (siehe Tabelle 2)^{4,5}.

Die letzte wesentliche Aktualisierung der Definition der Sepsis stammt von Singer et al. aus dem Jahre 2016, also nach Beendigung der vorliegenden Dissertationsarbeit⁶. Sie sieht einen Wandel der Diagnosekriterien für eine Sepsis vor, mit dem Ziel die vielen unterschiedlichen Definitionen und Terminologien einheitlich zu gestalten. Mit der neuen Definition ändert sich der Fokus der Diagnose der Sepsis von der vorher obligat vorliegenden Infektion, hin zur pathologischen Immunantwort auf eine Infektion und der damit einhergehenden Organschädigung. Es wird zudem nur zwischen der Sepsis und dem septischen Schock differenziert, das Stadium der schweren Sepsis findet sich hier nicht mehr. Eine Sepsis wird nun als *„lebensbedrohliche Organdysfunktion, verursacht durch eine dysregulierte Wirtsantwort auf eine Infektion“* definiert. Als Grundlage zur Erkennung der Sepsis wird ausschließlich der Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA-Score) für intensivmedizinische beziehungsweise der quick Sequential Organ Failure Assessment Score (qSOFA-Score) für nicht-intensivmedizinische Patienten herangezogen, unabhängig vom Vorliegen der SIRS-Kriterien⁷. Der qSOFA erfasst

Einleitung

lediglich die Atemfrequenz, das Bewusstsein und den Blutdruck. Sollten zwei der drei Parameter auffällig sein, ist von einem erhöhten Risiko für das Vorliegen einer Sepsis auszugehen⁷. Die Empfehlung zur Nutzung des qSOFA wurde in der aktualisierten Leitlinie aus dem Jahre 2021 jedoch wieder revidiert. Präklinisch, sowie in der Notaufnahme und auf peripheren Stationen wird nun zum Sepsis-Screening die Bestimmung der SIRS Kriterien empfohlen, da diese eine höhere Sensitivität und Spezifität zur Erkennung einer Sepsis hätten als der qSOFA^{8,9}. Alternativ hierzu könne man auch den National Early Warning Scores (NEWS) beziehungsweise den Modified Early Warning Score (MEWS) nutzen. Dies sind Scores, die anhand verschiedener Vitalparameter einen Punktwert erfassen, welcher je nach Höhe einen Hinweis darauf geben soll, ob der Patient kritisch krank ist.

Einleitung

Dokumentierte Infektion oder Verdacht auf Infektion + einige der folgenden Kriterien:

Allgemeine Zeichen	Inflammatorische Zeichen
Fieber ($> 38.3^{\circ}\text{C}$)	Leukozytose ($>12\ 000/\mu\text{L}$)
Hypothermie (Kerntemperatur $< 36^{\circ}\text{C}$)	Leukopenie ($<4\ 000/\mu\text{L}$)
Herzfrequenz $>90/\text{min}$ oder mehr als 2 SD über dem der Altersnormwert	Normale Leukozytenzahl mit mehr als 10% unreife Formen
Tachypnoe ($>30/\text{min}$)	C-reaktives Protein mehr als 2 SD über dem Normwert
Eingeschränkter neurologischer Status	Procalcitonin mehr als 2 SD über dem Normwert
Ödeme oder positive Flüssigkeitsbilanz ($>20\ \text{ml/kg/24 h}$)	
Hyperglykämie (Blutzucker $>140\ \text{mg/dl}$ oder $7,7\ \text{mmol/l}$) bei Ausschluss von Diabetes	
Zeichen von Organversagen	Hämodynamische Zeichen
Akute Oligurie (Urinausscheidung $<0,5\ \text{ml/kg/h}$ für mindestens 2 h trotz adäquater Flüssigkeitstherapie)	Arterielle Hypotonie (SBP $<90\ \text{mmHg}$, MAP $<70\ \text{mmHg}$, oder SBP Abfall $>40\ \text{mmHg}$ oder weniger als 2 SD unter Altersnormwert)
Arterielle Hypoxämie ($\text{paO}_2/\text{FiO}_2 <300$)	
Kreatininanstieg $>0,5\ \text{mg/dl}$ oder $44,2\ \mu\text{mol/l}$	Zeichen der Gewebsperfusion
Gerinnungsstörung (INR $>1,5$ oder aPTT $>60\ \text{s}$)	Hyperlaktatämie ($>1\ \text{mmol/l}$)
Ileus (keine Darmgeräusche)	Reduzierte kapilläre Füllung oder Marmorierung
Thrombozytopenie ($<100\ 000/\mu\text{l}$)	
Hyperbilirubinämie (Bilirubin $>4\ \text{mg/dl}$ oder $70\ \mu\text{mol/l}$)	

Tabelle 2 Diagnosekriterien der Sepsis nach Surviving Sepsis Campaign 2012⁵.

Abk.: aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, INR = International Normalized Ratio, MAP = mittlerer arterieller Druck, SBP = systolischer Blutdruck, SD = Standardabweichung,

1.2 Epidemiologie

Eine statistische Analyse von epidemiologischen Daten der Jahre 2007-2013 für Deutschland kommt auf eine Anzahl von 279.530 Fällen im Jahr 2013, was auf die Bevölkerung hochgerechnet circa 335 Patienten mit einer Sepsis pro 100 000 Einwohnern entspricht. Von diesen Fällen litten 41 % der Patienten an einer schweren Sepsis. Im Jahr 2013 starben in Deutschland demnach 67 849 Menschen an einer Sepsis (Sterblichkeitsrate 24,3 %) ¹⁰. Jedoch untersuchte die OPTIMISE Studie retrospektiv die in zehn deutschen Krankenhäusern kodierte Sepsisfälle von 2015-2017 und kam im Ergebnisbericht zum Schluss, dass die Validität so gering ist, dass „sinnvolle epidemiologische Studien oder Qualitätsmanagement auf dieser Basis nach aktuellem Stand nicht umsetzbar sind“, was die zuvor veröffentlichten Daten relativiert ¹¹.

Insbesondere für Patienten aus den Vereinigten Staaten existieren zahlreiche Studien zur Inzidenz und Mortalität der Sepsis. Im Jahr 2007 publizierten Dombrovskiy et al. eine retrospektive Studie, die die Sterblichkeitsrate der schweren Sepsis im Zeitraum von 1993-2003 mit fast 50 % beziffert ¹². Nach Gründung der Surviving Sepsis Campaign 2002 sank die Sterblichkeit durch Einhalten der Behandlungsrichtlinien in den USA auf 28,3 % ab. In Europa war sie allerdings signifikant höher (41,1 %) ¹³.

Im Jahr 2017 erkrankten weltweit circa 48,9 Millionen Patienten an einer Sepsis, die Sterblichkeit lag bei 19,7 % (11 Millionen Sepsis-assoziierte Todesfälle) ¹⁴. Eine Auswertung der Anzahl von Patienten, die auf einer Intensivstation einen septischen Schock erlitten, zeigte eine Sterblichkeitsrate von circa 38 % ¹⁵.

Die Werte für Inzidenz und Sterblichkeit variieren somit in der Fachliteratur teilweise stark, es bleibt aber die Erkenntnis, dass es sich bei der Sepsis um eine lebensbedrohliche Erkrankung handelt. Die Variationen zwischen den Publikationen sind auf verschiedene Gründe zurückzuführen. Wie in Kapitel 1.1 bereits erwähnt, hat sich die Definition der Sepsis stets verändert, was teilweise zu unterschiedlichen Einschlusskriterien der epidemiologischen Studien führte. Auch die Größe der in die Studie eingeschlossenen Krankenhäuser spielt unter anderem eine wichtige Rolle. Um eine Vergleichbarkeit auch auf globaler Ebene zu erleichtern sollte die Methodik für zukünftige epidemiologische Studien und die darin genutzten Definitionen für Sepsis vereinheitlicht werden ¹⁶.

1.3 Pathophysiologie

Die Sepsis ist ein komplexes und dynamisches Syndrom, bei dem insbesondere aus immunpathologischer Sicht eine Vielzahl von Kaskaden und Folgereaktionen ausgelöst wird. Daher werden im Folgenden zunächst einige pathophysiologische Grundmechanismen der Sepsis geschildert und anschließend auf die Aspekte näher eingegangen, die als Hintergrund für diese Studie relevant sind.

1.3.1 Immunreaktionen im Rahmen der Sepsis

Ein vielzitiertes Satz um die Sepsis zu charakterisieren ist „*it is our response [...] that makes the disease*“¹⁷. Dies bedeutet, dass nicht das Pathogen selbst die Schwere der Erkrankung definiert, sondern die Reaktion des Wirtes auf das Pathogen.

Zu Beginn jeder Sepsis steht zunächst der Verlust der Integrität natürlicher Körperbarrieren, wodurch dem Pathogen eine Eintrittspforte gewährt wird, und eine sogenannte Translokation erfolgt. Dies kann durch verschiedene Prozesse verursacht werden. Ein möglicher Auslöser ist eine Operation, bei der die bakterielle Translokation iatrogen geschieht, ein Trauma oder eine Verbrennung kann jedoch die gleichen Auswirkungen haben¹⁸. Die natürliche Körperbarriere kann auch durch das Pathogen selbst durchbrochen werden. Ein Beispiel hierfür ist das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*, welches durch verschiedene Mechanismen die alveoläre Schutzfunktion durchbrechen und somit eine Pneumonie auslösen kann¹⁹.

Ist eine bakterielle Translokation erfolgt, verursacht diese zunächst eine lokal begrenzte Infektion. Diese Begrenzung wird dadurch gewährleistet, dass das Immunsystem eine Balance zwischen lokaler proinflammatorischer und systemischer antiinflammatorischer Reaktion aufrechterhält. Im Rahmen der Sepsis ist dieses Zusammenspiel allerdings gestört und führt zu einem generalisierten pro- und anschließend antiinflammatorischen Zustand²⁰.

Einleitung

Die Erkennung des Pathogens erfolgt durch Zellen des angeborenen Immunsystems. Diese exprimieren auf ihrer Oberfläche Rezeptoren zur Erkennung verschiedener Muster, sogenannte „Pattern-Recognition Receptors“ (PRRs)²⁰. Die Aktivierung dieser Rezeptoren kann durch verschiedene Liganden erfolgen. Zum einen spielen bei Infektionen die Pathogen-associated Molecular Patterns (PAMP) eine Rolle. Dies sind beispielsweise Lipopolysaccharide an der Zellwand von Bakterien, aber auch Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid, DNA) und Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid, RNA) bakteriellen oder viralen Ursprungs. Die PRRs können jedoch auch durch Damage-associated Molecular Patterns (DAMP) aktiviert werden. DAMPs stellen körpereigene Moleküle dar, die bei Beschädigung der Zellen freigesetzt werden und dann als Liganden der PRRs fungieren. Diese Beschädigung kann durch Traumata oder Operationen ausgelöst werden, wodurch zum Beispiel freie Nukleinsäuren in den Blutkreislauf gelangen und als DAMPs agieren²¹.

Durch beide Wege der Aktivierung der PRRs wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, die zu einem Ausstoß von Zytokinen führt, welche wiederum weitere Zytokine, Chemokine, Radikale und prokoagulatorische Substanzen freisetzen. Dieser sogenannte Zytokinsturm mit eigener positiver Rückkopplung führt dazu, dass zunächst lokale Infektionen beziehungsweise lokal begrenzte Operationen eine systemische Inflammationsreaktion zur Folge haben¹⁸. Diese immunologischen Reaktionen auf die initial lokale Infektion wurden vor der Sepsis-3-Definition als SIRS berücksichtigt (Tabelle 1). Der Zytokinsturm endet darin, dass es zu einer Erschöpfung des Immunsystems kommt.

Parallel zu dieser ausgeprägten proinflammatorischen Reaktion kommt es als Kompensationsmechanismus zum Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS), das mit einer Immunsuppression vergleichbar ist. In dieser Phase werden antiinflammatorische Zytokine und Antagonisten zu den proinflammatorischen Zytokinen gebildet. Zusätzlich werden epigenetische Mechanismen aktiviert, die proinflammatorische Zellreihen reduzieren und regulatorische, immunsupprimierende Zellreihen vermehrt exprimieren¹⁸. Diese Reaktionen des Körpers führen dazu, dass ein Gegengewicht zur proinflammatorischen septischen Reaktion entsteht. Jedoch hält die Phase des CARS längere Zeit an, auch wenn die akute Sepsis bereits überstanden ist. Dadurch entsteht ein Ungleichgewicht in der Aktivität des Immunsystems hin zu einer

Einleitung

Immunsuppression. In dieser Phase sind Patienten dementsprechend besonders anfällig für sekundäre Infektionen, die oftmals zu weiteren Komplikationen führen und für viele Patienten letal sind²². Arens et al. zeigten in ihrer Studie zudem, dass das angeborene und erworbene Immunsystem bei Patienten, die eine schwere Sepsis überlebt haben, auch langfristig Alterationen aufweist, welche mit einer höheren Inzidenz an klinischen Infektionen assoziiert ist. Zudem litten diese Patienten gehäuft unter Infektionen, die insbesondere für immunsupprimierte Patienten typisch sind²³.

1.3.2 Mechanismen der septischen Koagulopathie

Aufgrund ihrer vielen Interaktionen sind Gerinnungs- und Immunsystem untrennbar miteinander verknüpft, so dass der Begriff der Immunhämostase geprägt wurde²⁴. In der Sepsis unterliegt die Gerinnung daher analog den Phasen der dynamischen Immunreaktion pathophysiologischen Veränderungen.

Ein wichtiger Aktivator der Gerinnung stellt der Tissue Factor dar, welcher auf vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert wird. Im intakten Organismus hat der zellgebundene vaskuläre Tissue Factor keinen Kontakt zum Blut und den darin enthaltenen Gerinnungsfaktoren²⁵. Durch die inflammatorische Reaktion und die damit einhergehenden zell- und endothelschädigenden Prozessen in der Sepsis wird die Integrität des Epithelverbands von Blutgefäßen großflächig gestört, so dass es zu einer weiteren endothelialen Barrierestörung, dem sog. „capillary leak“, kommt²⁶. Dies ermöglicht einen Kontakt vom Tissue Factor zum Blut und führt über den Faktor VII und Faktor X zu einer Aktivierung der Gerinnung²⁷. Auch das Immunsystem trägt über Monozyten, die in Kontakt mit einem Pathogen gekommen sind und dadurch Tissue Factor exprimieren, wesentlich zur erhöhten Blutkonzentration des Tissue Factors bei²⁸. Diese Vorgänge führen zu einer vermehrten Entstehung von Thromben, die sich im Kapillarsystem der Organe festsetzen können und somit die Organfunktion verschlechtern oder sogar ein vollständiges Organversagen verursachen können. Durch die verminderte Organperfusion kommt es im Sinne eines Circulus vitiosus zu einer weiteren Stase und konsekutiven koagulatorischen Aktivierung. Infolgedessen überwiegt der Verbrauch gegenüber der Reproduktion der Gerinnungsfaktoren, so dass es zu einem

Einleitung

Ungleichgewicht und einem Mangel an Gerinnungsfaktoren kommt. Man spricht dann vom Krankheitsbild der disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC), bei der also das paradoxe Bild von Thromben und Blutungen (zum Beispiel in Form von Petechien) zur gleichen Zeit vorliegt²⁹.

1.3.3 Mechanismen zur Freisetzung von Nukleinsäuren im Rahmen der Sepsis

In der Sepsis kommt es oft in großem Ausmaß zum Zelluntergang, was zur Freisetzung von Nukleinsäuren, beispielsweise in Form von zellfreier DNA (cellfree DNA, cfDNA) und extrazellulärer RNA (exRNA), in die Blutbahn führt. Die wichtigsten hier zu erwähnenden Prozesse, die den Zelltod auslösen und somit zu einer Erhöhung der Nukleinsäurekonzentration im Plasma beitragen, sind die Apoptose, die Nekrose und die NETose.

Bei der Apoptose handelt es sich um einen programmierten Zelltod. Dieser kann durch einen intrinsischen oder extrinsischen Impuls induziert werden. Der intrinsische Auslöser können beispielsweise oxidativer Stress oder Schäden in der DNA der Zelle sein. Der extrinsische Weg wird rezeptorvermittelt induziert, zum Beispiel durch zytotoxische T-Lymphozyten³⁰. Bei der Apoptose wird die Zelle fragmentiert und es bleiben apoptotische Partikel übrig, die von Phagozyten aufgenommen werden. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass auch bei diesem Prozess ein Teil der Nukleinsäuren in die Blutbahn abgegeben wird³¹. Die Apoptose kann physiologisch beispielsweise im Rahmen der Differenzierung des Immunsystems stattfinden.

Nekrotischer Zelluntergang ist häufig durch lokale Hypoperfusion und Hypoxie bedingt. Eine lokale Hypoxie kann im Rahmen der Sepsis beispielsweise wie zuvor beschrieben durch Thromben im kapillären Endstromgebiet verursacht werden. Im Gegensatz zur Apoptose ist diese Art des Zelltods unreguliert und bei diesem Prozess können größere Zellverbände untergehen. Beim nekrotischen Zerfall werden sowohl die Zellorganellen mitsamt dem Zellkern als auch die Zellwand beschädigt, so dass Nukleinsäuren

Einleitung

freigesetzt werden. Das Zytoplasma mit den darin enthaltenen Bestandteilen gelangt dadurch in das umliegende Gewebe, was eine zusätzliche Inflammation verursacht³⁰.

Auch das Immunsystem kann eine Quelle freier Nukleinsäuren sein. Im Rahmen der proinflammatorischen Reaktion des Immunsystems kann es zu Gewebsschäden und sogar zum Organversagen kommen²⁶. Hierbei spielen die neutrophilen Granulozyten eine entscheidende Rolle, da sie einen wichtigen Teil der initialen Immunantwort darstellen³². Sie phagozytieren Bakterien („intrazelluläre Abwehr“) oder bekämpfen mittels Freisetzung von Zellbestandteilen Pathogene mit konsekutiver Aktivierung des Immunsystems („extrazelluläre Abwehr“). Bei der extrazellulären Bekämpfung besitzen die Granulozyten wiederum zwei Möglichkeiten, die beide dazu führen können, dass Nukleinsäuren in die Blutbahn freigesetzt werden. Die erste Möglichkeit ist die NETose, bei der sich freigesetzte Neutrophil Extracellular Traps (NETs) bestehend aus Chromatinfäden im Gefäßsystem unter anderem mit Thrombozyten zu netzartigen Strukturen verbinden, mit welchen sie die Pathogene „einfangen“ („*bacterial trapping*“)³³. Aufgrund des Einfangens von Thrombozyten kommt es in diesem Rahmen neben einer starken Aktivierung des Immunsystems auch zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems. Bei der NETose unterscheidet man zusätzlich zwischen zwei Formen. Bei der vitalen NETose bleibt die Zellintegrität bewahrt und das Chromatin wird in Vesikeln durch Exozytose ausgeschieden. Im Rahmen der suizidalen NETose erfolgt hingegen der Zelltod des Granulozyten durch Auflösen der Zellwand und Ausschüttung des Chromatins, wobei es ebenfalls zur Freisetzung von Nukleinsäuren kommt³⁴.

Die zweite Möglichkeit der neutrophilen Granulozyten zur extrazellulären Bekämpfung von pathogenen Keimen ist im Rahmen des „*Respiratory Burst*“ ihre Granula zu entleeren. In diesen Granula sind Sauerstoffradikale und Enzyme enthalten, die bakterizid wirken³⁰. Allerdings ist dieser Inhalt nicht nur spezifisch für Bakterien schädlich, sondern führt auch zur Beschädigung des umliegenden Gewebes²⁶. Auch dieser Zellschaden resultiert in freien Nukleinsäuren im Plasma.

1.4 Herausforderung Sepsis nach großen abdominalchirurgischen Eingriffen

Die chirurgisch bedingte Sepsis hebt sich durch einige Besonderheiten von anderen Formen der Sepsis ab. Das Risiko einer Infektion ist bei einer abdominalen Operation durch unterschiedliche Faktoren per se erhöht³⁵. In einer prospektiven Studie stellte das National Surgical Quality Improvement Project fest, dass bei mehr als 360 000 untersuchten Patienten nach einer abdominal-chirurgischen Operation die Inzidenz des septischen Schocks um das 8-fache und die Inzidenz der Sepsis sogar um das 11,5-fache höher war im Vergleich zur Inzidenz eines Myokardinfarkts bei diesem Patientenkollektiv. Auch die 30-Tage-Letalität war unter den septischen Patienten verglichen mit den untersuchten Patienten, die postoperativ einen Myokardinfarkt oder eine Lungenembolie erlitten, erhöht³⁶.

Die Gefahr einer Sepsis ist in der Abdominalchirurgie insbesondere aufgrund der Gefahr einer bakteriellen Translokation aus dem Darm erhöht³⁷. Dieser Begriff bezeichnet den Transfer von Pathogenen in Körperkompartimente, in denen sie Infektionen auslösen können. Dies sind meist Bakterien der natürlichen Darmflora, die ins Peritoneum gelangen und dort eine Infektion verursachen. Im Gebiet der abdominalen Pathologien und deren operativer Versorgung ist die bakterielle Translokation zu drei Zeitpunkten möglich. Exemplarisch kann man diese Zeitpunkte am Krankheitsbild der Sigmadivertikulitis darstellen. Präoperativ kann eine Translokation durch eine erhöhte Permeabilität der Darmwand („*capillary leak*“) aufgrund des inflammatorischen Prozesses erfolgen oder bei der schweren Komplikation einer perforierten Sigmadivertikulitis. Als periprozedurale Komplikationen können sich Translokationen zudem intraoperativ durch Kontamination oder postoperativ aufgrund einer Anastomoseninsuffizienz ereignen und so zu einer Peritonitis mit anschließender Sepsis führen³⁸. Ist eine Translokation erfolgt, wird das Pathogen, wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, durch PAMPs erkannt und über PRRs eine Signalkaskade zur Zytokinausschüttung induziert, die zunächst eine lokale Inflammation auslöst, sich jedoch zu einem SIRS und einer Sepsis entwickeln kann.

