

**Assoziation des Adipokins Chemerin mit
Inflammation und Glukosemetabolismus bei
peritonealer Sepsis**

Dissertation

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

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Paul Horn

geboren am 18. Mai 1989 in Berlin-Köpenick

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ralf Alexander Claus, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. Andreas Stallmach, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. Christa Büchler, Universitätsklinikum Regensburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.10.2016

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	V
1. Einleitung	1
1.1. Wirtsantwort bei Sepsis – Systemische Inflammation und Stresshyperglykämie	1
1.2. Adipositas-induzierte Insulinresistenz und Fettgewebsinflammation	5
1.3. Chemerin	7
2. Ziele und Hypothesen	13
3. Material und Methoden	14
3.1. Studiendesign	14
3.2. Patientencharakterisierung und Ethikvotum	14
3.3. Blut- und Gewebeentnahme am Menschen	16
3.4. Klinische Chemie	16
3.5. Konfirmatorische Tierstudie	17
3.6. Inflammationsmodell in der Zellkultur an HepaRG-Zellen	18
3.7. Quantifizierung des zirkulierenden Chemerins	20
3.8. Genexpressionsanalysen	20
3.9. Histologische Aufarbeitung des humanen viszeralen Fettgewebes	25
3.10. Statistik	28
4. Ergebnisse	30
4.1. Charakterisierung der Studienpopulation	30
4.2. Zirkulierendes Chemerin bei humaner und muriner peritonealer Sepsis	33
4.3. Genexpression von Chemerin und seinen Rezeptoren im viszeralen Fettgewebe	36
4.4. Genexpression von Chemerin und seinen Rezeptoren in der murinen Leber	38
4.5. Chemerinexpression im Inflammationsmodell der HepaRG-Zellen	40
4.6. Assoziation mit Parametern der systemischen Inflammation	42
4.7. Assoziation mit Parametern des Glukosemetabolismus	45
4.8. Identifikation unabhängiger Variablen	48
4.9. Assoziation mit Fettgewebsmakrophagen und Adipozytengröße	49
4.10. Assoziation mit der Krankheitsschwere und –prognose	52
4.11. Validierung in einer zweiten Studienkohorte	54
4.12. Prognostischer Wert des Chemerins in Abhängigkeit vom glykämischen Status	59

5. Diskussion	62
5.1 Studiendesign	62
5.2 Erhöhtes zirkulierendes Chemerin bei peritonealer Sepsis	63
5.3 Der Bildungsort von Chemerin in der Sepsis bleibt unbekannt	65
5.4 Chemerin ist assoziiert mit systemischer Inflammation	68
5.5 Chemerin ist assoziiert mit dysreguliertem Glukosemetabolismus	69
5.6 Chemerin ist assoziiert mit Fettgewebsinflammation	71
5.7 Chemerin ist assoziiert mit Mortalität und Erkrankungsschwere	72
5.8 Eignung des Mausmodells zum Studium von Chemerin bei Sepsis	73
6. Schlussfolgerungen und Ausblick.....	75
7. Literaturverzeichnis.....	77
8. Anhang	86
8.1 Diagnosekriterien Sepsis	86
8.2 Anamnesebogen	87
8.3 Vergleich der OP-Indikationen	91
8.4 Geschlechtsunterschied Sepsispatienten	92
8.5 Grenzwerte Perzentilenanalysen	93
8.6 Assoziation mit SAPS und SOFA	93
9. Danksagung	94
10. Ehrenwörtliche Erklärung.....	95

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACCP	<i>American College of Chest Physicians</i>
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APACHEII	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II</i>
AU	<i>Arbitrary Units</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
cDNA	codogene Desoxyribonukleinsäure
CLS	<i>Crown-like structures</i>
CSS	<i>Clinical Severity Score</i>
CRP	C-reaktives Protein
Ct	<i>Cycle threshold</i>
E	Effizienz
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
γ GT	gamma-Glutamyltransferase
HbA _{1c}	Hämoglobin A _{1c}
HFD	Hoch-Fett-Diät
HOMA-IR	<i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i>
IL	Interleukin
IFN γ	Interferon γ
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat 1
KD	Kontroll-Diät
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
NCEP-ATPIII	<i>National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III</i>

Abkürzungsverzeichnis

PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PCI	<i>peritoneal contamination and infection</i>
PRR	Pattern recognition receptor
qRT PCR	quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RQI	<i>RNA quality indicator</i>
SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SHG	Stresshyperglykämie
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
Tab.	Tabelle
T2D	Diabetes mellitus, Typ 2
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VAT	<i>visceral adipose tissue</i> , viszerales Fettgewebe
ACTB	beta-Actin
CCRL2	C-C chemokine receptor-like 2
CD68	cluster of differentiation 68
CMKLR1	chemokine-like receptor 1
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPR1	G protein-coupled receptor 1
GUSB	B-