Einleitung

Postoperativ kann sich allerdings auch ohne bakterielle Translokation ein steriles SIRS entwickeln. Durch den operativen Eingriff entsteht ein großer Zellschaden, wodurch freie Nukleinsäuren und andere Alarmine ins Plasma gelangen³⁹. Diese leiten über die Aktivierung durch DAMPs eine inflammatorische Signalkaskade ein, wie bei Erkennung eines Pathogens⁴⁰. Durch die Inflammation entstehen wiederum erneut Alarmine, was im Sinne einer positiven Rückkopplung die Reaktion verstärkt.

In der intensivmedizinischen Versorgung abdominal-chirurgischer Patienten ist die Differenzierung eines sterilen SIRS von einer Sepsis deshalb besonders herausfordernd. Da aber die frühe Erkennung und Behandlung einer Sepsis entscheidend für die Prognose der Patienten ist, ist diese allerdings von großer Bedeutung.

1.5 Diagnostik der Sepsis

Die frühe Diagnose der Sepsis stellt auch erfahrene Ärzte vor Schwierigkeiten. Es ist vor allem eine klinische Diagnose durch verschiedene Symptome (siehe Definition in Kapitel 1.1), denn es gibt kein Kardinalsymptom, keine spezifischen Tests oder Blutparameter, mit denen man explizit eine Sepsis diagnostizieren kann. Hinzu kommt die Schwierigkeit der bereits erwähnten Abgrenzung zum postoperativen sterilen SIRS. Im klinischen Alltag wird zur Diagnostik einer Infektion insbesondere auf laborchemische Parameter zurückgegriffen. Die am weitesten verbreiteten Werte zur Beurteilung einer Entzündungsreaktion sind die Anzahl der Leukozyten, das C-reaktive Protein (CRP) und das Procalcitonin (PCT). Analog zur klinischen Reaktion mit Entwicklung eines sterilen SIRS sind jedoch auch diese Parameter durch einen großen chirurgischen Eingriff beeinflusst, ohne dass eine Infektion vorliegen muss^{41,42}. Diese klassischen laborchemischen Entzündungsparameter sind somit postoperativ stets erhöht und geben keinen klaren Hinweis auf eine Infektion oder eine beginnende Sepsis. Die postoperative Maskierung der klinischen Symptome einer Sepsis setzt sich somit durch die laborchemische Maskierung einer Infektion fort und erschwert zusätzlich die frühe Diagnosestellung einer Sepsis. Es bedarf daher neuer Sepsis-spezifischer Biomarker, um die Differenzierung eines sterilen SIRS von einer beginnenden Sepsis zu ermöglichen und septischen Patienten eine frühe und adäquate Therapie zukommen zu lassen.

Einleitung

Bei einer zeitkritischen Diagnose wie der Sepsis sind schnelle Ergebnisse prognose- und therapieentscheidend. Die schnellsten diagnostischen Ergebnisse kann man mittels einer Point-of-Care-Diagnostik erlangen. Hierzu gehören unter anderem die in dieser Studie genutzten Messverfahren der Rotationsthrombelastometrie ROTEM® und des Thrombozytenaggregationstests Multiplate®, die bereits nach wenigen Minuten erste Ergebnisse zur Beurteilung des Gerinnungssystems und der Thrombozytenfunktion liefern. Durch die Interpretation dieser Ergebnisse kann der Ursprung einer Gerinnungsstörung, beispielsweise ein Mangel an Gerinnungsfaktoren oder eine antithrombozytäre Therapie erkannt und der Patient anschließend schnell und gezielt behandelt werden. Diese schnelle Erkenntnis ist bei der Sepsis durch die dynamischen Veränderungen in der Gerinnung und der Gefahr des DIC von besonderer Relevanz. In anderen Studien konnte die Nützlichkeit dieser beiden Messsysteme im Zusammenhang mit der Sepsis und des SIRS bereits festgestellt werden, weshalb diese beiden Verfahren in dieser Studie zum Einsatz kamen^{43,44}. Für die spezifische Früherkennung der Sepsis existieren solche Point-of-Care Geräte bisher nicht.

1.6 Grundlagen der Sepsis-Therapie

Zur Therapie der Sepsis veröffentlicht die Surviving Sepsis Campaign regelmäßig Empfehlungen, die an den aktuellen Stand der Wissenschaft angepasst sind. Im Juni 2018 publizierten Levy et al. eine Empfehlung für die wichtigsten diagnostischen und therapeutischen Schritte, die in der ersten Stunde nach der klinischen Diagnosestellung einer Sepsis vollzogen werden sollten, das sogenannte „hour-1 bundle“⁴⁵. Die während der Dissertation geltenden Empfehlungen sind mit den aktualisierten Leitlinien von 2021 zum Teil überholt, es gilt jedoch weiterhin im Falle einer Sepsis oder eines septischen Schocks eine frühe und zielgerichtete Therapie zu initiieren⁸.

Grundsätzlich orientiert sich die Sepsis-Therapie an vier Säulen, die im Folgenden erläutert werden. Die erste Säule ist die supportive Therapie, deren Ziel es ist die Hämodynamik des Patienten zu stabilisieren und somit eine ausreichende Organperfusion sicherzustellen⁸. Es gilt mittels Volumensubstitution und Katecholamintherapie eine verminderte Organperfusion zu beheben. Die aktuelle Leitlinie von 2021 empfiehlt

Einleitung

hierbei als wesentliche Neuerung als Orientierungsparameter die periphere Rekapillarisierungszeit⁸. Der zuvor primär als Orientierung der Volumentherapie genutzte Surrogatparameter einer Laktatämie findet sich weiterhin in der Leitlinie, jedoch zeigte die ANDROMEDA SHOCK-Studie von Hernandez et al., dass die Rekapillarisierungszeit effektiver war als die Laktatmessung. Zudem zeigten die Patienten mit Nutzung der Rekapillarisierungszeit als Orientierungsparameter in dem beobachteten Zeitraum eine signifikant niedrigere Rate an Organdysfunktionen und eine niedrigere 28-Tage Mortalität^{45,46}.

Die zweite Therapiesäule beinhaltet den Beginn einer antibiotischen Therapie, die ein breites Keimspektrum abdeckt⁸. Die antibiotische Therapie sollte nach der Tarragona-Strategie mit dem Leitsatz „*hit hard and early*“ und unter Beachtung der begleitenden Umstände, beispielsweise einer zuvor bereits erhaltenen antibiotischen Therapie, etabliert werden^{47,48}. Hier empfiehlt die aktuelle Leitlinie den Beginn der empirischen antibiotischen Therapie beim septischen Schock innerhalb der ersten Stunde⁸. Beim Verdacht einer Sepsis sollte zunächst die Diagnose gesichert werden, die antibiotische Therapie sollte hier innerhalb von drei Stunden initiiert werden. Diese Differenzierung im Vorgehen zwischen Sepsis und septischem Schock fehlte in den vorherigen Leitlinien und entsprechend im „hour-1 bundle“⁴⁵. Gelingt im weiteren Verlauf der Therapie ein Keimnachweis, sollte eine resistogrammgerechte Fokussierung der antibiotischen Therapie erfolgen⁸.

Die Kontrolle und Sanierung des Infektfokus stellt als dritte Säule der Sepsistherapie insbesondere bei postoperativen Patienten ein wichtiges Therapieziel dar, denn die Mortalität der Patienten ist bei Verzögerung der Fokussanierung signifikant höher^{8,49,50}. Getreu dem Leitspruch „*Ubi pus, ibi evacua*“ ist nicht nur das Drainieren von Abszessen zeitnah durchzuführen, sondern auch infiziertes Gewebe muss debrediert werden, wenn dies den Infektfokus darstellt.

Die vierte Therapiesäule ist eine zusätzliche adjuvante Therapie. Ansätze zur Immunmodulation oder Optimierung der Gerinnungssituation sind im Fokus der Forschung, es konnte jedoch bisher kein signifikanter Effekt auf die Mortalität septischer Patienten festgestellt werden. Einzig bei Patienten mit septischem Schock und anhaltendem Katecholaminbedarf ist eine intravenöse Therapie mit Kortikosteroiden empfohlen⁸.

1.7 Biomarker und Relevanz von frei zirkulierenden Nukleinsäuren im Rahmen der Sepsis

Wie zuvor beschrieben existieren bereits viele Erkenntnisse zum Themenkomplex der Sepsis, gleichzeitig sind jedoch weiterhin viele Fragen offen. Es mangelt weiterhin an einer suffizienten Methode zur Früherkennung der Sepsis, insbesondere im Hinblick auf die Diskriminierung zum postoperativen SIRS. Zudem werfen pathophysiologische Prozesse der Sepsis wie zum Beispiel die Pathophysiologie der septischen Koagulopathie weiterhin Fragen auf und sind noch nicht in Gänze verstanden.

In Kapitel 1.5 wurde bereits auf die Einschränkungen zur Diagnostik der Sepsis eingegangen. Es besteht kein spezifischer Parameter zur Diagnosestellung einer Sepsis, so dass die Diagnose aus einer Kombination von verschiedenen Parametern gestellt wird. Insbesondere der klinische Zustand des Patienten ist hier relevant, welcher durch den Zustand des postoperativen SIRS jedoch nur begrenzt verwertbar für die Diagnose der Sepsis ist. Die laborchemischen Parameter CRP und PCT können bedingt zur Diagnosestellung helfen, sie werden jedoch durch verschiedene andere Prozesse im Körper beeinflusst. Die Höhe des PCT ist wesentlich vom Erreger abhängig, eine Infektion mit *E. coli* verursacht beispielsweise eine deutlich höhere Konzentration des PCT als eine Kandidasepsis⁵¹. Auch spielen Begleiterkrankungen wie eine Leberzirrhose eine wesentliche Rolle bei der Konzentration des PCT, was entsprechend zu einer Einschränkung der Beurteilbarkeit führt^{52,53}. Eine Erhöhung des PCT ist somit insbesondere von therapeutischer Relevanz, wenn das klinische Bild der Patienten auch zu einer Infektion passt. Auch zeigten Heyland et al., dass eine repetitive PCT Bestimmung die Dauer der antibiotischen Therapie einer Sepsis reduzieren konnte und somit zur Beurteilung des Therapieerfolgs dienen kann⁵⁴.

Insbesondere bei Patienten nach großen chirurgischen Eingriffen können CRP und PCT im Rahmen einer postoperativen Reaktion erhöht sein^{41,42}. So zeigten die Untersuchungen von Welsch et al., dass die Erhöhung des postoperativen CRP sich erst am fünften Tag nach der Operation normalisiert. Daher sollte erst bei persistierend erhöhten CRP Werten eine weiterführende Diagnostik erfolgen⁴².

Einleitung

Zudem konnten Parlato et al. darstellen, dass eine Messung von CRP und PCT keinen relevanten Vorteil in der Unterscheidung der Diagnosen zwischen postoperativem SIRS und Sepsis im Vergleich zur alleinigen Messung des CRP erbrachte⁵⁵.

Um herauszufinden, ob freien Nukleinsäuren eine relevante Rolle als diskriminativer Biomarker zukommen könnte, stehen diese im Fokus dieser Studie. In den vorangegangenen Kapiteln wurde bereits dargestellt, dass im Rahmen der Sepsis multiple Quellen zur Freisetzung freier Nukleinsäuren in die Blutbahn existieren. So führt bei der Sepsis die pathologische Antwort des Wirts mittels überschießender Immunreaktion zur Freisetzung von Nukleinsäuren und zu einem erhöhten Thromboserisiko⁵⁶. Dies geschieht bei sämtlichen bereits in Kapitel 1.3.3 aufgeführten Prozessen, welche zur Freisetzung von Nukleinsäuren führen, sowohl im Bereich der Sepsis als auch bei sterilen Traumata mit einhergehendem SIRS. Begleitend hierzu gelangen auch mitochondriale Nukleinsäuren in die Blutbahn, welche aufgrund des bakteriellen Ursprungs der Mitochondrien ein zusätzlicher Verstärker für das Immunsystem sind^{57,58}.

Es existieren bereits Studien, die freie Nukleinsäuren als diagnostisches Kriterium einer Sepsis untersuchten. Jedoch untersuchte keine dieser Studien, ob man freie Nukleinsäuren auch zur Differenzierung zwischen Patienten mit postoperativem SIRS und Patienten mit einer Sepsis nutzen kann^{21,59-62}. Vorangegangene Studien zeigten daneben, dass bei septischen Patienten eine erhöhte Plasmakonzentration von freien Nukleinsäuren mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate assoziiert ist, was darauf schließen lässt, dass freie Nukleinsäuren eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis spielen^{59,63-65}. Hier könnten wichtige Erkenntnisse zu freien Nukleinsäuren als diskriminative und prognostische Biomarker gewonnen werden.

Im Rahmen der Pathophysiologie spielen freie zirkulierende Nukleinsäuren eine wichtige Rolle in der Immunhämostase^{64,66}. So sind sie immunologisch wesentlich für den Mechanismus der NETs notwendig⁶⁷, gleichzeitig sind NETs durch das Aktivieren von Thrombozyten an der Aktivierung der Gerinnung beteiligt. *In vitro* Versuche zeigten zudem, dass die cfDNA die Gerinnung über den intrinsischen Weg aktivieren kann und auch einen Einfluss auf die Fibrinolyse hat⁶⁸. Dieser Effekt konnte *in vivo*, insbesondere bei Patienten mit einer Sepsis, allerdings noch nicht nachgewiesen werden.

Einleitung

Die Rolle der exRNA in der Sepsis ist noch nicht abschließend geklärt. Aber die aktuelle Studienlage lässt vermuten, dass sie einen ähnlichen Effekt hat wie die cfDNA^{69,70}. Sie konnte als Aktivator der Faktor-VII-aktivierenden Protease (FSAP) identifiziert werden, die ihrerseits einen wichtigen prokoagulatorischen Gerinnungsfaktor darstellt⁷¹.

Eine Gemeinsamkeit, die cfDNA und exRNA aufweisen, ist, dass beide Moleküle stark negativ geladen sind, was auf ihre Struktur mit einem Glukose-Phosphat-Gerüst zurückgeht⁵⁷. Diese Eigenschaft könnte eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung des Gerinnungssystems spielen.

Es existieren kaum Studien, die die Konzentration freier Nukleinsäuren bei Patienten nach abdominalchirurgischen Eingriffen mit septischen Patienten vergleichen. Auch der Einfluss freier Nukleinsäuren auf das Gerinnungssystem *in vivo* ist nicht ausreichend erforscht.

Somit war es Ziel dieser Studie zum einen den Status quo der Konzentrationen frei zirkulierender DNA und RNA zwischen diesen beiden Patientengruppen zu erfassen. Zum anderen sollten mögliche Zusammenhänge zwischen der Höhe der Konzentrationen der freien Nukleinsäuren und Beeinträchtigung des Gerinnungssystems analysiert werden. Zuletzt sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine Korrelation zwischen der Konzentration der Nukleinsäuren und dem Ausmaß der Endorganschäden beziehungsweise der Sterblichkeitsrate besteht. Hierfür wurden die im Folgenden benannten Fragestellungen erarbeitet.

1.8 Fragstellungen

Um den *in vivo* Einfluss der cfDNA und exRNA auf die Blutgerinnung während der Sepsis und der Abdominalchirurgie sowie ihre Rolle als diskriminativen Biomarker zu untersuchen, wurden folgende Hypothesen formuliert, welche im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit bewiesen oder widerlegt werden sollen.

- I. Die Menge an freien Nukleinsäuren ist im Plasma septischer Patienten im Vergleich zu postoperativen Patienten und gesunden Probanden erhöht.
- II. Die Menge an freien Nukleinsäuren korreliert mit dem Schweregrad der vorliegenden Gerinnungsstörung.
- III. Je höher die Menge an freien Nukleinsäuren, desto höher ist die Stabilität der Gerinnsel.
- IV. Die Menge an freien Nukleinsäuren korreliert mit der Schädigung von Leber und Niere der Patienten.
- V. Eine persistierend erhöhte Menge an Nukleinsäuren im Verlauf stellt einen negativ prognostischen Faktor dar.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Bei dieser Studie handelt es sich um eine prospektiv-beobachtende, monozentrische Studie der anästhesiologischen Abteilung am Universitätsklinikum Gießen und Marburg (Standort Gießen). Sie fand im Zeitraum zwischen Oktober 2013 und April 2014 statt. Gemäß Studienplan wurden Patienten für drei Studiengruppen rekrutiert. Alle Patienten und gesunde Probanden wurden über die Studie aufgeklärt und stimmten der Teilnahme schriftlich zu. Falls die gesundheitliche Situation eines Patienten eine Aufklärung nicht zuließ, war entsprechend der Vorgaben der Ethikkommission eine konsiliarische Bestätigung der Nicht-Einwilligungsfähigkeit durch einen unabhängigen Arzt sowie in der Folge eine Zustimmung des gesetzlichen Betreuers Voraussetzung für den Einschluss in die Studie. Es wurden nur Patienten über 18 Jahren und ohne bestehende Schwangerschaft untersucht. Die erste Studiengruppe umfasste Patienten, die an einer Sepsis litten (n=15), welche das Zielkollektiv darstellte. Patienten aus dieser Studiengruppe mussten die Sepsiskriterien der Surviving Sepsis Campaign aus dem Jahre 2012 erfüllen⁵, die Diagnosestellung der Sepsis durfte bei Einschluss nicht älter als sechs Stunden sein. Weiterhin wurden Patienten nach einer großen abdominalchirurgischen Operation (n=10) und gesunde Probanden (n=10) als Vergleichskollektive untersucht. Zu den Ausschlusskriterien gehörte unter anderem das Bestehen einer Erkrankung mit systemischer Entzündung, zum Beispiel eine Autoimmunerkrankung. Die vollständigen Ein- und Ausschlusskriterien sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Den septischen und den postoperativen Patienten wurde an vier Zeitpunkten jeweils 12,9 ml Blut (7,5 ml EDTA, 2,7 ml Citrat, 2,7 ml Hirudin) abgenommen: bei Einschluss in die Studie (t_1), 24 (t_2), 72 (t_3) und 168 Stunden (t_4) nach Einschluss. Bei den gesunden Probanden erfolgte lediglich eine Blutentnahme der gleichen Menge nach Einschluss in die Studie, die Messungen dieser Blutentnahme wurden als Vergleichswerte für die Messzeitpunkte t_1 , t_2 , t_3 und t_4 genutzt. Die erste Blutentnahme bei den postoperativen Patienten erfolgte zeitnah nach der Operation. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Konzentrationen von cfDNA und exRNA bestimmt, Parameter des Routinelabors erfasst, eine ROTEM[®]- und Multiplate[®]-Messung durchgeführt und klinische Daten dokumentiert.

	gesunde Probanden	Patienten mit großer OP	Studienkollektiv
Einschlusskriterien	Alter > 18 Jahre	Alter >18 Jahre UND Abschluss einer großen abdominalchirurgischen OP: <ul style="list-style-type: none"> • Pankreasresektionen • Hemihepatektomie • Ösophagusresektion • kolorektale Resektionen • erweiterte Magenresektionen 	Alter > 18 Jahre UND 1. SIRS mind. 2 Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> • Temperatur > 38°C oder < 36°C • Tachykardie > 90 / min • Leukozytose > 12.000 oder < 4.000 (/µl) • Respiratorische Insuffizienz UND 2. klinischer Nachweis einer viralen, fungalen oder bakteriellen Infektion
			Ausschlusskriterien
allgemein	<ul style="list-style-type: none"> • Nichterfüllung der Einschlusskriterien • Schwangerschaft • Diagnostizierte Autoimmunerkrankung (z.B. Morbus Crohn, multiple Sklerose, Lupus erythematodes) • Infektiöse virale Erkrankungen (HIV-Infektion, Hepatitis A/B/C) • Polytraumatisierung 		

Tabelle 3 Darstellung der Ein- und Ausschlusskriterien der drei Studienkollektive.

Abk.: HIV = *Humanes Immundefizienz-Virus*

2.2 Ethikvotum, Einwilligung der Patienten und Pseudonymisierung

Die Studie wurde von der Ethikkommission in ihrer Sitzung am 19.07.2012 unter dem Aktenzeichen 100/12 bewilligt. Ferner wurde von der Kommission entschieden, dass bei Patienten, die zum ersten Messzeitpunkt nicht einwilligungsfähig sind, die erste Probe auf Grund des minimalen Risikos ohne Einwilligung abgenommen und analysiert werden durfte. Die Ergebnisse durften allerdings nur verwertet werden, wenn eine Einwilligung des gesetzlichen Betreuers des Patienten folgte.

Die Aufklärung über die Studie wurde von einer approbierten Ärztin oder einem approbierten Arzt durchgeführt. Die Einwilligung zur Teilnahme an der Studie erfolgte, unter Berücksichtigung der Maßgabe der Ethikkommission, vom Patienten selbst oder bei einwilligungsunfähigen Patienten vom gesetzlich bestimmten Betreuer. Alle Probanden bekamen bei Einschluss in die Studie eine Patienten-ID und wurden somit vollständig pseudonymisiert.

2.3 Methodik

2.3.1 Blutentnahmen

Die Blutentnahmen erfolgten unter keimarmen Bedingungen, möglichst über einen bereits vorhandenen Gefäßkatheter. Falls dieser nicht vorhanden war, wurde die Entnahme peripher-venös durchgeführt.

2.3.2 Gerinnungsanalyse

Zur Beurteilung der Gerinnung der Probanden wurden, zusätzlich zu den Routinegerinnungsparametern (Quick, International Normalized Ratio [INR], aktivierte partielle Thromboplastinzeit [aPTT]), die Rotationsthrombelastometrie (ROTEM[®], TEM International GmbH, München, Deutschland) und die Thrombozytenaggregometrie (Multiplate[®], Roche Diagnostics International Ltd, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) genutzt.

2.3.2.1 Rotationsthrombelastometrie

2.3.2.1.1 Messprinzip

Sowohl das Blut des Patienten als auch die benötigten Reagenzien werden mithilfe des Geräteprogramms in die Messküvetten pipettiert, welche in Küvettenhaltern fixiert sind. Diese Küvettenhalter sind durchgehend auf 37° Celsius erwärmt, um die Reaktion unter physiologischen Bedingungen zu ermöglichen. Sobald alle Reagenzien dem Blut hinzugefügt wurden und die Reaktion startet, wird ein zylindrischer Stempel in die befüllte Küvette getaucht. Der Stempel ist fest verbunden mit dem Stempelsensor, welcher mit Hilfe einer elastischen Feder in der Längsachse um 4,75° jeweils nach links und nach rechts rotiert. Aufgrund des geringen Abstands von nur 1 mm zwischen Küvetteninnenwand und Stempel entsteht ein mechanischer Widerstand, sobald die Blutgerinnung in der Probe einsetzt. Diese Veränderung im Rotationsverhalten des Stempels wird durch einen Detektor registriert und aufgezeichnet. Grafisch wird dies als Diagramm dargestellt, welches auf der horizontalen Achse den zeitlichen Verlauf von links nach rechts zeigt. Die vertikale Achse stellt die Amplitude der Gerinnselfestigkeit dar. Der Computer berechnet hieraus die für die Studie genutzten Messwerte: die Gerinnungszeit (Clotting Time, CT), die Gerinnselformierungszeit (Clot Formation Time, CFT), die maximale Gerinnselfestigkeit (Maximum Clot Firmness, MCF) und den Lyse-Index nach 60 min (LI). Die Bedeutung der einzelnen Messwerte sind Tabelle 4 zu entnehmen.

<u>Messwert</u>	<u>Bedeutung</u>
Gerinnungszeit (CT) in sec	Zeit von Beginn der Messung bis zum Einsetzen der Gerinnung
Gerinnselformierungszeit (CFT) in sec	Zeit ab dem Beginn der Gerinnung, bis eine Gerinnselfestigkeit von 20 mm erreicht ist
maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) in mm	Maximale mechanische Ausprägung des Gerinnselfests
Lyse-Index nach 60 min (LI) in Prozent	Abnahme der Gerinnselfestigkeit nach 60 min

Tabelle 4 Bedeutung der Messwerte nach Leitfaden ROTEM®-Analyse Calatzis et al. ⁷²

Abk.: CT = Clotting Time, CFT = Clot Formation Time, MCF = Maximum Clot Firmness, LI = Lyse Index

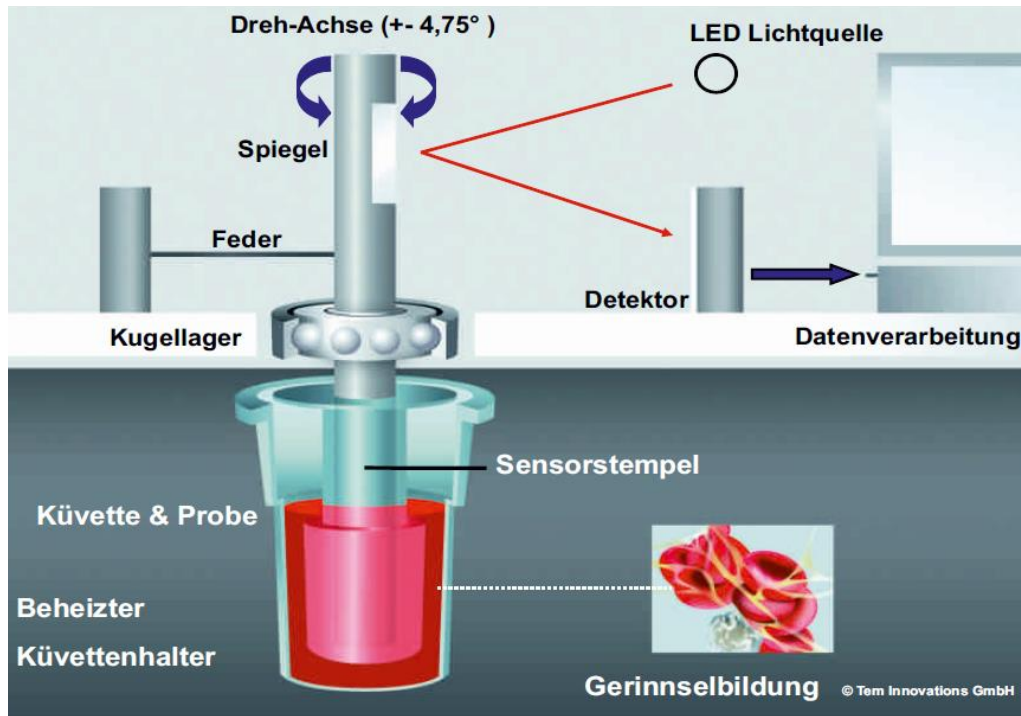


Abbildung 1 Messprinzip einer ROTEM[®]-Messung. Mit freundlicher Genehmigung von Instrumentation Laboratory, Bedford

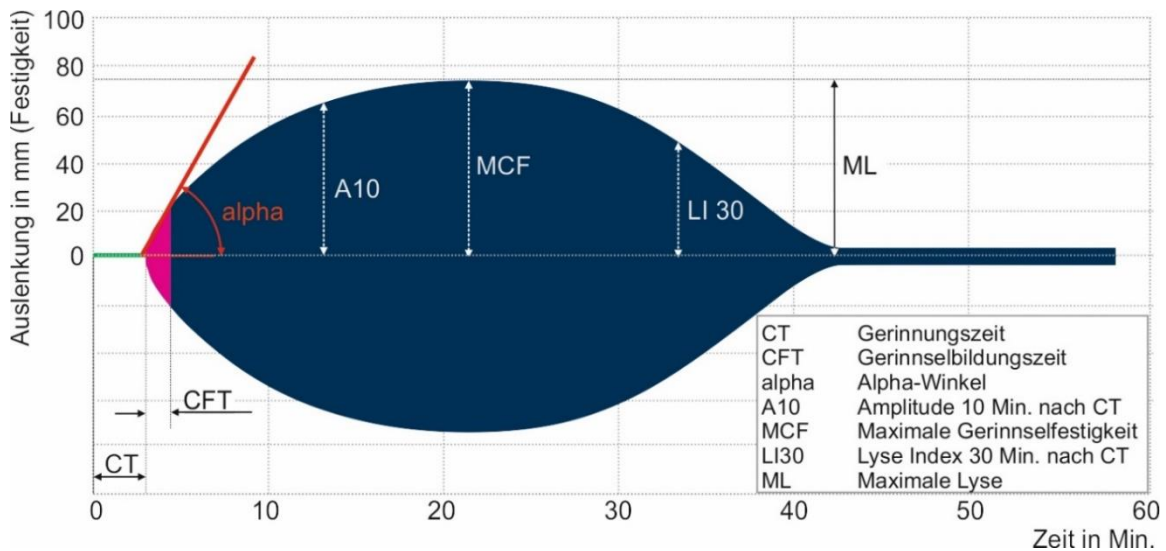


Abbildung 2 Beispiel einer ROTEM[®]-Messung. Mit freundlicher Genehmigung von Instrumentation Laboratory, Bedford

Material und Methoden

Das ROTEM® delta-Gerät besitzt vier Kanäle, es ist somit möglich vier Messungen parallel durchzuführen. Da für diese Studie sechs Messungen pro Abnahmezeitpunkt notwendig waren, wurden zwei ROTEM® delta-Geräte genutzt. Hierdurch wurde gewährleistet, dass die notwendigen Messungen alle zeitnah zur Blutentnahme ablaufen konnten. Laut Herstellerangaben sind Messmethodik und -analyse beider genutzten Geräte identisch.

Es wurden für jeden Messzeitpunkt sechs unterschiedliche Messungen durchgeführt, die im Folgenden erläutert werden. Für alle Messungen wurde Citratblut eingesetzt, die Mindestmessdauer betrug 60 Minuten. Das Pipettierprogramm des Geräts zeigt dem Nutzer in einem Step-by-Step Verfahren an, welche Reagenzien für die jeweiligen Messungen benötigt werden.

Um eine durch endogene Faktoren aktivierte Gerinnung zu messen, wurde die NATEM-Messung durchgeführt („Nicht-aktivierte TEM“). Das Citratblut wird hierbei durch das hinzugefügte Reagenz rekalkifiziert. Die INTEM-Messung stellt die Aktivierung der Gerinnung über einen Fremdflächenkontakt dar, also den intrinsischen Gerinnungsweg. Bei Patienten mit Heparin-Therapie ist im INTEM eine verlängerte CT zu erkennen. Um hier den Heparin-Effekt aufzuheben und andere Gerinnungsstörungen auszuschließen, wird die HEPTM-Messung durchgeführt, in der als zusätzliches Reagenz die Heparinase zum Einsatz kommt. Im EXTEM zeigt sich die extrinsische Gerinnungsaktivierung durch Gewebsthromboplastin („Tissue Factor“). Mit dem Zusatz von Cytochalasin D zum EXTEM wird im FIBTEM die Thrombozytenaggregation gehemmt, wodurch die Entstehung des reinen Fibringerinnsels dargestellt wird. Gibt man dem EXTEM anstelle des Cytochalasin D Aprotinin hinzu, wird die Fibrinolyse gehemmt. Mit dieser APTEM-Messung lässt sich im direkten Vergleich zum EXTEM eine Hyperfibrinolyse detektieren.

2.3.2.2 Thrombozytenaggregometrie

2.3.2.2.1 Messprinzip

Die Thrombozytenaggregometrie (Multiplate[®]-Messung) erfasst die Thrombozytenfunktion und basiert auf der Erfassung von Impedanzveränderungen zwischen zwei Sensordrahnen, welche innerhalb der Messzelle in das mit Reagenzien versetzte Vollblut des Patienten getaucht sind. Falls im Verlauf der Messung das Gerinnungssystem aktiviert wird, setzt die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten an den Sensordrahnen ein. Dies führt zu einer Steigerung der Impedanz, welche kontinuierlich erfasst und grafisch dargestellt wird. Jede Messzelle besitzt zwei Pärchen der Sensordrahne, wodurch zwei Messungen parallel durchgeführt und dargestellt werden (roter und blauer Graph, Abbildung 3). Dadurch wird bei jeder Messung auch direkt eine Messkontrolle durchgeführt. Nach der Messung wird die Area under the Curve (AUC) angezeigt, welches ein Produkt aus den Aggregation Units (AU), also der maximalen Höhe der Kurve, und der gemessenen Zeit ist. Die AUC kann auch nur als Einheit U angegeben werden.

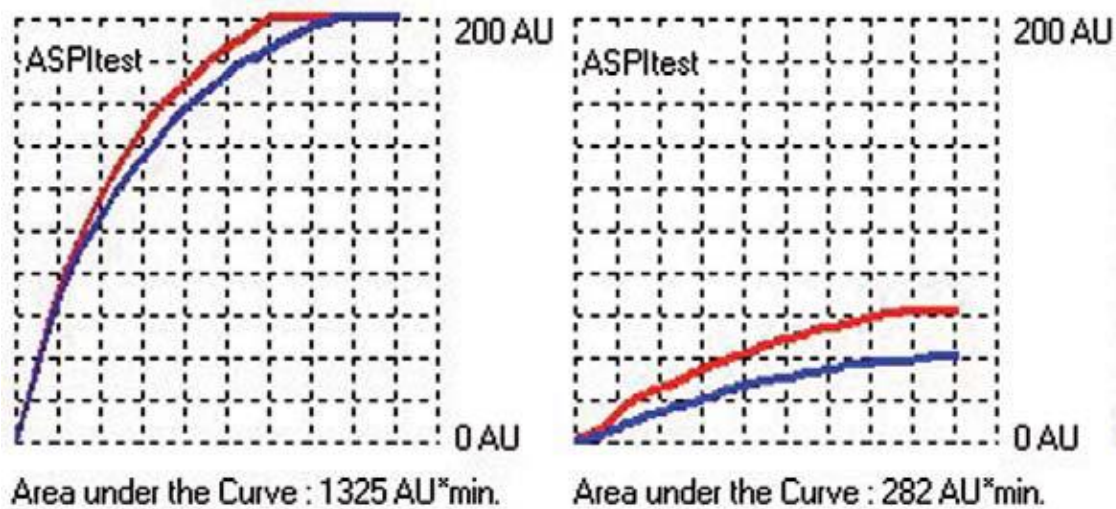


Abbildung 3 Beispiel einer Multiplate[®]-Analyse mit einem Normalbefund (links) und einer suffizienten Thrombozytenhemmung (rechts) unter Acetylsalicylsäure-Therapie; angepasst nach Gorlinger et al.⁷³

2.3.2.2.2 Ablauf der Messung

Nachdem die Messzellen in der Vorrichtung des Geräts positioniert und mit den Sensorkabeln verbunden wurden, werden mit Hilfe einer elektronischen Pipette 300 µl isotonische NaCl 0,9%-Lösung und 300 µl Hirudinblut in die Zelle gegeben. Darauf folgt eine Phase, in welcher die Temperatur der Mischung auf 37° C erwärmt, beziehungsweise gehalten wird, um den Test unter physiologischen Bedingungen durchführen zu können. Sobald diese Phase abgeschlossen ist, wird das jeweils notwendige Reagenz hinzugefügt und die Messung anschließend automatisch gestartet. Auch dieses Gerät verfügt über ein Step-by-Step Verfahren und zeigt dem Nutzer alle einzelnen Schritte an.

Die für diese Studie durchgeführten Tests untersuchen das Blut auf drei unterschiedliche Medikamentengruppen zur Hemmung der Thrombozytenaggregation. Mit dem ASPItest wird das Blut auf die Wirkung von Cyclooxygenasehemmer, mit dem ADPtest auf ADP-P2Y12-Rezeptorhemmer und mit dem TRAPtest auf GPIIb/IIIa-Rezeptorinhibitor untersucht. Nimmt ein Patient einen Thrombozytenaggregationshemmer ein, steigt im entsprechenden Test der Graph weniger an, was in einem niedrigeren AUC-Wert resultiert.

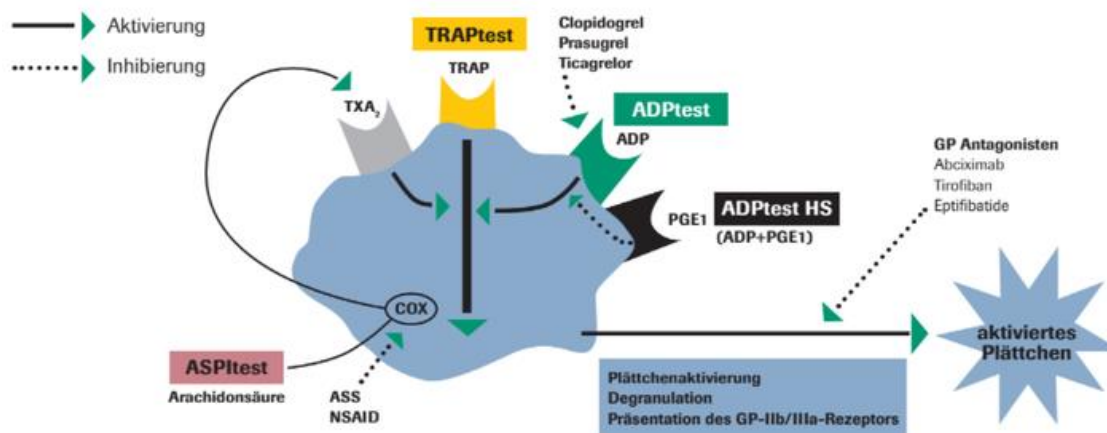


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Wirkmechanismen der unterschiedlichen Multiplate® Tests. Mit freundlicher Genehmigung von Roche Diagnostics Deutschland GmbH. Abk.: TRAP = Thrombin-Rezeptor-Aktivator, TXA₂ = Thromboxan A₂, ADP = Adenosindiphosphat, ASS = Acetylsalicylsäure, NSAID = Nichtsteroidales Antirheumatikum, PGE1 = Prostaglandin E1, GP = Glykoprotein

2.3.3 Isolation der Nukleinsäuren

Die Isolation der Nukleinsäuren erfolgte stets aus dem Plasma der EDTA-Blutprobe. Für die Trennung von Blutplasma und festen Blutbestandteilen wurde das Röhren 10 Minuten lang bei 1500 Relative Centrifugal Force (RCF) zentrifugiert (Minifuge RF, Heraeus, Deutschland). Hieraus wurden die notwendigen Mengen Plasma für die cfDNA- und exRNA-Isolation pipettiert und die restliche Menge Plasma zunächst in 100 µl Aliquots bei -20 °C eingefroren. Sobald beide Isolationen abgeschlossen waren, wurden die gelösten Nukleinsäuren und die restlichen Plasmaproben bei -80 °C eingefroren. Um einen reibungslosen Ablauf beider Isolationen sicherzustellen, ohne dass Proben für längere Zeiträume unbearbeitet blieben, wurden die Arbeitsprotokolle der Isolationsvorgänge kombiniert und somit parallel durchgeführt.

2.3.3.1 Isolation und Quantifizierung der cfDNA

Für die Isolation der cfDNA wurde das QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Produktnummer 51304, Qiagen, Venlo, Niederlande) genutzt. Laut Herstellerangaben ist hiermit die Isolation von reiner DNA der Größe von 200 bp bis zu 50 kbp möglich, welche anschließend für eine PCR nutzbar ist.

Die Isolation erfolgte aus 500 µl Plasma gemäß dem Herstellerprotokoll. Anschließend wurden 5 µl des Isolats genutzt um eine semiquantitative Quantifizierung der cfDNA mithilfe einer Realtime-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) zu bestimmen. Bei dieser RT-PCR wurde die TaqMan™ Methode mit einer Region des β-Globin-Locus als Ziel genutzt. Vor der ersten RT-PCR Messung wurde zunächst eine Standardkurve ermittelt, um anhand dieser Kurve die Konzentration in der Probe gegenzurechnen.

Für die Erstellung der Standardkurve wurden zwei Mal 5×10^6 Zellen der Zelllinie des Lungenepithelkarzinom (A-549) aus Passage 12 in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) genutzt. Aus diesen wurde jeweils mithilfe des QIAamp® DNA Blood Mini Kits die cfDNA isoliert. Die spektrophotometrische Quantifizierung und Qualitätskontrolle durch das NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington,

Material und Methoden

DE, USA) zeigte bei drei Messungen immer ein 260/280 nm Verhältnis von mehr als 1,9. Die cfDNA-Konzentration betrug hierbei im Mittel 61 730 pg/ μ l. Das durchschnittliche Gewicht eines Genoms wurde mit 6,6 pg angenommen, wodurch in der Standardreihe ein Topstandard von 46 765 Genomen (Genomäquivalente – GE) pro 5 μ l des Isolats errechnet wurde. Die Probe wurde anschließend aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Vor jeder PCR-Messung wurden ein Aliquot der Standardkurve und die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut. Für das Aliquot der Standardkurve wurde mit nukleasefreiem Wasser eine serielle Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 erstellt. Es wurden insgesamt neun Verdünnungsstufen erstellt, von denen die ersten beiden Verdünnungen verworfen und die Verdünnungen 3-9 für die PCR-Messungen als Standardkurve genutzt wurden (entsprechend einer Erfassungsweite von 1 732 bis 2,4 GE). Alle Messungen wurden an einem StepOnePlus[®] Cycler (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) mithilfe des TaqMan[™] Gene Expression Master Mix Kit[®] (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Sowohl die Sequenzen der eingesetzten Primer und Sonden als auch deren genutzte Konzentration und die PCR-Zyklen können der Tabelle 5 entnommen werden. Sobald die Reagenzien und Proben in die Wells der PCR-Platte pipettiert waren, wurde diese mit einer Klebefolie versiegelt und 10 Minuten bei 5 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Analyse gestartet. Alle Proben und Standards wurden in Triplets gemessen und automatisch durch die Software des Cyclers berechnet (StepOne Software V2.2.3).

2.3.3.2 Isolation und Quantifizierung der exRNA

Die exRNA wurde mithilfe des Norgen Biotek[®] RNA Purification Mini Kit (Product-# 51000, Norgen Biotek, Thorold, Kanada) nach Angaben des Herstellers isoliert. Mit diesem Kit kann extrazelluläre RNA jeglicher Größe isoliert werden. Anschließend wurde mit einer quantitativen TaqMan[™] PCR die Konzentration bestimmt, wobei β -Actin Transkripte bestimmt wurden. Hierfür wurden sowohl ein TaqMan[™] Assay von Applied Biosystems (Assay ID: Hs01060665_g1) als auch One-Step Reagenzien (Applied Biosystems AgPath-ID[™] One-Step-RT-PCR Kit, Life Technologies, Carlsbad, USA) genutzt, um Abweichungen zu minimieren. Analog zur DNA-Quantifizierung wurde auch hier eine Standardkurve erstellt, wofür RNA aus 10^7 Lungenepithelzellen A-

Material und Methoden

549 aus Passage 20 isoliert wurden, die sich in PBS befanden. Diese Isolation wurde mit dem RNeasy Mini Kit[®] (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt und anschließend auch spektralphotometerisch analysiert. Bei einer Menge von 0,01 ng RNA pro Zelle, enthielt eine Probe 119 580 Transkriptionseinheiten (TU) pro Mikroliter. Nach einer 1:1 Verdünnung wurde somit ein Topstandard von 59 790 TU/μl erzielt, welcher aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert wurde. Vor jeder PCR-Messung wurden ein Aliquot der Standardkurve und die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut. Für das Aliquot der Standardkurve wurde eine serielle Verdünnungsreihe mit acht Verdünnungsstufen erstellt. Auch hier betrug das Verhältnis von Probe zu nukleasefreiem Wasser 1:2. Die ersten beiden Verdünnungsstufen wurden verworfen und Verdünnungsstufen 3-8 für die Standardkurve in der PCR genutzt (entsprechend 2 214 bis 9 TU). Auch hier wurden alle Proben und Standards in Triplets gemessen und automatisch durch die Software des Cyclers berechnet (StepOne[®] Software V2.2.3).

Target	Primer/Sonde Sequenzen (5'→3')	Zyklen	Konzentration
β-globin (cfDNA)	<u>Forward primer:</u> GTGCACCTGAC CCTGAGGAGA <u>Reverse primer:</u> CCTTGATACCAACCTGCCAG <u>Sonde:</u> 6-FAM- AAGGTGAACGTGGATGAAGTT GGTGG-TAMRA	Holding Stage: Schritt 1: 2 min 50°C Schritt 2: 10 min 95°C Cycling Stage (40x): Schritt 3: 15 sec 95°C Schritt 4: 1 min 60°C	Sonde: 100 μM Primer: 50 μM
β-actin (exRNA)	TaqMan assay (Applied Biosystems) (AssayID: Hs01060665_g1)	Holding Stage: Schritt 1: 10 min 45°C Schritt 2: 10 min 95°C Cycling Stage (40x): Schritt 3: 15 sec 95°C Schritt 4: 45 sec 60°C	Beliebig (nach Hersteller- angaben)

Tabelle 5 Primer und Sonden Sequenzen und Zyklusbedingungen für die PCR-Quantifizierung

2.3.4 Laborchemische Parameter, Blutbild und Globalgerinnungsparameter

Alle laborchemischen Parameter (Kreatinin, Harnstoff, Bilirubin, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase [GOT], Glutamat-Pyruvat-Transaminase [GPT], Laktatdehydrogenase [LDH]), das Blutbild (Leukozyten und Thrombozyten) sowie die Globalgerinnung (Quick, INR, aPTT), mit Ausnahme des Laktats, wurden vom Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (Standort Gießen) entsprechend der dort standardisierten Methoden gemessen. Das Laktat wurde durch eine Blutgasanalyse ermittelt. Hierbei kamen die Blutröhrchen PICO50 Arterial blood Sampler zum Einsatz und die Messung wurde am ABL800 Flex Analysator (beide Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) durchgeführt.

2.3.5 Erfassung klinischer Parameter

Sowohl Stammdaten als auch die klinischen Daten der Probanden wurden dem elektronischen Patientendatenmanagementsystem (KAOS-Med Version 5.7.7.8, Uniklinikum Gießen - Abteilung für Klinische und Administrative DV (AKAD), Gießen, Deutschland; ICU-Data Version 3.5.0.7259 Firma IMESO, Gießen, Deutschland) entnommen und in einem Clinical Report Form (CRF) erfasst.

2.3.6 Statistik

Alle statistischen Analysen wurde mit SPSS Statistics® (Version 22; IBM®, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Die deskriptive Statistik umfasste die Beschreibung von Mittelwert und Standardabweichung bei parametrischen sowie Median und Interquartilsabstand bei nicht-parametrischen Daten. Die Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Gesamtanalysen von nichtparametrischen Korrelationen wurden mit dem Spearman-Rho Test (zweiseitig, Signifikanzniveau $p < 0,05$) durchgeführt. Für Gruppenvergleiche wurde zunächst für alle der Kruskal-Wallis Test durchgeführt, gefolgt vom Mann-Whitney U Test für den Vergleich zwischen zwei Gruppen. In diesem Fall wurde ein p -Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant gewertet. In den Abbildungen sind folgende Signifikanzniveaus mit Sternchen/Raute dargestellt $*/#p < 0,05$, $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$.

2.4 Materialliste

Eine ausführliche Liste über die verwendeten Materialien befindet sich im Anhang.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Studienkollektivs

Insgesamt wurden 35 Personen in diese Studie eingeschlossen. Diese setzten sich zusammen aus 10 gesunden Probanden, 10 postoperativen Patienten und 15 Patienten, die an einer Sepsis litten. Wie vom Ethikvotum empfohlen wurden die gesunden Probanden und die postoperativen Patienten möglichst nach Alter und Geschlecht an die septischen Patienten angeglichen. Der Altersdurchschnitt des gesamten Kollektivs lag somit bei 63 Jahren und es gab in allen Gruppen eine vergleichbare Geschlechterverteilung. Der Fokus der Sepsis lag bei einem Patienten im Urogenitalsystem, alle anderen Patienten hatten einen abdominellen Fokus (n=14) (Tabelle 6). Im Vergleich zu den postoperativen Patienten war der Schweregrad der Krankheit bei den septischen Patienten bei Einschluss höher, was der Median der intensivmedizinischen Scores verdeutlicht (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II [APACHE II]: 22 *versus* 16, Sequential Organ Failure Assessment Score [SOFA]: 8 *versus* 7, Simplified Acute Physiology Score II [SAPS II]: 49 *versus* 29). Beim Großteil der chirurgischen Patienten (70 %) wurde eine Pankreasresektion durchgeführt. Keiner der chirurgischen Patienten war an Tag 28 nach Einschluss in die Studie verstorben, wohingegen nur 60 % der septischen Patienten diesen Zeitraum überlebten.

	gesunde Probanden	operative Patienten	septische Patienten
N	10 (100)	10 (100)	15 (100)
Alter (Jahre)	62 (32-77)	61 (44-76)	66 (33-79)
Männliches Geschlecht	5 (50)	6 (60,0)	8 (53,3)
BMI (kg/m ²)	-	23,3 (19,6-27,9)	26,3 (18,4-37,0)
28-Tage-Überleben	10 (100)	10 (100)	9 (60)
Infektfokus			
Abdominell	-	-	14 (93,3)
Urogenital	-	-	1 (6,7)
Art der Operation			
Ösophagusresektion	-	2 (20)	-
Pankreasresektion	-	7 (70)	-
Erweiterte	-	1 (10)	-
Magenresektion	-	-	-
Klinische Scores bei			
Einschluss			
APACHE II	-	16 (7-19)	22 (8-30)
SOFA	-	7 (0-10)	8 (1-14)
SAPS II	-	29 (17-41)	49 (26-55)

Tabelle 6 Baseline-Charakteristika des Studienkollektivs. Die Werte stellen den Median (Reichweite) dar, abgesehen von N, männlichem Geschlecht, Infektfokus, Art der Operation und 28-Tage-Überleben, wofür die genaue Anzahl (Prozentsatz) angegeben sind. *Abk.: APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II, SAPS II: Simplified Acute Physiology Score II, SOFA: Sequential Organ Failure Assessment Score*

3.2 Hypothese I - Die Menge an freien Nukleinsäuren ist im Plasma septischer Patienten im Vergleich zu postoperativen Patienten und gesunden Probanden erhöht

Bei Einschluss in die Studie und 24 Stunden später war die Plasmakonzentrationen der cfDNA bei Patienten mit Sepsis signifikant höher, sowohl im Vergleich zu den

Ergebnisse

postoperativen Patienten (Einschluss: $p = 0,012$; 24 h: $p = 0,035$), als auch verglichen mit den gesunden Probanden (Einschluss: $p < 0,001$; 24 h: $p = 0,001$; Abb. 5A). Nach 72 und 168 Stunden fiel die cfDNA-Konzentration bei den septischen Patienten zwar insgesamt ab, sie blieb im Vergleich zu den gesunden Probanden aber signifikant erhöht (72 h: $p < 0,001$; 168 h: $p < 0,001$). Der Unterschied zwischen den Kontrollprobanden und den postoperativen Patienten war zu den späteren Zeitpunkten nicht mehr statistisch signifikant (72 h: $p = 0,446$; 168 h: $p = 0,529$). Auch die postoperativen Patienten zeigten im Vergleich zu den gesunden Probanden über alle Messzeitpunkte hinweg eine statistisch signifikante Erhöhung der cfDNA-Konzentration im Plasma (jeweiliger Zeitpunkt: $p < 0,001$).

Analog der cfDNA-Konzentration war auch die Plasmakonzentration der exRNA bei den septischen Patienten bei Einschluss in die Studie und 24 Stunden später im Vergleich zu den chirurgischen Patienten (Einschluss: $p = 0,004$, 24 h: $p < 0,001$) erhöht, verglichen mit den gesunden Probanden stellte sich eine signifikante Erhöhung bei Einschluss in die Studie dar (Abb. 5B). Die Ergebnisse aller Messungen sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

	gesunde Probanden	operative Patienten	septische Patienten
cfDNA (GE)			
Einschluss	2,4 (2,4-6,3)	15,9 (9,4-54,1)	52,1 (2,4-1099,2)
24h	-	10,1 (3,3-61,6)	29,1 (4,23-428,4)
72h	-	13,8 (4,0-72,3)	25,6 (4,2-84,2)
168h	-	8,4 (4,5-50,6)	14,6 (2,4-1283,3)
exRNA (TU)			
Einschluss	222,0 (65,1-917,2)	240,0 (38,2-565,2)	712,7 (94,2-2704,7)
24h	-	108,8 (26,7-550,8)	621,5 (57,2-2862,6)
72h	-	353,6 (73,7-685,6)	543,9 (68,6-2557,6)
168h	-	719,9 (264,8-1560,8)	367,3 (70,5-5345,2)

Tabelle 7 Gemessene Konzentrationen von cfDNA (in GE) und exRNA (in TU) im Median (Interquartilabstand),

Abk.: GE = Genomäquivalente, TU = Transkriptionseinheiten

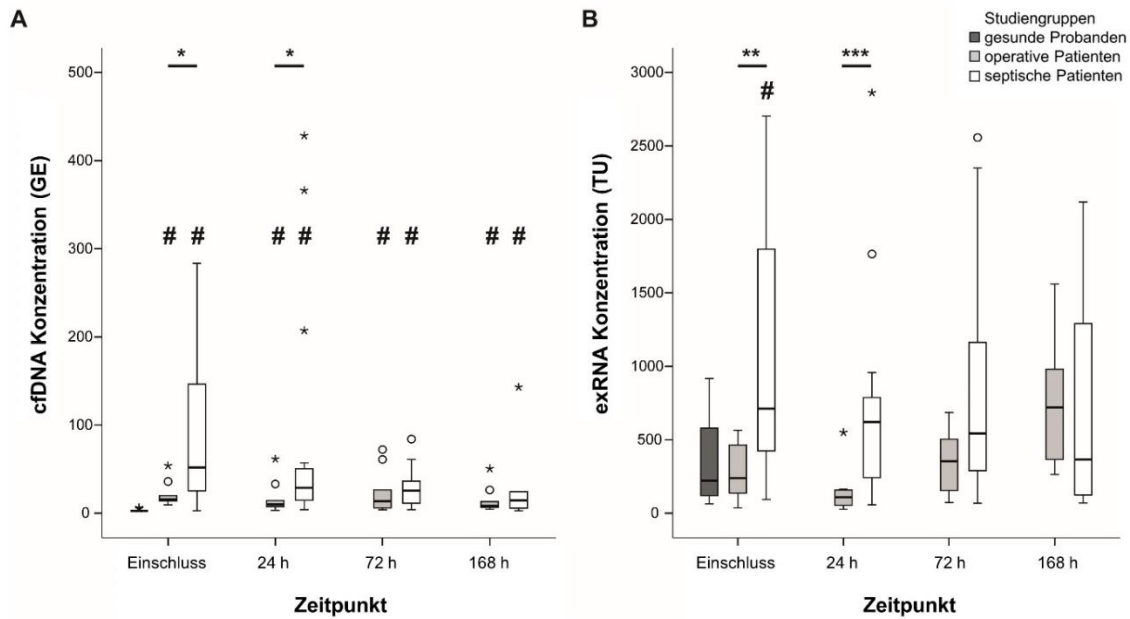


Abbildung 5 Konzentrationen von cfDNA (A) und exRNA (B) der drei Studienkollektive zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten. Die Boxplots stellen den Median mit Whisker über dem 1,53-fachen Interquartilsabstand dar. */**/** über den Säulen: $p < 0,05/0,01/0,001$, im Vergleich zwischen septischen und postoperativen Patienten; # $p < 0,05$, septische/postoperative Patienten im Vergleich mit gesunden Probanden. Sternchen und Kreise stellen Ausreißer dar. Abk.: GE = Genomäquivalente, TU = Transkriptionseinheiten

3.3 Hypothese II - Die Menge an freien Nukleinsäuren korreliert mit dem Schweregrad der vorliegenden Gerinnungsstörung

Als Basis für die Analysen des Einflusses der frei zirkulierenden Nukleinsäuren dienen die Parameter aller Messzeitpunkte der septischen Patienten. Es fanden sich eine leicht negative Korrelation der cfDNA-Konzentration mit der Thrombinzeit und eine positive Korrelation mit dem INR (Tabelle 8). Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der Rotationsthorbelastometrie wider: mit Ausnahme des NATEM zeigten alle Tests eine leicht positive Korrelation zwischen cfDNA und CT (Abb. 6).

Ergebnisse

Im Kontrast hierzu korrelierten höhere exRNA Konzentrationen negativ mit dem NATEM CT (Abb. 7), ohne jedoch einen Einfluss auf die CT anderer Reagenzien zu haben.

Trotz einer positiven Korrelation von exRNA mit der Thrombozytenanzahl, wurde kein funktioneller Effekt auf die Thrombozytenaggregometrie festgestellt (Tabelle 8). Für die cfDNA konnte diese Korrelation zur Thrombozytenanzahl nicht festgestellt werden. Außerdem zeigte sich auch keinerlei Korrelation von cfDNA oder exRNA zur CFT in der Rotationsthrombelastometrie.

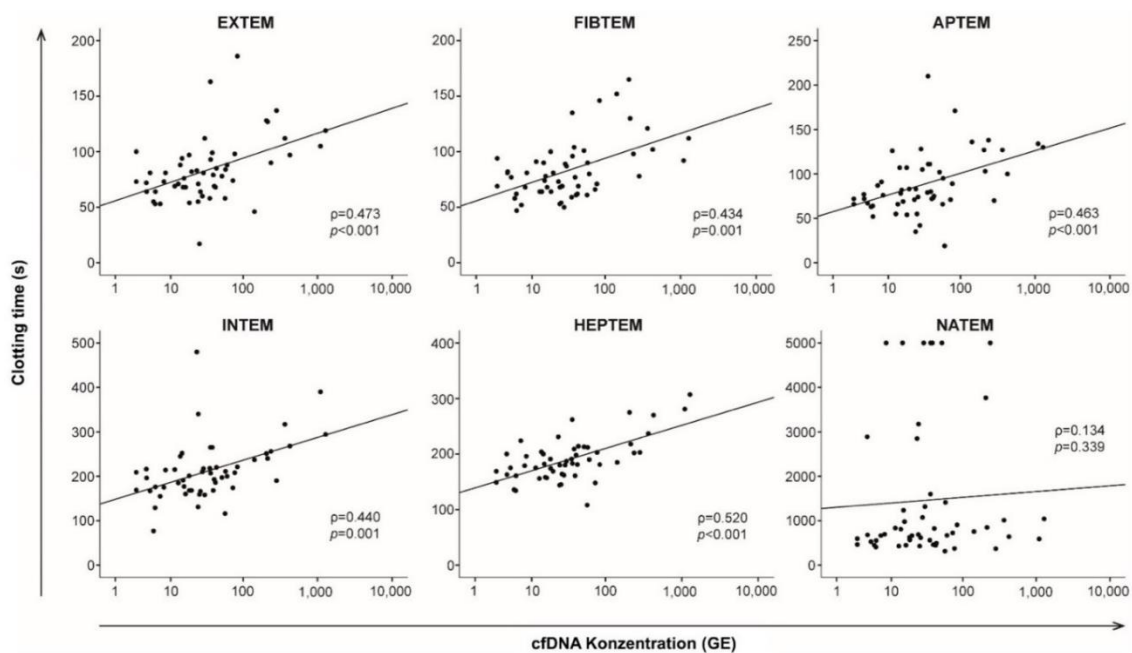


Abbildung 6 Korrelation von cfDNA Konzentration zu ROTEM® Gerinnungszeit (CT) in den unterschiedlichen gemessenen Kanälen. Für die Analyse wurden kombinierte Daten von allen Zeitpunkten der septischen Patienten genutzt. X-Achse ist an logarithmische Skalierung angepasst. *Abk.: ρ = Spearman's Rho Korrelations-Koeffizient, GE = Genomäquivalente*

Parameter	Median (Reichweite)	cfDNA		exRNA		N	
		ρ	<i>p</i>	ρ	<i>p</i>		
Quick	69 (49-100)	-0,351	0,011	-0,149	0,296	51	
INR	1,2 (1-1,5)	0,284	0,043	0,053	0,713	51	
aPTT	42 (27-70)	0,274	0,051	-0,244	0,085	51	
Thrombozytenzahl	210 (20-555)	-0,154	0,282	0,357	0,010	51	
Multiplate[®]	ADP	42 (8-186)	-0,219	0,114	0,100	0,475	53
	ASPI	56 (16-209)	-0,137	0,329	0,185	0,184	53
	TRAP	60 (16-264)	-0,210	0,132	0,177	0,204	53
EXTEM	CT	84 (53-137)	0,473	0,000	0,134	0,341	53
	MCF	73 (59-88)	0,028	0,840	0,259	0,061	53
	LI	96 (91-100)	0,115	0,418	-0,177	0,209	52
INTEM	CT	187 (131-390)	0,440	0,000	-0,014	0,923	53
	MCF	69 (51-82)	0,071	0,615	0,290	0,035	53
	LI	98 (90-100)	0,309	0,025	-0,112	0,423	53
FIBTEM	CT	78 (52-130)	0,434	0,001	0,004	0,980	53
	MCF	37 (18-48)	-0,108	0,442	-0,046	0,741	53
	LI	100 (94-100)	0,424	0,001	-0,012	0,934	53
APTEM	CT	89 (35-138)	0,463	0,000	-0,009	0,951	53
	MCF	73 (54-81)	0,001	0,995	0,284	0,039	53
	LI	97 (93-100)	0,312	0,024	-0,037	0,796	52
HEPTEM	CT	2013 (144-281)	0,520	0,000	0,121	0,387	53
	MCF	70 (53-80)	0,058	0,679	0,198	0,155	53
	LI	97 (89-100)	0,395	0,003	-0,054	0,700	53
NATEM	CT	666 (370-5144)	0,134	0,339	-0,418	0,002	53
	MCF	69 (53-78)	-0,092	0,537	0,563	0,000	47
	LI	97 (90-100)	0,465	0,002	0,204	0,195	42

Tabelle 8 Korrelation von Routineparametern, ROTEM[®]- und Multiplate[®]-Messungen mit Plasmakonzentration von cfDNA und exRNA. Fett gekennzeichnet: $p < 0,05$. aPTT und CT sind in Sekunden angegeben; INR ohne Einheit; ADP, ASPI, TRAP als Area under Curve (AUC); MCF in Millimeter; Thrombinzeit und LI als Prozent; Thrombozyten als $\times 10^3/\text{ml}$ Abk.: INR = international normalized ratio, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, ρ = Spearman's Rho Korrelations-Koeffizient

3.4 Hypothese III - Je höher die Menge an freien Nukleinsäuren, desto höher ist die Stabilität der Gerinnsel

Zur Beurteilung der Gerinnselstabilität betrachteten wir die MCF und den Lyse Index (LI) der Rotationsthrombelastometrie. Alle Tests außer des EXTEM zeigten eine positive Korrelation zwischen der cfDNA und dem LI nach 60 Minuten. Auch zeigte eine höhere exRNA Konzentrationen eine positive Korrelation mit der MCF von NATEM, INTEM und APTEM (Tabelle 8). Der LI und der MCF der anderen Tests zeigten keine signifikanten Korrelationen zur Höhe der Nukleinsäurekonzentrationen.

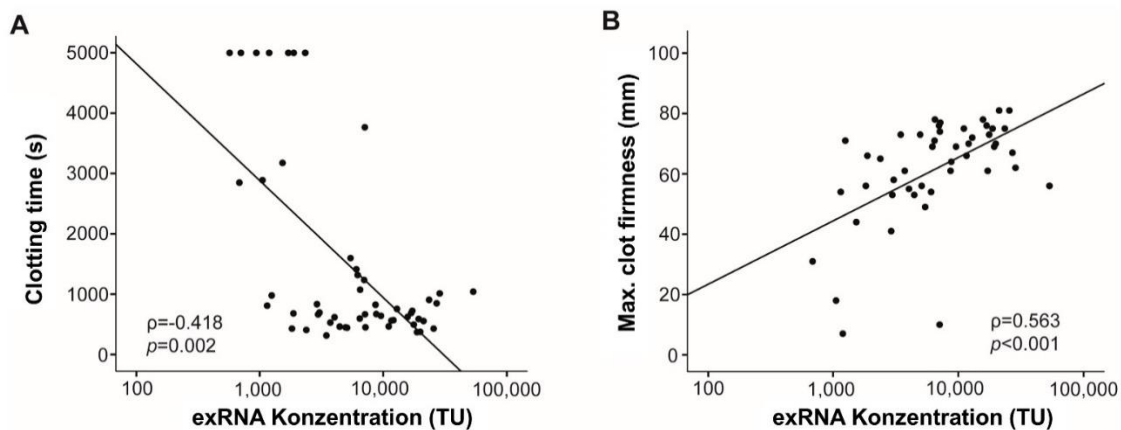


Abbildung 7 Korrelation von exRNA zu NATEM Gerinnungszeit (CT) (A) und maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) (B). Für die Analyse wurden kombinierte Daten von allen Zeitpunkten der septischen Patienten genutzt. X-Achse ist an logarithmische Skalierung angepasst. Abk.: ρ = Spearman's Rho Korrelations-Koeffizient, GE = Genomäquivalente, TU = Transkriptionseinheiten

3.5 Hypothese IV - Die Menge an freien Nukleinsäuren korreliert mit der Schädigung von Leber und Niere der Patienten

Um einen Zusammenhang zwischen den plasmatischen Nukleinsäuren und organischen Funktionsstörungen zu beurteilen, wurde eine Untergruppenanalyse mit etablierten Biomarkern für Endorganschäden durchgeführt (alle Werte in Tabelle 9). Bei den Surrogatparametern für die renale Funktion wurden signifikant höhere cfDNA-Konzentrationen bei septischen Patienten mit erhöhtem Kreatinin ($>1,2$ mg/dl) verglichen mit Patienten, deren Wert im Referenzbereich oder darunter lag, identifiziert (Abb. 8A). Dieser Effekt war bei der exRNA-Konzentration nicht sichtbar. Auch beim Harnstoff ließen sich keine signifikanten Korrelationen nachweisen (Abb. 8B-D).

Anschließend wurden Marker der Leberfunktion, also GOT, GPT und Bilirubin untersucht. Bei keinem dieser Parameter konnten Unterschiede hinsichtlich der Konzentration von cfDNA oder exRNA gefunden werden (Abb. 9A-F). Zuletzt wurde nach einem Zusammenhang mit Markern für allgemeinen Gewebsschaden und mit metabolischen Markern gesucht. Patienten mit einem erhöhten Laktat oder einer Erhöhung der LDH-Aktivität wiesen eine höhere cfDNA-Konzentration auf (Abb. 10A und B). Weniger ausgeprägt, aber auch signifikant, war die erhöhte exRNA-Konzentration bei septischen Patienten mit einem Laktat oberhalb des Referenzbereichs (Abb. 10C und D).

Ergebnisse

Parameter	cfDNA (GE)	<i>p</i>	exRNA (TU)	<i>p</i>	N
LDH					
Referenzbereich (90-250 U/l)	15,1		712,7		9
Erhöht (>250 U/l)	58,6	0,028	1250,3	0,439	14
Laktat					
Referenzbereich (0,5-2,2 mmol/l)	24,6		445,1		29
Erhöht (>2,2 mmol/l)	57,8	0,009	912,9	0,027	22
GOT					
Verringert (<35 U/l)	2,8		646,1		1
Referenzbereich (10-35 U/l)	15,6		710,2		9
Erhöht (>35 U/l)	37,4	0,167	558,5	0,633	30
GPT					
Referenzbereich (10-35 U/l)	26,4		445,1		23
Erhöht (>35 U/l)	38,4	0,126	1163,6	0,101	17
Bilirubin					
Referenzbereich (0-1 mg/dl)	25,1		545,6		22
Erhöht (>1 mg/dl)	39,6	0,326	1227,5	0,171	16
Kreatinin					
Verringert (<0,6 mg/dl)	24,6		238,6		7
Referenzbereich (0,6-1,2 mg/dl)	24,0		527,0		26
Erhöht (>1,2 mg/dl)	72,7	0,004	918,6	>0,05	18
Harnstoff					
Referenzbereich (10-50 mg/dl)	22,2		490,1		18
Erhöht (>50 mg/dl)	36,2	0,098	701,6	0,287	33

Tabelle 9 Parameter für Leber, Nieren und allgemeinen Zellschaden in Korrelation zu Nukleinsäuren bei septischen Patienten über alle Zeitpunkte. Fett gekennzeichnet: $p < 0,05$. Abk.: LDH: Laktatdehydrogenase, GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase, GE: Genomäquivalente, TU: Transkriptionseinheiten

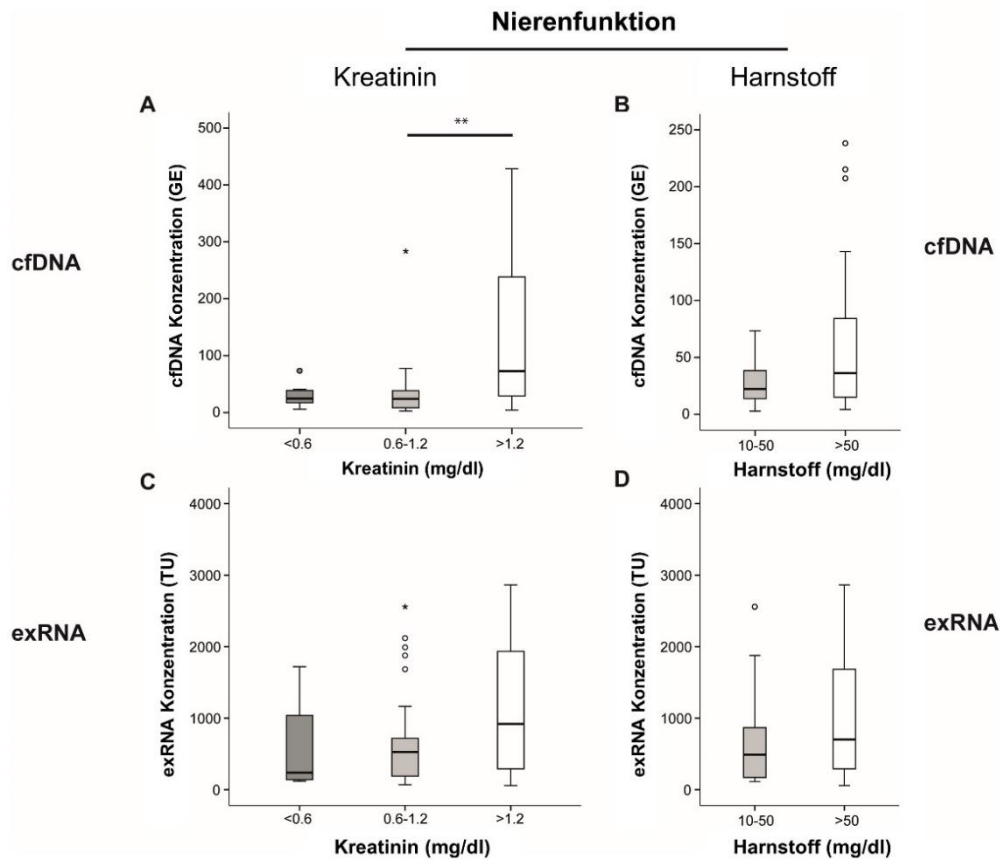


Abbildung 8 Konzentration von cfDNA (oben) und exRNA (unten) bei Patienten mit Sepsis gruppiert nach Markern der Nierenfunktion. (A) Kreatinin (n=7/26/18) und (B) Harnstoff (n=18/33) wurden für die Gruppierung genutzt, die Boxplots zeigen den Median mit Whiskers über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand. **: $p < 0,01$ im Vergleich zwischen „0,6-1,2“ und „>1,2“. Sternchen und Kreise stellen Ausreißer dar.

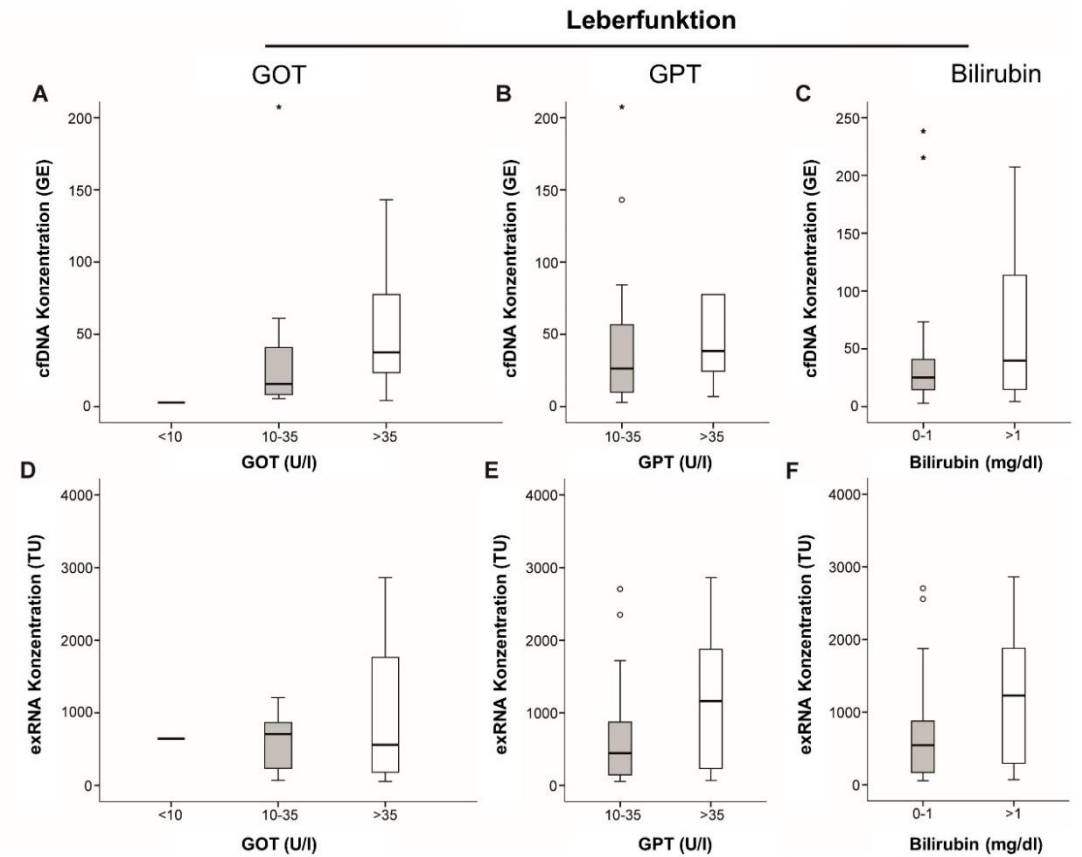


Abbildung 9 Konzentration von cfDNA (oben) und exRNA (unten) bei Patienten mit Sepsis gruppiert nach Markern der Leberfunktion. (A+D) GOT (n=1/9/30), (B+E) GPT (n=23/17) und (C+F) Bilirubin (n=22/16) wurden für die Gruppierung genutzt, die Boxplots zeigen den Median mit Whiskers über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand. Sternchen und Kreise stellen Ausreißer dar. Abk.: GOT = *Glutamat-Oxalacetat-Transaminase*, GPT = *Glutamat-Pyruvat-Transaminase*

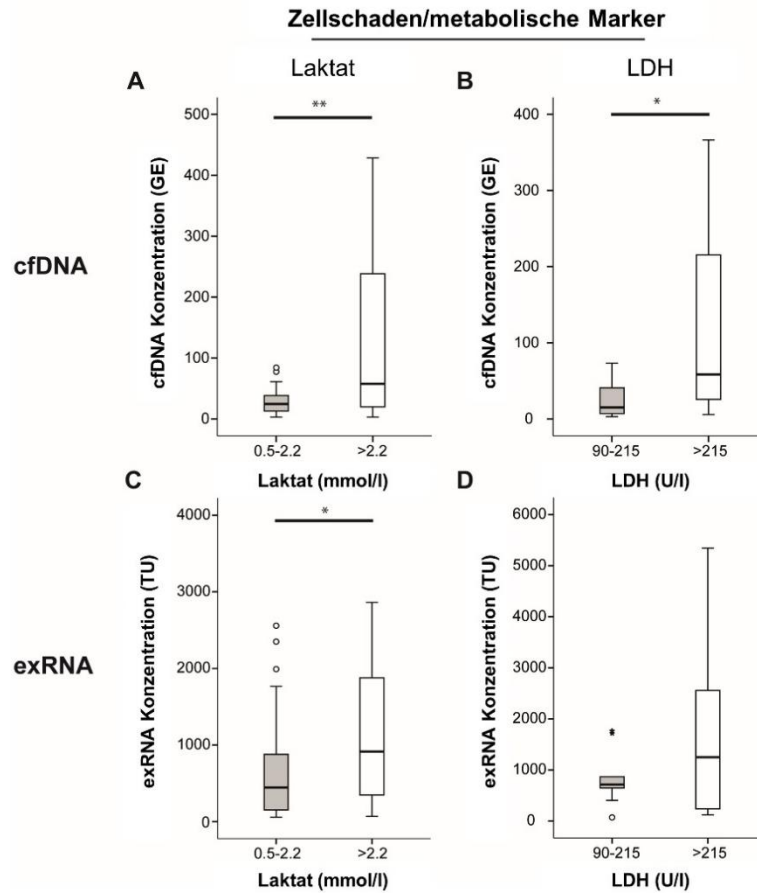


Abbildung 10 Konzentration von cfDNA (oben) und exRNA (unten) bei Patienten mit Sepsis gruppiert nach Markern für Zellschaden und metabolischen Veränderungen. (A+C) Laktat (n=29/22) und (B+D) LDH (n=9/14) wurden für die Gruppierung genutzt, die Boxplots zeigen den Median mit Whiskers über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand. */**: $p < 0,05/0,01$. Sternchen und Kreise stellen Ausreißer dar. Abk.: LDH = Laktatdehydrogenase, GE = Genomäquivalente, TU = Transkriptionseinheiten

3.6 Hypothese V - Eine persistierend erhöhte Menge an Nukleinsäuren im Verlauf stellt einen negativ prognostischen Faktor dar

Weder die cfDNA- noch die exRNA-Konzentrationen zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen überlebenden und verstorbenen septischen Patienten an einem Messzeitpunkt innerhalb des beobachteten Zeitraums von 28 Tagen (Abb. 11). Zwar zeigten die in diesem Zeitraum verstorbenen Patienten eine Tendenz zu höheren cfDNA-Konzentrationen, besonders bei Einschluss in die Studie und 24 Stunden später, allerdings verfehlten sie das statistische Signifikanzniveau. Im Einklang damit zeigte die cfDNA-Konzentration eine positive Korrelation mit den intensivmedizinischen Scores (APACHE II: $\rho = 0,489, p < 0,001$; SOFA: $\rho = 0,572, p < 0,001$; SAPS II: $\rho = 0,673, p < 0,001$; $n=48$ für alle Analysen).

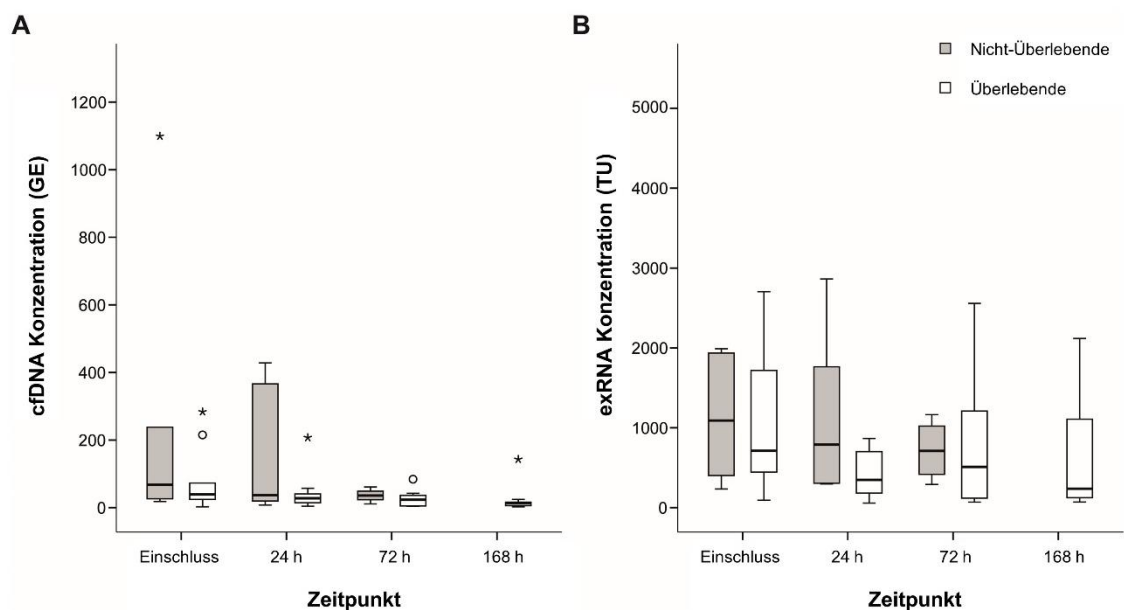


Abbildung 11 Konzentration von cfDNA (A) und exRNA (B) bei Patienten mit Sepsis an verschiedenen Zeitpunkten gruppiert nach 28-Tages-Überleben. Die Boxplots zeigen den Median mit Whiskers über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand. Sternchen und Kreise stellen Ausreißer dar. *Abk.: GE = Genomäquivalente, TU = Transkriptionseinheiten*

4 Diskussion

Die vorliegende Studie untersuchte zunächst zu verschiedenen Zeitpunkten die Konzentrationen von cfDNA und exRNA im Plasma von septischen Patienten im Vergleich zu Patienten nach großen abdominal-chirurgischen Eingriffen und gesunden Probanden. Ziel war es einen möglichen diskriminativen Biomarker zwischen septischen Patienten und postoperativen Patienten mit einem SIRS zu identifizieren. Zudem erfolgte eine Korrelation zu Gerinnungsparametern, um mögliche Zusammenhänge zwischen der Konzentration der Nukleinsäuren und Alterationen des Gerinnungssystems festzustellen. Als weitere Fragestellungen wurde eine Assoziation zwischen der Höhe der Nukleinsäurekonzentrationen und dem Ausmaß von Endorganschäden beziehungsweise der Mortalität bei septischen Patienten untersucht.

4.1 Hypothese I: Freie Nukleinsäuren im Vergleich von Sepsis und operativem Trauma

Auf einer operativen Intensivstation ist die frühzeitige Differenzierung zwischen Patienten, die an einem postoperativen SIRS leiden und Patienten, die eine Sepsis entwickelt haben, entscheidend für frühzeitige Therapie und Prognose der Patienten. Das Entwickeln einer Sepsis ist mit einer deutlich erhöhten Mortalität assoziiert. Moore et al. konnten bei chirurgischen Patienten, die eine Sepsis entwickelten, eine innerklinische Mortalität von bis zu 29 % feststellen⁷⁴. Insbesondere bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv mit abdominalchirurgischen Eingriffen ist die Wahrscheinlichkeit für das Entwickeln einer Sepsis aufgrund der möglichen bakteriellen Translokation erhöht. Für die Therapie von septischen Patienten gibt es detaillierte Empfehlungen⁸. Insbesondere die antibiotische Therapie sollte hier so früh wie möglich initiiert werden, denn es ist nachgewiesen, dass Patienten im septischen Schock ein signifikant besseres Überleben haben, wenn eine adäquate antibiotische Therapie frühzeitig begonnen wird⁴⁸. Die Mortalität dieser Patienten steigt mit jeder Stunde ohne antibiotische Therapie um fast acht Prozent. Wie im Kapitel 1.6 bereits erwähnt, sollte die antibiotische Therapie

Diskussion

bei Patienten mit septischem Schock innerhalb von einer Stunde begonnen werden, Patienten mit dem Verdacht einer Sepsis sollten innerhalb von drei Stunden antibiotisch therapiert werden⁸.

Patienten, die postoperativ ein steriles SIRS entwickeln, benötigen hingegen ausschließlich eine symptomatische Therapie, beispielsweise fiebersenkende Maßnahmen. Da die klinische Symptomatik eines sterilen SIRS der Symptomatik einer beginnenden Sepsis jedoch sehr ähnlich ist und die etablierten laborchemischen Inflammationsparameter operationsbedingt alteriert sind, ist es relevant diskriminative Biomarker zu identifizieren. Ziel wäre einerseits eine Übertherapie bei SIRS-Patienten andererseits eine Verzögerung der Therapie bei septischen Patienten zu vermeiden.

Nukleinsäuren sind als Biomarker für inflammatorische Erkrankungen bereits seit einigen Jahren im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Es ist bekannt, dass eine Inflammation mit einer Erhöhung der Konzentration freier Nukleinsäuren einhergeht. Die Forschungsgebiete mit Fokus auf freie Nukleinsäuren erstrecken sich daher von Autoimmunerkrankungen, Infektionen, chronisch entzündlichen Erkrankungen bis hin zu Entzündungen des zentralen Nervensystems⁷⁵⁻⁸⁰.

4.1.1 Frei zirkulierende DNA

Die bisher publizierten Studien zum SIRS und zur Sepsis mit Bezug auf Nukleinsäuren überprüften diese vorwiegend auf ihre Nützlichkeit zur Prognoseabschätzung^{59,61,63,81}. Andere Studien, wie die von Essandoh et al. und Wang et al., untersuchten die Nukleinsäuren als diagnostischen Marker in der Sepsis^{82,83}. In einer Studie von Lo et al. konnte die zellfreie DNA zudem als möglicher prognostischer Marker in der Traumatologie identifiziert werden⁸⁴. Keine dieser genannten Studien befasste sich jedoch mit der Möglichkeit einer Diskrimination zwischen SIRS und Sepsis mittels zellfreier DNA, wie es in der hier durchgeführten Studie erfolgt ist.

Zudem konzentrierte sich die vorgestellte Studie auf die Untersuchung des Einflusses der frei zirkulierenden Nukleinsäuren auf die septische Koagulopathie. Dabei wurde die plasmatische Konzentration sowohl von cfDNA als auch von exRNA bei septischen

Diskussion

Patienten gemessen, während sich die vorherigen Studien meist auf nur eine der beiden Nukleinsäure-Arten konzentrierten. Dadurch konnten die Konzentrationen der Nukleinsäuren im direkten Vergleich betrachtet und dazu jeweils die Assoziation zur Blutgerinnung untersucht werden. Zum anderen wurden den septischen und postoperativen Patienten Blutproben an verschiedenen Messzeitpunkten über einen Zeitraum von 7 Tagen hinweg entnommen. Dies ermöglichte zusätzlich die zeitliche Veränderung der Nukleinsäurenkonzentrationen darzustellen. Insbesondere bei septischen Patienten ist dieser Verlauf aufgrund der Dynamik, den verschiedenen Stadien des Syndroms und multiplen intensivmedizinischen Einflussfaktoren von besonderem Interesse.

Die Ergebnisse zeigten die folgenden Veränderungen der Plasmakonzentration von cfDNA: postoperative und septische Patienten zeigten im direkten Vergleich miteinander bis 24 h nach Einschluss in die Studie einen signifikanten Unterschied in der Plasmakonzentration, welcher aber im Verlauf nicht mehr nachweisbar war. Verglichen mit den gesunden Probanden hingegen war die Konzentration in beiden Kollektiven über alle Messzeitpunkte hinweg signifikant erhöht. Diese Ergebnisse sind mit bereits veröffentlichten Studien vereinbar, welche ebenfalls eine erhöhte cfDNA-Plasmakonzentrationen bei septischen und anderen kritisch kranken Patienten darstellten^{59,63,81}. Im Detail lassen sich einige Differenzen in den vorherigen Studien im Vergleich zur jetzigen darstellen. Während Rhodes et al. ein Studienkollektiv mit intensivpflichtigen Patienten unabhängig von ihrer Grunderkrankung wählten, war das primäre Einschlusskriterium bei Dwivedi et al. das Vorliegen einer schweren Sepsis und bei Saukkonen et al. zusätzlich noch das Vorliegen eines septischen Schocks. Allerdings wiesen die beiden letztgenannten Studien ein heterogenes Bild des Infektfokus im Studienkollektiv mit überwiegend pulmonalem septischem Fokus auf (bei Dwivedi et al. 52 %, bei Saukkonen et al. 50 % der Patienten). Bei der in unserer Studie untersuchten Patientengruppe mit überwiegend abdominellem Fokus trifft man in der Regel auf ein anderes Keimspektrum, insbesondere bei Translokation von Keimen der Darmflora. Zudem ist die abdominelle Sepsis oftmals mit einer höheren Mortalität assoziiert⁸⁵.

Von den untersuchten Patienten bei Rhodes et al. hatten diejenigen mit der Diagnose einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks im Vergleich zu den anderen untersuchten intensivmedizinischen Patienten signifikant höhere cfDNA-Konzentrationen. In der

Studie von Dwivedi et al. wurden insbesondere innerhalb eines Zeitraums von 28 Tagen überlebende und verstorbene Patienten verglichen. Es zeigte sich bei septischen Patienten, die in diesem Zeitraum verstarben, eine Erhöhung der cfDNA-Konzentration, so dass diese sich zur Prognoseabschätzung eignen könnte. Die überlebenden septischen Patienten hatten keine signifikant höheren cfDNA-Konzentrationen gegenüber den gesunden Probanden, wobei das gesunde Kollektiv im Gegensatz zu der hier durchgeführten Studie nicht als Matched-pair Kollektiv eingeschlossen wurde. Saukkonen et al. untersuchten in ihrer Studie hingegen keinerlei gesunde Probanden. Auch gab es in keiner der genannten Studien Untersuchungen zu postoperativen Patienten. Diese zeigten in der von uns durchgeführten Studie signifikant höhere Plasmakonzentrationen der cfDNA im Vergleich zu gesunden Probanden, was durch das operationsbedingte zelluläre Trauma während der operativen Prozedur erklärbar ist. Interessanterweise waren die cfDNA-Konzentrationen der septischen Patienten auch gegenüber den postoperativen Patienten signifikant erhöht. Dies impliziert zwei mögliche pathophysiologische Erklärungen: Zum einen könnte der sepsisbedingte zelluläre Schaden ausgeprägter als der operationsbedingte Schaden sein, zum anderen könnten die Nukleinsäuren zusätzlich im Rahmen einer NETose freigesetzt werden. Der Frage nach dem Ursprung der erhöhten Konzentration der cfDNA gingen Hamaguchi et al. nach und identifizierten den Wirt, und nicht Bakterien, als hauptsächliche Quelle für cfDNA⁸⁶. Zudem zweifelten sie an der Hypothese, dass die cfDNA im Rahmen der NETose freigesetzt wird, da sie unter septischen Bedingungen im Tiermodell nicht mit den NETs assoziiert war. Allerdings ist fraglich, inwieweit diese Erkenntnisse auch auf den Menschen übertragbar sind, insbesondere da in der Studie von Hamaguchi et al. eine andere Quelle zur Bestimmung der cfDNA gewählt wurde (β -2-Mikroglobulin vs. β -Globin) und es gut belegt ist, dass menschliche NETs cfDNA enthalten⁸⁷. NETs könnten eine potenzielle Schlüsselrolle im Rahmen der septischen Immunreaktion spielen, insbesondere auch im Hinblick auf die septische Koagulopathie^{67,88,89}.

Folgende Überlegung, die man als „NETkrose“-Theorie bezeichnen kann, soll diese Schlüsselrolle erläutern: der Mechanismus der NETs trägt, wie bereits in der Einleitung geschildert, im kleinen Maßstab zur cfDNA-Konzentration bei. Gould et al. konnten bei *in vitro* Versuchen zeigen, dass die cfDNA über den intrinsischen Weg die Gerinnung aktiviert und die Fibrinolyse hemmt, was die Entstehung von Mikrothromben

begünstigt⁶⁸. Setzen sich diese Mikrothromben nun in Endstromgebieten des Patienten ab, führt dies zur lokalen Gewebshypoxie des nachgeschalteten Gewebes und bei Fortbestehen dieses Zustands zur Nekrose, also dem unkontrollierten Zelluntergang²⁶. Im Rahmen einer globalen Ischämie, wie sie häufig im septischen Schock auftritt, käme es bei dieser Theorie zu einem deutlichen Anstieg der cfDNA im Blut. Die NETs wären also nicht Hauptquelle, aber wichtiger Auslöser der cfDNA-Freisetzung. Diese Theorie würde auch die signifikant höhere cfDNA-Konzentration im Vergleich mit postoperativen Patienten erklären, denn eine Operation könnte mit einer geringeren Inflammationsreaktion einhergehen.

4.1.2 Frei zirkulierende RNA

Das septische Patientenkollektiv der hier durchgeführten Studie zeigte in den ersten 24 Stunden signifikante Erhöhungen der exRNA-Konzentrationen gegenüber sowohl den postoperativen Patienten als auch den gesunden Probanden. Im Gegensatz zu den Messungen der cfDNA zeigte sich dieser Unterschied an den folgenden Messzeitpunkten allerdings nicht mehr. Der rasche Abfall der exRNA-Konzentration kann durch verschiedene Mechanismen verursacht sein. Zum einen könnte die Rolle der exRNA als Kofaktor der Gerinnungsfaktoren XII und XI einen Beitrag zur Verringerung der Konzentration leisten, da es hierdurch zu einem Verbrauch der exRNA kommt⁶⁹. Einen weiteren Grund für den Konzentrationsabfall postulierten Martin et al.: Sie zeigten, dass während der Sepsis Ribonukleasen vermehrt exprimiert werden, was zu einem vermehrten Abbau der frei-zirkulierenden RNA führt⁹⁰. Darüber hinaus wiesen Martin et al. nach, dass die Konzentrationen der Ribonukleasen einen diagnostischen Wert in Bezug auf Organversagen im Rahmen der Sepsis hat. Für die Sepsis sind hingegen bisher nur einige intra- und extrazelluläre micro-RNAs bekannt, die ähnliches Potential als diagnostische und prognostische Parameter aufweisen könnten^{82,83}. Bei Patienten, die im Rahmen eines Traumas multiple Frakturen erlitten, konnte in einer Studie von Laktionov et al. gezeigt werden, dass die Konzentration von exRNA auch erhöht war⁹¹. Dies legt nahe, dass die Hauptquelle der exRNA der Gewebsschaden ist. So induzierten Kannemaier et al. im Tierversuch eine Schädigung der Gefäße mittels Injektion von

Eisenchlorid zur Freisetzung von exRNA und zur Beurteilung von dessen Einfluss auf die Blutgerinnung⁷¹. Mittels der hier vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass auch bei septischen und postoperativen Patienten eine signifikante Erhöhung der exRNA Konzentration vorliegt. Dies könnte mit den sepsis-assoziierten Gewebsschäden beziehungsweise dem operativen Trauma zu begründen sein.

Zusammenfassend wurde Hypothese I sowohl für cfDNA als auch exRNA positiv beantwortet. Allerdings konnte nur für die ersten 24 Stunden ein signifikanter Unterschied zwischen den septischen und postoperativen Patienten identifiziert werden. Dennoch könnte dies auf einen diskriminativen Nutzen zur Identifizierung von septischen Patienten hinweisen. Man könnte also potenziell die Messung von cfDNA und exRNA als Frühbiomarker für eine Sepsis innerhalb der ersten 24 Stunden nach einer abdominalen Operation nutzen. Allerdings fehlen noch größere Validierungsstudien, um diese Frage endgültig zu beantworten. Die septischen Patienten könnten mit einer frühzeitigen antibiotischen Therapie von einer signifikanten Mortalitätsverringerung profitieren. Zusätzlich würden die Symptome von postoperativen Patienten mit einem sterilen SIRS nicht als Sepsis fehlinterpretiert werden, diesen Patienten würde eine nicht notwendige antibiotische Therapie erspart.

4.2 Hypothese II und III: Der Einfluss der Nukleinsäuren auf die septische Koagulopathie

Für die Beurteilung der zweiten und dritten Hypothese wurden neben den üblichen Gerinnungsparametern zwei weitere Messverfahren genutzt: die Rotationsthrombelastometrie und Thrombozytenaggregometrie stellen beide etablierte Verfahren zur Detektion von Gerinnungs- beziehungsweise Thrombozytenfunktionsstörungen dar. Eine Übersichtsarbeit von Müller et al. zeigte, dass mithilfe der Rotationsthrombelastometrie während einer Sepsis ein weites Spektrum von hyper- bis hin zu hypokoagulatorischen Stadien identifiziert werden konnte⁴⁴. Während auch eine native Gerinnungssituation suffizient dargestellt werden kann, können insbesondere schwere Gerinnungsstörungen wie die Hyperfibrinolyse bettseitig erfasst werden⁹²⁻⁹⁴. Die Identifizierung hypo- und hyperkoagulatorischer Zustände ist für

die Analyse der septischen Koagulopathie von hohem klinischem Interesse, da diese Stadien der sepsis-assoziierten Koagulopathie widerspiegeln. So zeigten Adamzik et al., dass septische Patienten im Vergleich zu postoperativen Patienten einen höheren LI, also eine reduzierte Fibrinolysefähigkeit aufwiesen, was einen hyperkoagulatorischen Zustand impliziert⁹⁵. Zudem wurde bei septischen Patienten eine verzögerte, aber insgesamt intensivierete Thrombusbildung festgestellt⁹⁶. Auf der Suche nach den ursächlichen Mechanismen dieser Beobachtungen konnten Gould et al. in ihren Versuchen darstellen, dass die cfDNA bei höheren Konzentrationen im Plasma an Plasmin bindet und damit dessen Funktion des Fibrinabbaus unterbindet, also die Fibrinolyse bremst⁶⁸. Ein wesentliches Problem in der Untersuchung der septischen Koagulopathie stellen die heterogenen und hochdynamischen Stadien mit teils fließenden Übergängen der Erkrankungen dar. Dies erklärt die teils sehr unterschiedlichen Studienergebnisse, die Müller et al. in ihrer Übersichtsarbeit über die Nutzung der Rotationsthrombelastometrie in der humanen Sepsis zusammenfassten⁴⁴. Darüber hinaus konnte aufgrund des explorativen Studiencharakters kein Einfluss auf die Gerinnungstherapie genommen werden. Um diese Einflüsse zu minimieren, wurden in der vorliegenden Studie im septischen Patientenkollektiv die Ergebnisse aller Messzeitpunkte kombiniert und anschließend die Konzentrationen der Nukleinsäuren mit den laborchemischen Parametern und den Messergebnissen der Rotationsthrombelastometrie und Thrombozytenaggregometrie korreliert. Hierbei zeigte sich, dass mit Ausnahme des EXTEM bei allen Rotationsthrombelastometrie-Reagenzien eine erhöhte cfDNA-Konzentration mit einem höheren LI korreliert. Zudem stellte sich eine positive Korrelation zwischen der Menge an cfDNA und einer verlängerten CT, also der Zeit bis zur Entstehung des Thrombus, dar. Dagegen konnte keine Korrelation zur MCF, also der maximalen Gerinnselfestigkeit identifiziert werden. Die Ergebnisse sind mit denen von Adamzik et al. und Collins et al. vergleichbar und legen nahe, dass die cfDNA einen potentiellen regulierenden Einfluss auf die Thrombusbildung und die Fibrinolyse aufweist^{95,96}. Auf den ersten Blick widerspricht die Verlängerung der Thrombusbildung vorherigen Studien, die der cfDNA *in vitro* einen rein prokoagulatorischen Effekt, wie zum Beispiel dem erhöhten LI, zuschreiben⁵⁷. Diese Ergebnisse weisen auf eine komplexere Rolle der cfDNA hin, die an einer definitiven Zuordnung der cfDNA zu den pro- oder antikoagulatorischen Einflussfaktoren zweifeln lässt. Diese Erkenntnisse werden unter anderem durch Longstaff et al. unterstützt. Sie

zeigten, dass Histone, die Teil des cfDNA-Aufbaus sind, den antikoagulatorischen Effekt von unfraktioniertem und niedermolekularem Heparin neutralisieren und somit prokoagulatorisch wirken⁹⁷. Dies könnte erklären, dass die Gerinnungsparameter des septischen Patientenkollektivs trotz routinemäßiger Heparinbehandlung kein einheitliches Bild bezüglich der Gerinnungssituation zeigten.

Der Ursprung der frei zirkulierenden DNA spielte in *in vitro* Versuchen bei der Gerinnungsaktivierung keine entscheidende Rolle. Bhagirath et al. konnten darstellen, dass sowohl nukleäre als auch mitochondriale und bakterielle DNA die Gerinnung aktivieren können⁵⁷. Die mitochondriale DNA ist strukturell der bakteriellen DNA ähnlich, was durch die Endosymbionten-Theorie erklärbar ist. Daher wird bei Schädigung der Mitochondrien diese DNA als DAMP erkannt und eine inflammatorische Reaktion verursacht, was in der Folge sekundär koagulatorische Kaskaden aktiviert⁹⁸. Diese enge Verknüpfung von Immun- und Gerinnungssystem im Sinne einer Immunhämostase zeigten auch Koch et al., die in septischen Patienten eine Korrelation zwischen erhöhter Endotoxin-Aktivität und erhöhter Gerinnselbildung in der Rotationsthrombelastometrie feststellen konnten⁹⁹.

Betrachtet man die Ergebnisse der Thrombozytenaggregometrie des hier untersuchten Patientenkollektivs, so zeigte sich keinerlei Korrelation zwischen Thrombozytenfunktion und cfDNA-Konzentration. Dies könnte die fehlende Korrelation von cfDNA zur MCF erklären, welche maßgeblich von der Thrombozytenzahl und -funktion sowie des Fibrinogenspiegels abhängig ist. Dies entspricht den Ergebnissen von Collins et al., welche keinen Zusammenhang zwischen der septischen Koagulopathie und der Thrombozytenzahl identifizieren konnten⁹⁶. Allerdings zeigten Clark et al., dass es eine enge Interaktion zwischen Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten gibt, im Rahmen derer die Granulozyten durch die Thrombozyten aktiviert werden und dadurch NETs ausstoßen. Unter diesen Umständen könnte eine höhere Thrombozytenzahl mit einer ausgeprägteren NETose und somit auch einer höheren Konzentration von cfDNA assoziiert sein⁸⁸.

Die Ergebnisse der exRNA zeigten eine überwiegend prokoagulatorische Tendenz: Im Gegensatz zur cfDNA korrelierten höhere exRNA-Konzentrationen sowohl mit einer verkürzten CT in der nativen Gerinnung (NATEM) als auch mit einer höheren MCF. Dies deckt sich mit Studienergebnissen aus *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten am Tiermodell.

So konnten Kannemeier et al. darstellen, dass exRNA über die Aktivierung verschiedener Faktoren des intrinsischen Gerinnungsweges, insbesondere der Faktoren XI und XII, als „natürliche Fremdoberfläche“ des Körpers fungieren kann und somit prokoagulatorische Eigenschaften aufweist⁷¹. Zudem zeigten ihre Versuche im Tiermodell, dass die Gabe von exRNA die Gerinnung initiierte und es konnte eine Verbindung von exRNA mit thrombozyten- und fibrinreichen Thromben nachgewiesen werden. In selbigem Mausmodell konnte zudem durch die Gabe von RNase eine signifikante Verzögerung der Thrombusbildung erzielt werden, was die Gabe von DNase hingegen nicht verursachte. Diese Ergebnisse werden zudem von der Tatsache unterstützt, dass ein Faktor XII-Mangel bei Mäusen einen Schutz vor schweren thrombotischen Ereignissen darstellt. Einen weiteren Weg der exRNA die Gerinnung zu aktivieren, zeigten Nakazawa et. al in ihrer Studie. Sie konnten nachweisen, dass exRNA auch als Kofaktor der FSAP dient und über diesen Mechanismus den intrinsischen Gerinnungsweg aktiviert¹⁰⁰.

Grundsätzlich bleibt die Interpretation der beobachteten Studienergebnisse bezüglich der septischen Koagulopathie schwierig, da sich die Immunhämostase in der Sepsis als ein hochkomplexes System mit vielen Wechselwirkungen, insbesondere unter Berücksichtigung der intensivmedizinischen Maßnahmen, darstellt.

4.3 Hypothese IV: Die Assoziation zwischen frei zirkulierende Nukleinsäuren und septischen Endorganschäden

Im Rahmen der vierten Hypothese sollte untersucht werden, inwiefern höhere Konzentrationen von Nukleinsäuren mit Schädigungen an Leber und Niere bei septischen Patienten assoziiert sind. Dieser Hypothese liegt der Begriff der Immunhämostase und die „NETkrose“-Theorie zugrunde. Durch die überschießende Reaktion des Immun- und Gerinnungssystems in der Initialphase der Sepsis kann es durch Hypoperfusion und konsekutiven Ischämien zu Schäden an Nieren und Leber kommen.

In der vorliegenden Studie zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen erhöhten cfDNA-Konzentrationen und einer reduzierten Nierenfunktion (erhöhtes Kreatinin). Auch die Korrelation zur LDH-Aktivität und zur Laktat-Konzentration war signifikant,

Diskussion

was auf einen vorhandenen Gewebsschaden und einen hypoxischen Metabolismus hinweist. Hinzu kommt, dass die intensivmedizinischen Scores positiv-korrelative Tendenzen zur cfDNA-Konzentration zeigten, aber auf Grund der Fallzahlgröße das statistische Signifikanzniveau nicht erreichten. Die Menge an exRNA korrelierte hingegen nur mit der Laktat-Konzentration signifikant. Die Surrogatparameter der Leberfunktion zeigten keinerlei Korrelation, weder zur cfDNA- noch zur exRNA-Konzentration.

Czaikoski et al. konnten im Tiermodell septischer Mäuse bereits darstellen, dass eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Organschädigung und der Konzentration freier DNA besteht, die insbesondere von NETs ausgeht⁶⁷. Diese Ergebnisse konnten in der gleichen Studie auch in der klinischen Untersuchung an septischen Patienten dargestellt werden. Hier zeigte sich eine signifikant höhere cfDNA Konzentration bei septischen Patienten mit schwerem akuten Nierenversagen (Acute Kidney Injury Network (AKIN) 2 und 3) im Vergleich zu septischen Patienten mit stabiler Nierenfunktion oder akutem Nierenversagen AKIN 1. Insbesondere die Korrelation von erhöhter Konzentration von NETs und damit einhergehend einer höhergradigen Organschädigung konnten weitere Studien sowohl im Tiermodell als auch in klinischen Untersuchungen an septischen Patienten nachweisen^{101,102}. McDonald et al. konnten zudem im murinen Sepsismodell nachweisen, dass eine Inhibition von NETs die mikrovaskuläre Organperfusion verbessert und somit die Organschäden signifikant reduziert¹⁰³.

Die Niere ist aufgrund ihrer Autoregulation des Blutdrucks im Falle einer Minderperfusion besonders in ihrer Funktion gefährdet. Sie weist kleinere Kapillaren mit Endgefäßabschnitten und geringer Kollateralisierung auf, welche im Falle einer septisch bedingten systemischen Hypoperfusion in Kombination mit einer Hyperkoagulabilität empfindlich reagieren. Kommt es wie bei McDonald et al. im Tiermodell nachgewiesen zur Reduktion der mikrovaskulären Perfusion aufgrund einer hohen NETs-Konzentration, dann erfolgt häufig eine Dekompensation mit akutem Nierenversagen, was eine der häufigsten Komplikationen der schweren Sepsis darstellt¹⁰⁴. Dies könnte die in dieser Studie nachgewiesene signifikante Korrelation zwischen der erhöhten cfDNA Konzentration und der erhöhten Kreatininwerte erklären.

4.4 Hypothese V: Frei zirkulierende Nukleinsäuren als prognostische Biomarker in der Sepsis

In dieser Studie konnte keine signifikante Korrelation zwischen der freien Nukleinsäurenkonzentration und der 28-Tage-Überlebensrate der septischen Patienten gezeigt werden. Die cfDNA-Konzentration zeigte aber eine Tendenz, die dessen prognostischen Nutzen nahelegt. Dies würde vorherigen Studien entsprechen, die im Rahmen der Sepsis prognostische Eigenschaften der cfDNA identifizierten^{59,61,63,105}. Allerdings ist bei diesen Studien eine deutlich größere Studienpopulation untersucht worden. Die kleinste hierbei untersuchte Studiengruppe war die von Rhodes et al. mit 52 Patienten, welche auch eine positive Tendenz, allerdings keine Signifikanz bezüglich der Korrelation zwischen cfDNA Konzentration und Mortalität feststellten⁵⁹. Somit könnte die geringe Fallzahlgröße dieser explorativen Studie eine Erklärung für die fehlende Korrelation der cfDNA zur Mortalität erklären. Auch in Hinblick auf die exRNA zeigte sich keine Signifikanz in der Korrelation der Konzentration mit der 28-Tage-Überlebensrate des septischen Patientenkollektivs. Allerdings existieren zum prognostischen Nutzen der exRNA mit Fokus auf das SIRS und die Sepsis keine vergleichbaren Studien, so dass diesbezüglich eine Wertung der Ergebnisse schwierig ist. Im Gegensatz hierzu ist die exRNA als prognostischer Biomarker in der Krebsforschung von besonderem Interesse und Objekt diverser Studien^{106,107}.

5 Limitationen

Die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Studie ist durch das Studiendesign und die Größe der Kollektive in einigen Punkten limitiert. Zunächst ist diese Studie als explorative Beobachtungsstudie konzipiert, so dass kein Einfluss auf die intensivmedizinische Therapie (insbesondere des Gerinnungsmanagements) genommen werden konnte. Bei Humanstudien im klinischen Setting einer Intensivstation wird dieser Faktor aus ethischen Gründen jedoch nie vollständig zu kontrollieren sein. Des Weiteren wurde aufgrund des explorativen Charakters und fehlender vergleichbarer Studien keine Fallzahlschätzung durchgeführt, was in einer geringen Fallzahlgröße resultiert. Allerdings ist dabei zu erwähnen, dass das Studienkollektiv der septischen Patienten zwar klein, dafür aber im Vergleich zu anderen Studien homogen war und trotz der geringen Fallgröße schon statistisch signifikante Ergebnisse zeigte.

Zudem handelt es sich um eine Beobachtungsstudie, das heißt, dass die Ergebnisse deskriptiv sind und keinen Schluss auf einen kausalen Zusammenhang zulassen. Um kausale Zusammenhänge zu detektieren, sind weitere experimentelle Studien notwendig.

Eine weitere Limitation ist die Definition der Sepsis, welche sich im stetigen Wandel befindet. Durch wechselnde Kriterien für die Diagnose einer Sepsis können Studien, die auf Basis unterschiedlicher Sepsisdefinitionen durchgeführt wurden, nur eingeschränkt untereinander verglichen werden. So war vor Einführung der Sepsis-3-Definition das SIRS ein Hauptkriterium für die Diagnose einer Sepsis. Die SIRS-Kriterien wurden jedoch bei chirurgischen Patienten oftmals bereits durch die physiologische Reaktion auf die Operation erfüllt, so dass hier möglicherweise falsch hohe Zahlen einer Sepsis geführt wurden und Patienten ohne das Vorliegen einer Sepsis in Studien zur Erforschung der Sepsis eingeschlossen wurden.

6 Ausblick

Die Studie könnte als Beitrag für weitere Studien genutzt werden und stellt eine Basis für ähnliche Studien mit größeren Patientenzahlen dar. Zum einen können freie Nukleinsäuren als diagnostisches Mittel in der Sepsis genutzt werden. Mittels der ersten Hypothese konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit einer Sepsis höhere Konzentrationen freier Nukleinsäuren im Blut aufweisen als Patienten nach einem großen operativen Eingriff. Dies könnte man in einem größeren Patientenkollektiv verifizieren und anhand dessen die Differenzierung zwischen einer Sepsis und einem postoperativen SIRS frühzeitig treffen, wodurch eine prognoseverbessernde frühere Therapie septischer Patienten möglich wäre.

Des Weiteren wurden die Ergebnisse dieser Studie als Grundlage für zwei Folgestudien verwendet, in denen die Rolle der NETs und frei zirkulierender mitochondrialer DNA (mtDNA) im Rahmen der humanen Sepsis im Vergleich zum postabdominal- und postkardiochirurgischen SIRS und ihrem Einfluss auf eine Koagulopathie untersucht wurden. Hier zeigte sich, dass sowohl NETs als auch die mtDNA als weitere Parameter zur möglichen Frühdiskrimination zwischen Patienten mit einem postoperativen SIRS und septischen Patienten genutzt werden könnten^{108,109}. Somit wären durch diese Studien drei neue Parameter als potenzielle Biomarker zur Differenzierung von SIRS- und septischen Patienten vorhanden. Dies müsste jedoch mit größeren Fallzahlen verifiziert werden.

Auch zeigte sich in unserer fünften Hypothese eine Tendenz zur Signifikanz bei der Korrelation der cfDNA mit dem 28-Tage-Überleben. Hier wären erneut höhere Fallzahlen notwendig, um gegebenenfalls die cfDNA für einen prognostischen Biomarker zu identifizieren.

Aktuell stellt die Nutzung von DNase als therapeutisches Mittel Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen dar. Kolaczowska et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass die Gabe von DNase bei Leberschäden, die durch eine bakterielle Infektion verursacht wurden, keinen positiven Effekt auf das Lebergewebe hat¹¹⁰.

Ausblick

Als Mediator für den Leberschaden identifizierten sie bei ihren Versuchen jedoch die NETs: nach DNase-Gabe wurde der gleiche Schaden in der Leber verursacht, also unabhängig von dem DNA-Gehalt in den NETs. Inhibierte man hingegen die NETose vollständig, konnte der hepatische Schaden um 80 % reduziert werden. Andere Studien zeigen im Tierversuch, dass die Gabe von DNase in der Sepsis durchaus einen Effekt hat, sowohl im positiven als auch im negativen Sinne. Entscheidend schien hier der Zeitpunkt der Gabe zu sein: ein früher Einsatz der DNase führte zu einer stärkeren Verbreitung der Bakterien und einer verringerten Überlebensrate; kam die DNase aber in einer späteren Phase der Sepsis zum Einsatz, so zeigten sich, insbesondere für Lunge und Niere, eine verbesserte Organfunktion und eine insgesamt verbesserte Überlebensrate der untersuchten Mäuse^{111,112}. Es zeigt sich also in der Zusammenschau der präklinischen Studien anderer Forschungsgruppen und unter Berücksichtigung der vorliegenden Studie, dass DNasen potenziell als therapeutisches Mittel in der Sepsis genutzt werden könnten, um damit Organschäden zu reduzieren. Betrachtet man die Korrelationen der exRNA-Konzentrationen in dieser Studie und vorherigen Publikationen, die den prokoagulatorischen Effekt der exRNA hervorheben, so ist auch ein Therapieeinsatz von RNase denkbar. Im Tiermodell konnte bereits dargestellt werden, dass der Einsatz der RNase die Thrombusbildung verzögert⁷¹. Allerdings müsste der Einsatz sowohl der DNase, als auch der RNase gut abgewogen und von der individuellen Gerinnungssituation des Patienten abhängig gemacht werden.

7 Zusammenfassung

Hintergrund: Zellfreie DNA (cfDNA) und extrazelluläre RNA (exRNA) sind Teil der Immunhämostase in der Sepsis. Allerdings ist die *in vivo* Bedeutung unklar. Daher untersuchte die vorliegende Studie den Einfluss von freien im Plasma zirkulierenden Nukleinsäuren auf die Gerinnung bei septischen Patienten im Vergleich zu Patienten nach großen abdominal-chirurgischen Eingriffen und gesunden Probanden. Des Weiteren sollte eine Korrelation zwischen der Konzentration der Nukleinsäuren und dem Auftreten von Nieren- und Leberversagen, sowie der Mortalität untersucht werden.

Material und Methoden: Insgesamt 15 Patienten mit Sepsis, zehn postoperative Patienten und zehn gesunde Freiwillige wurden in diese prospektive Studie einbezogen. Die Blutentnahme erfolgte zu Beginn der Sepsis beziehungsweise nach der Operation sowie nach 24, 72 und 168 Stunden. Die Konzentrationen der β -Globin-cfDNA und β -Aktin-exRNA wurden mittels quantitativer sondenbasierter Polymerasekettenreaktion gemessen. Darüber hinaus wurden eine Thromboelastographie für die Gerinnung sowie Thrombozytenaggregometrie für die Thrombozytenfunktion durchgeführt.

Ergebnisse: Sowohl die Konzentration der cfDNA als auch die der exRNA waren bei Patienten mit Sepsis im Vergleich zu postoperativen Patienten und gesunden Freiwilligen erhöht. Höhere exRNA-Spiegel korrelierten mit einer schnelleren Gerinnungszeit und stabileren Gerinnseln, erhöhte cfDNA Konzentrationen korrelierten dagegen mit einer kürzeren Gerinnungszeit, aber auch mit einer geringeren Fibrinolyse. Darüber hinaus scheint eine höhere cfDNA Konzentration mit einer Nierenfunktionsstörungen sowie mit höheren allgemeinen Markern für Zellschäden (Laktatdehydrogenase und Laktat) assoziiert zu sein.

Schlussfolgerungen: Die hier untersuchten freien Nukleinsäuren könnten insbesondere in der Anfangsphase als Biomarker zur Frühdiskrimination zwischen postoperativem SIRS und einer Sepsis dienen. Beide freie Nukleinsäuren könnten mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die Blutgerinnung während einer Sepsis verbunden sein. Insgesamt zeigte sich ein prokoagulatorischer Einfluss. Aus diesem Grund sind individualisierte therapeutische Ansätze bei septischen Patienten mit gerinnungsassoziierten Organdysfunktionen denkbar. Hierfür sind weiterführende Studien notwendig.

8 Summary

Background: Cell-free DNA (cfDNA) and extracellular RNA (exRNA) are both part of the immunohemostasis during sepsis. Therefore, our study investigated the influence of free plasma-circulating nucleic acids on coagulation in septic patients compared to patients after major abdominal surgery and healthy volunteers. Further, it aimed to identify potential correlations of the nucleic acids and the onset of renal and liver failure and mortality.

Material and methods: A total of 15 patients with sepsis, ten postoperative patients and ten healthy volunteers were included in this prospective study. Blood samples were taken at the onset of sepsis or after surgery respectively, and 24, 72 and 168 hours later. Concentrations of β -globin cfDNA and β -actin exRNA were measured by quantitative probe-based polymerase chain reaction. In addition, thromboelastography for coagulation and platelet aggregometry for platelet function were performed.

Results: Both cfDNA and exRNA levels were increased in patients with sepsis compared to postoperative patients and healthy volunteers. Higher exRNA levels correlated with a faster clotting time and more stable clots, while increased cfDNA concentrations correlated with a shorter clotting time but also with less fibrinolysis. Furthermore, higher cfDNA concentration seemed to be associated with renal dysfunction as well as higher general markers of cell damage (lactate dehydrogenase and lactate).

Conclusions: The investigated free nucleic acids could serve as biomarkers for early discrimination between postoperative SIRS and sepsis, especially in the initial phase. Both free nucleic acids could be associated with different effects on blood coagulation during sepsis. Overall, a procoagulatory influence was shown. For this reason, individualised therapeutic approaches in septic patients with coagulation-associated organ dysfunctions are conceivable. Further studies are required to evaluate this.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abk.	Abkürzungen
ADP	Adenosin Diphosphate
AKIN	Acute Kidney Injury Network
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
aPTT	activated Partial Thromboplastin Time
ASS	Acetylsalicylic Acid
AU	Aggregation Units
AUC	Area under the Curve
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome
cfDNA	cell-free Desoxyribonucleic Acid
CFT	Clot Formation Time
CRP	C-reactive Protein
CT	Clotting Time
DAMP	Damage-associated Molecular Patterns
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation
DNA	Desoxyribonucleic Acid
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine
exRNA	extracellular Ribonucleic Acid
FSAP	Factor-VII-Activating Protease
GE	Genome Equivalent
GOT	Glutamate-Oxalacetate-Transaminase
GP	Glycoprotein

Abkürzungsverzeichnis

GPT	Glutamate-Pyruvate-Transaminase
HIV	Human Immunodeficiency Virus
INR	International Normalized Ratio
ISF	International Sepsis Forum
LDH	Laktatdehydrogenase
LI	Lyse Index
MAP	Mean Arterial Pressure
MCF	Maximum Clot Firmness
MEWS	Modified Early Warning Score
mtDNA	free circulating mitochondrial Desoxyribonucleic Acid
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NEWS	National Early Warning Score
NSAID	Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs
PAMP	Pathogen-associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCT	Procalcitonin
PGE1	Prostaglandin E1
PRR	Pattern-Recognition Receptors
qSOFA	quick Sequential Organ Failure Assessment
RCF	Relative Centrifugal Force
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Realtime-Polymerase Chain Reaction
SAPS II	Simplified Acute Physiology Score II
SBP	Systolic Blood Pressure

Abkürzungsverzeichnis

SCCM	Society of Critical Care Medicine
SD	Standard Deviation
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SSC	Surviving Sepsis Campaign
TRAP	Thrombin Receptor Activator
TU	Transcriptional Units
TXA2	Thromboxan A2

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Messprinzip einer ROTEM [®] -Messung	23
Abbildung 2	Beispiel einer ROTEM [®] -Messung	23
Abbildung 3	Beispiel einer Multiplate [®] -Analyse	25
Abbildung 4	Schematische Darstellung der Wirkmechanismen der unterschiedlichen Multiplate [®] Tests	26
Abbildung 5	Konzentrationen von cfDNA und exRNA der drei Studienkollektive zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten	35
Abbildung 6	Korrelation von cfDNA Konzentration zu ROTEM [®] Gerinnungszeit (CT) in den unterschiedlichen gemessenen Kanälen	36
Abbildung 7	Korrelation von exRNA zu NATEM Gerinnungszeit (CT) und maximale Gerinnselfestigkeit (MCF)	38
Abbildung 8	Konzentration von cfDNA und exRNA bei Patienten mit Sepsis gruppiert nach Markern der Nierenfunktion	41
Abbildung 9	Konzentration von cfDNA und exRNA bei Patienten mit Sepsis gruppiert nach Markern der Leberfunktion	41
Abbildung 10	Konzentration von cfDNA und exRNA bei Patienten mit Sepsis gruppiert nach Markern für Zellschaden und metabolischen Veränderungen	42
Abbildung 11	Konzentration von cfDNA (A) und exRNA (B) bei Patienten mit Sepsis an verschiedenen Zeitpunkten gruppiert nach 28-Tages-Überleben	43

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Definition des Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)	1
Tabelle 2	Diagnosekriterien der Sepsis nach Surviving Sepsis Campaign 2012	4
Tabelle 3	Darstellung der Ein- und Ausschlusskriterien der drei Studienkollektive	20
Tabelle 4	Bedeutung der Messwerte nach Leitfaden ROTEM [®] -Analyse 07-2015	22
Tabelle 5	Primer und Sonden Sequenzen und Zyklusbedingungen für die PCR-Quantifizierung	29
Tabelle 6	Baseline-Charakteristika des Studienkollektivs	33
Tabelle 7	Gemessene Konzentrationen von cfDNA (in GE) und exRNA (in TU) im Median (Reichweite)	34
Tabelle 8	Korrelation von Routineparametern, ROTEM [®] - und Multiplate [®] -Messungen mit Plasmakonzentration von cfDNA und exRNA	37
Tabelle 9	Parameter für Leber, Nieren und allgemeinen Zellschaden in Korrelation zu Nukleinsäuren bei septischen Patienten über alle Zeitpunkte	40

12 Literaturverzeichnis

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* 1992; 101: 1644–1655.
2. Website der Surviving Sepsis Campaign, SCCM History of Surviving Sepsis Campaign, <https://www.sccm.org/SurvivingSepsisCampaign/About-SSC/History>.
3. Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, et al. The Surviving Sepsis Campaign: Results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Intensive Care Med* 2010; 36: 222–231.
4. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31: 1250–1256.
5. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 2013; 41: 580–637.
6. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* 2017; 43: 304–377.
7. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801–810.
8. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med* 2021; 49: e1063-e1143.
9. Churpek MM, Snyder A, Han X, et al. Quick Sepsis-related Organ Failure Assessment, Systemic Inflammatory Response Syndrome, and Early Warning Scores for Detecting Clinical Deterioration in Infected Patients outside the Intensive Care Unit. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 195: 906–911.
10. Fleischmann C, Hartmann M, Hartog CS, et al. Epidemiology of Sepsis in Germany: Incidence, Mortality And Associated Costs of Care 2007-2013. *Intensive Care Med Exp* 2015; 3: A50.

11. <https://innovationsfonds.g-ba.de/beschluesse/optimise-validierung-und-optimierung-der-nutzbarkeit-von-routinedaten-zur-qualitaetsverbesserung-des-sepsis-managements-im-krankenhaus.95>
12. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, et al. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 2007; 35: 1244–1250.
13. Levy MM, Artigas A, Phillips GS, et al. Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: A prospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases* 2012; 12: 919–924.
14. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: Analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet* 2020; 395: 200–211.
15. Vincent J-L, Jones G, David S, et al. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: A systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2019; 23: 196.
16. Engel C, Brunkhorst FM, Bone H-G, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: Results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007; 33: 606–618.
17. Thomas L. Germs. *N Engl J Med* 1972; 287: 553–555.
18. Uhle F et al. Sepsis und Multiorganversagen – Pathophysiologie der Sepsis. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2015: 114–121.
19. Lau GW, Hassett DJ and Britigan BE. Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Microbiol* 2005; 13: 389–397.
20. Vollmar B. Pathophysiologische Grundlagen der chirurgisch-bedingten Sepsis. *Chirurg* 2011; 82: 199–207.
21. Denning N-L, Aziz M, Gurien SD, et al. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol* 2019; 10: 2536.
22. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care* 2011; 15: R183.
23. Arens C, Bajwa SA, Koch C, et al. Sepsis-induced long-term immune paralysis--results of a descriptive, explorative study. *Crit Care* 2016; 20: 93.
24. Engelmann B and Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 34–45.

25. Camerer E, Kolstø A-B and Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thrombosis Research* 1996; 81: 1–41.
26. Angus DC and van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013; 369: 840–851.
27. van der Poll T, Boer JD de and Levi M. The effect of inflammation on coagulation and vice versa. *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24: 273–278.
28. Pawlinski R, Wang J-G, Owens AP, et al. Hematopoietic and nonhematopoietic cell tissue factor activates the coagulation cascade in endotoxemic mice. *Blood* 2010; 116: 806–814.
29. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, et al. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 19–48.
30. Rassow J. *Duale Reihe Biochemie*. 3rd rev. ed. Stuttgart: Thieme, 2012.
31. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 906: 161–168.
32. Kovach MA and Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 2012; 25: 321–327.
33. Papayannopoulos V and Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 2009; 30: 513–521.
34. Jorch SK and Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med* 2017; 23: 279–287.
35. Hecker A, Uhle F, Schwandner T, et al. Diagnostics, therapy and outcome prediction in abdominal sepsis: Current standards and future perspectives. *Langenbecks Arch Surg* 2014; 399: 11–22.
36. Moore LJ, Moore FA, Todd SR, et al. Sepsis in general surgery: The 2005-2007 national surgical quality improvement program perspective. *Arch Surg* 2010; 145: 695–700.
37. Steinberg SM. Bacterial translocation: What it is and what it is not. *The American Journal of Surgery* 2003; 186: 301–305.
38. Hecker A, Hecker B, Kipfmüller K, et al. Diagnostik und Therapie des akuten Abdomens. *Med Klin Intensivmed Notfmed* 2014; 109: 445-56; quiz 457-8.
39. Vourc'h M, Roquilly A and Asehnoune K. Trauma-Induced Damage-Associated Molecular Patterns-Mediated Remote Organ Injury and Immunosuppression in the Acutely Ill Patient. *Front Immunol* 2018; 9: 1330.

40. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: All we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1–5.
41. Hecker A, Reichert M, Reuß CJ, et al. Intra-abdominal sepsis: New definitions and current clinical standards. *Langenbecks Arch Surg* 2019; 404: 257–271.
42. Welsch T, Frommhold K, Hinz U, et al. Persisting elevation of C-reactive protein after pancreatic resections can indicate developing inflammatory complications. *Surgery* 2008; 143: 20–28.
43. Davies GR, Mills GM, Lawrence M, et al. The role of whole blood impedance aggregometry and its utilisation in the diagnosis and prognosis of patients with systemic inflammatory response syndrome and sepsis in acute critical illness. *PLoS ONE* 2014; 9: e108589.
44. Müller MC, Meijers JCM, Vroom MB, et al. Utility of thromboelastography and/or thromboelastometry in adults with sepsis: A systematic review. *Crit Care* 2014; 18: R30.
45. Levy MM, Evans LE and Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Med* 2018; 44: 925–928.
46. Hernández G, Ospina-Tascón GA, Damiani LP, et al. Effect of a Resuscitation Strategy Targeting Peripheral Perfusion Status vs Serum Lactate Levels on 28-Day Mortality Among Patients With Septic Shock: The ANDROMEDA-SHOCK Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2019; 321: 654–664.
47. Sandiumenge A, Diaz E, Bodí M, et al. Therapy of ventilator-associated pneumonia. A patient-based approach based on the ten rules of "The Tarragona Strategy". *Intensive Care Med* 2003; 29: 876–883.
48. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, et al. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 2009; 136: 1237–1248.
49. Marshall JC, Maier RV, Jimenez M, et al. Source control in the management of severe sepsis and septic shock: an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004; 32: S513-26.
50. Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock. *The Lancet* 2018; 392: 75–87.

51. Thomas-Rüddel DO, Poidinger B, Kott M, et al. Influence of pathogen and focus of infection on procalcitonin values in sepsis patients with bacteremia or candidemia. *Crit Care* 2018; 22: 128.
52. Qu J, Feng P, Luo Y, et al. Impact of hepatic function on serum procalcitonin for the diagnosis of bacterial infections in patients with chronic liver disease: A retrospective analysis of 324 cases. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95: e4270.
53. Dong R, Wan B, Lin S, et al. Procalcitonin and Liver Disease: A Literature Review. *J Clin Transl Hepatol* 2019; 7: 51–55.
54. Heyland DK, Johnson AP, Reynolds SC, et al. Procalcitonin for reduced antibiotic exposure in the critical care setting: A systematic review and an economic evaluation. *Crit Care Med* 2011; 39: 1792–1799.
55. Parlato M, Philippart F, Rouquette A, et al. Circulating biomarkers may be unable to detect infection at the early phase of sepsis in ICU patients: The CAPTAIN prospective multicenter cohort study. *Intensive Care Med* 2018; 44: 1061–1070.
56. van der Poll T and Levi M. Crosstalk between inflammation and coagulation: The lessons of sepsis. *Curr Vasc Pharmacol* 2012; 10: 632–638.
57. Bhagirath VC, Dwivedi DJ and Liaw PC. Comparison of the Proinflammatory and Procoagulant Properties of Nuclear, Mitochondrial, and Bacterial DNA. *Shock* 2015; 44: 265–271.
58. Magna M and Pisetsky DS. The Alarmin Properties of DNA and DNA-associated Nuclear Proteins. *Clin Ther* 2016; 38: 1029–1041.
59. Rhodes A, Wort SJ, Thomas H, et al. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit Care* 2006; 10: R60.
60. Pugin J. How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Ann Intensive Care* 2012; 2: 27.
61. Garnacho-Montero J, Huici-Moreno MJ, Gutiérrez-Pizarraya A, et al. Prognostic and diagnostic value of eosinopenia, C-reactive protein, procalcitonin, and circulating cell-free DNA in critically ill patients admitted with suspicion of sepsis. *Crit Care* 2014; 18: R116.
62. Maruchi Y, Tsuda M, Mori H, et al. Plasma myeloperoxidase-conjugated DNA level predicts outcomes and organ dysfunction in patients with septic shock. *Crit Care* 2018; 22: 176.

63. Dwivedi DJ, Toltl LJ, Swystun LL, et al. Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Crit Care* 2012; 16: R151.
64. Gould TJ, Lysov Z and Liaw PC. Extracellular DNA and histones: Double-edged swords in immunothrombosis. *J Thromb Haemost* 2015; 13 Suppl 1: S82-91.
65. Yamanouchi S, Kudo D, Yamada M, et al. Plasma mitochondrial DNA levels in patients with trauma and severe sepsis: Time course and the association with clinical status. *J Crit Care* 2013; 28: 1027–1031.
66. Liaw PC, Ito T, Iba T, et al. DAMP and DIC: The role of extracellular DNA and DNA-binding proteins in the pathogenesis of DIC. *Blood Rev* 2016; 30: 257–261.
67. Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PLoS ONE* 2016; 11: e0148142.
68. Gould TJ, Vu TT, Stafford AR, et al. Cell-Free DNA Modulates Clot Structure and Impairs Fibrinolysis in Sepsis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35: 2544–2553.
69. Preissner KT. Extracellular RNA. A new player in blood coagulation and vascular permeability. *Hamostaseologie* 2007; 27: 373–377.
70. Geddings JE and Mackman N. New players in haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost* 2014; 111: 570–574.
71. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 6388–6393.
72. Andreas Calatzis, Michael Spannagl, Matthias Vorweg. ROTEM® Analyse Zielgerichtete Behandlung akuter Hämostasestörungen 2015.
73. Görlinger K, Jambor C, Dirkmann D, et al. Messung der Thrombozytenfunktion mit Point-of-Care-Methoden. *Herz* 2008; 33: 297–305.
74. Moore LJ, McKinley BA, Turner KL, et al. The epidemiology of sepsis in general surgery patients. *J Trauma* 2011; 70: 672–680.
75. Barrat FJ, Elkon KB and Fitzgerald KA. Importance of Nucleic Acid Recognition in Inflammation and Autoimmunity. *Annu Rev Med* 2016; 67: 323–336.
76. Su W, Aloji MS and Garden GA. MicroRNAs mediating CNS inflammation: Small regulators with powerful potential. *Brain Behav Immun* 2016; 52: 1–8.
77. Neumann E, Hasseli R, Lange U, et al. The Role of Extracellular Nucleic Acids in Rheumatoid Arthritis. *Curr Pharm Biotechnol* 2018; 19: 1182–1188.

78. Holmannova D, Borska L, Andrys C, et al. The Impact of Psoriasis and Metabolic Syndrome on the Systemic Inflammation and Oxidative Damage to Nucleic Acids. *J Immunol Res* 2020; 2020: 7352637.
79. Marques-Rocha JL, Samblas M, Milagro FI, et al. Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. *The FASEB Journal* 2015; 29: 3595–3611.
80. Tielking K, Fischer S, Preissner KT, et al. Extracellular RNA in Central Nervous System Pathologies. *Front Mol Neurosci* 2019; 12: 254.
81. Saukkonen K, Lakkisto P, Pettilä V, et al. Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. *Clin Chem* 2008; 54: 1000–1007.
82. Essandoh K and Fan G-C. Role of extracellular and intracellular microRNAs in sepsis. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842: 2155–2162.
83. Wang H, Zhang P, Chen W, et al. Four serum microRNAs identified as diagnostic biomarkers of sepsis. *J Trauma Acute Care Surg* 2012; 73: 850–854.
84. Lo YM, Rainer TH, Chan LY, et al. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem* 2000; 46: 319–323.
85. Li Q, Tong Y, Wang H, et al. Origin of Sepsis Associated with the Short-Term Mortality of Patients: A Retrospective Study Using the eICU Collaborative Research Database. *Int J Gen Med* 2021; 14: 10293–10301.
86. Hamaguchi S, Akeda Y, Yamamoto N, et al. Origin of Circulating Free DNA in Sepsis: Analysis of the CLP Mouse Model. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 614518.
87. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532–1535.
88. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007; 13: 463–469.
89. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, et al. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* 2012; 12: 324–333.
90. Martin L, Koczera P, Simons N, et al. The Human Host Defense Ribonucleases 1, 3 and 7 Are Elevated in Patients with Sepsis after Major Surgery--A Pilot Study. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 294.
91. Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, et al. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004; 23: 879–883.

92. Ostrowski SR, Windeløv NA, Ibsen M, et al. Consecutive thrombelastography clot strength profiles in patients with severe sepsis and their association with 28-day mortality: A prospective study. *J Crit Care* 2013; 28: 317.e1-11.
93. Sivula M, Pettilä V, Niemi TT, et al. Thromboelastometry in patients with severe sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20: 419–426.
94. Adamzik M, Langemeier T, Frey UH, et al. Comparison of thrombelastometry with simplified acute physiology score II and sequential organ failure assessment scores for the prediction of 30-day survival: A cohort study. *Shock* 2011; 35: 339–342.
95. Adamzik M, Eggmann M, Frey UH, et al. Comparison of thromboelastometry with procalcitonin, interleukin 6, and C-reactive protein as diagnostic tests for severe sepsis in critically ill adults. *Crit Care* 2010; 14: R178.
96. Collins PW, Macchiavello LI, Lewis SJ, et al. Global tests of haemostasis in critically ill patients with severe sepsis syndrome compared to controls. *Br J Haematol* 2006; 135: 220–227.
97. Longstaff C, Hogwood J, Gray E, et al. Neutralisation of the anti-coagulant effects of heparin by histones in blood plasma and purified systems. *Thromb Haemost* 2016; 115: 591–599.
98. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010; 464: 104–107.
99. Koch A, Meesters MI, Scheller B, et al. Systemic endotoxin activity correlates with clot formation: An observational study in patients with early systemic inflammation and sepsis. *Crit Care* 2013; 17: R198.
100. Nakazawa F, Kannemeier C, Shibamiya A, et al. Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP). *Biochem J* 2005; 385: 831–838.
101. Tanaka K, Koike Y, Shimura T, et al. In vivo characterization of neutrophil extracellular traps in various organs of a murine sepsis model. *PLoS ONE* 2014; 9: e111888.
102. Kumar S, Gupta E, Kaushik S, et al. Quantification of NETs formation in neutrophil and its correlation with the severity of sepsis and organ dysfunction. *Clin Chim Acta* 2019; 495: 606–610.

103. McDonald B, Davis RP, Kim S-J, et al. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood* 2017; 129: 1357–1367.
104. Morrell ED, Kellum JA, Pastor-Soler NM, et al. Septic acute kidney injury: Molecular mechanisms and the importance of stratification and targeting therapy. *Crit Care* 2014; 18: 501.
105. Moreira VG, Prieto B, Rodríguez JSM, et al. Usefulness of cell-free plasma DNA, procalcitonin and C-reactive protein as markers of infection in febrile patients. *Ann Clin Biochem* 2010; 47: 253–258.
106. Rahman MR, Islam T, Gov E, et al. Identification of Prognostic Biomarker Signatures and Candidate Drugs in Colorectal Cancer: Insights from Systems Biology Analysis. *Medicina (Kaunas)* 2019; 55.
107. Huang X, Yuan T, Liang M, et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 2015; 67: 33–41.
108. Schneck E, Mallek F, Schiederich J, et al. Flow Cytometry-Based Quantification of Neutrophil Extracellular Traps Shows an Association with Hypercoagulation in Septic Shock and Hypocoagulation in Postsurgical Systemic Inflammation-A Proof-of-Concept Study. *J Clin Med* 2020; 9.
109. Schneck E, Edinger F, Hecker M, et al. Blood Levels of Free-Circulating Mitochondrial DNA in Septic Shock and Postsurgical Systemic Inflammation and Its Influence on Coagulation: A Secondary Analysis of a Prospective Observational Study. *J Clin Med* 2020; 9.
110. Kolaczowska E, Jenne CN, Surewaard BGJ, et al. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Commun* 2015; 6: 6673.
111. Mai SHC, Khan M, Dwivedi DJ, et al. Delayed but not Early Treatment with DNase Reduces Organ Damage and Improves Outcome in a Murine Model of Sepsis. *Shock* 2015; 44: 166–172.
112. Meng W, Paunel-Görgülü A, Flohé S, et al. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit Care* 2012; 16: R137.

13 Anhang

13.1 Materialverzeichnis

Blutröhrchen

	S-Monovette® 2,7 ml r-Hirudin	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	S-Monovette® 7,5 ml K3E	
	S-Monovette® 3 ml 9NC	

BGA

Analysegerät	ABL800 Flex Analysator	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Blutröhrchen	PICO50 Arterial blood Sampler	

ROTEM/Multiplate

Spitzen für automatische Pipette	Biohit Optifit Tip	Sartorius, Göttingen, Deutschland
	Tip Tray eLine	Tem Innovations, München, Deutschland

ROTEM

Analysegeräte	ROTEM® delta 3610	Tem Innovations, München, Deutschland
	ROTEG® 05	
Messzellen	Cup & Pin pro	
Reagenzien	star-tem®	
	r ex-tem®	
	in-tem®	
	fib-tem®	
	t ap-tem®	
	hep-tem®	

Multiplate

Analysegerät	Multiplate® 5.0	Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Schweiz
NaCl-Röhrchen	Pre-heating Tubes	
Messzellen	Test Cells	
Reagenzien	ADPtest	
	ASPItest	
	TRAPtest	
Aufbewahrungsgefäße für gelöste Reagenzien	Aliquot Vials for ADPtest	
	Aliquot Vials for ASPItest	B. Braun, Melsungen, Deutschland
	Aliquot Vials for TRAPtest	
NaCl-Lösung	NaCl 0,9 % 10 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Destilliertes Wasser	Aqua dest 10 ml	

Pipetten und Zubehör

Pipetten	0,1-2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	0,5-10 µl	
	10-100 µl	
	100-1000 µl	
	Pipetboy acu	
Spitzen	Cellstar® 10 ml und 25 ml Serologische Pipette	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
	SafeSeal-Tips® professional 10 µl	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
	Maxymum Recovery® 100 µl und 1000 µl	Axygen Scientific, Union City, CA, USA
	2,5 µl Spitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

DNA-Isolation

Isolationskit	QIAamp® DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Gefäße	Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Ethanol	Ethanol absolute	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

RNA-Isolation

Isolationskit	Plasma/Serum Circulating and Exosomal RNA Purification (Slurry Format)	Norgen Biotek, Thorold, Kanada
Gefäße	Cellstar® Tubes 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
	Reagiergefäß 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Ethanol	Ethanol absolute	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

RT PCR

PCR-Platten	MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Klebefolie	Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Nuclease-Free Water	Qiagen, Venlo, Niederlande
DNA-Standardreihe	10x10 ⁶ Zellen aus Zellreihe A-549 Passage 12	
RNA-Standardreihe	10x10 ⁶ Zellen aus Zellreihe A 549 Passage 20	
	RNeasy Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
DNA-RT PCR	TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	β-globin fwd Primer: GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG A	
	β-globin rev Primer: CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG	
	Sonde: 6-FAM-AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GG- TAMRA	

RNA-RT PCR	Ambion® 2x RT PCR Buffer	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	Ambion® 25x RT PCR Enzyme	
	Ambion® Nuclease-Free Water	
	TaqMan® Gene Expression Assay, PN 4351370	
Gefäß	Eppendorf® Tubes, 5,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Benutzte Geräte

Vortex	MS1 Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Wasserbad	Kottermann Wasserbad 20l	Kottermann, Uetze, Deutschland
Zentrifugen	Biofuge Pico	Heraeus, Hanau, Deutschland
	Mikrofuge RF	Andreas Hettich, Tuttligen, Deutschland
	Mikro 200 R	
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoDrop	NanoDrop 1000 Spectrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Real-Time PCR	StepOnePlus® Real-Time PCR System	Applied Biosystems® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Datensysteme

KAOS-Med	Version 5.7.7.8	Uniklinikum Gießen - Abteilung für Klinische und Administrative DV (AKAD), Gießen, Deutschland
ICU-Data	Version 3.5.0.7259	IMESO, Gießen, Deutschland

Softwareversionen

Multiplate	Multplate Analyzer 2015	
ROTEM® delta 3610	Frontend Version: 2.4.1 Datenbank Version: 1.22	
ROTEG® 05	Frontend Version: 1.0.5 Datenbank Version: 1.19	
Real-Time PCR	StepOne™ Software, For StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems, Version 2.2.3	Applied Biosystems® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
SPSS	Version 22	IBM, Armonk, NY, USA

13.2 Abdruckgenehmigung ROTEM®



A Werfen Company

Instrumentation Laboratory
Tem Innovations GmbH • Martin-Kollar-Strasse 13-15 • 81829 Munich/Germany

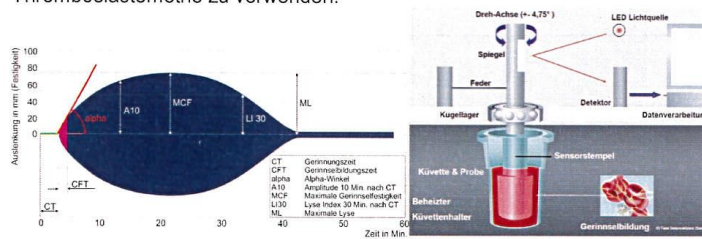
Herr Omar Samara
Doktorarbeit
Hamburg

2018-01-10

Abdruckgenehmigung

Sehr geehrter Herr Samara,

Hiermit geben wir Ihnen die Erlaubnis die Abbildungen der ROTEM Parameter sowie der Thromboelastometrie zu verwenden.



Bitte vermerken Sie in den entsprechenden Abbildungslegenden „Mit freundlicher Genehmigung von Instrumentation Laboratory, Bedford“ oder „By courtesy of Instrumentation Laboratory, Bedford“.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Nils Tomi
Product Manager, PBM

Tem Innovations GmbH
Instrumentation Laboratory

Our Passion.
Your Results.

Instrumentation Laboratory
instrumentationlaboratory.com

Tem Innovations GmbH
Martin-Kollar-Strasse 13-15
81829 Munich, Germany

www.rotam.de
Phone: +49 (0) 89 45 42 95 0
Fax: +49 (0) 89 45 42 95 22
E-Mail: rotam.info@www.com

CEO: Hans-Martin Combé/Javier Gomez
HRB: 132082 Amtsgericht München
Ust.-IdNr.: DE 209487304
St.-Nr.: 143/185/60952 V002

13.3 Abdruckgenehmigung Multiplate®

Bruhns, Grit <grit.bruhns@roche.com>

Do 16.04.2020, 15:08

Samara, Omar; Kundenservice-Gerinnung, Mannheim <m Mannheim.kundenservice-gerinnung@roche.com> ✉

Sehr geehrter Herr Samara

Ihre Anfrage zu Bildrechten von Multiplate hat mich erreicht.

Gerne können Sie Abbildungen zeigen. Bitte beachten Sie, dass das Copyright bei Roche liegt. Bitte denken Sie bei Verwendung des Bildes freundlicherweise an einen Urheberhinweis.

Vielen Dank und Grüße

Grit Bruhns

Roche Diagnostics Deutschland GmbH
DEGPMH..6195
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim / Germany

Phone: +496217591794

Fax: +496217599374

Mobile: +491735861431

mailto:grit_bruhns@roche.com

www.roche.com

Roche Diagnostics Deutschland GmbH

Sandhofer Straße 116; D-68305 Mannheim; Telefon +49-621-759-0; Telefax +49-621-759-2890

Sitz der Gesellschaft: Mannheim - Registergericht: AG Mannheim HRB 708167 - Geschäftsführung: Christian Paetzke - Aufsichtsratsvorsitzender: Dr. Thomas Schinecker

14 Publikationsverzeichnis

04.12.2015 **„Circulating nucleic acids in human sepsis and their impact on coagulation – a pilot study“**

Postervorstellung auf dem 15. Kongress der Deutschen

Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin

April 2017 **„Plasma DNA and RNA differentially impact coagulation during abdominal sepsis – an explorative study“**

Schneck E, Samara O, Koch C, Hecker A, Padberg W,

Lichtenstern C, Weigand MA, Uhle F.

J Surg Res. 2017 Apr; 210: 231-243

15 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

16 Danksagung

Zunächst einmal möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ohne die bedingungslose Unterstützung meiner Eltern und der ständigen Erinnerung mit der Frage „Wie kommst du mit der Doktorarbeit voran?“, hätte ich es nicht so weit geschafft. Ich danke und liebe euch!

Fachlich möchte ich mich bei meinem initialen Doktorvater Prof. Dr. Weigand für die Überlassung des Themas bedanken und die Betreuung bis zu seinem beruflichen Wechsel nach Heidelberg.

Besonderen Dank gilt meinem Betreuer Priv.-Doz. Dr. Emmanuel Schneck! Er stand mir von Anfang an mit Rat und Tat und bei allen offenen Fragen zur Seite. Er hat immer an mich geglaubt und mich unterstützt. Vielen Dank Emmo!

Auch möchte ich Priv.-Doz. Dr. Christian Koch und Dr. Florian Uhle danken, die beide einen wesentlichen Anteil in der Konzeption und der Durchführung, sowie der Auswertung dieser Studie hatten.

Außerdem bedanke ich mich beim gesamten Laborteam der Anästhesie, und an dieser Stelle insbesondere Frau Ilona Magel, die mich immer bei den Untersuchungen und Tests unterstützt haben.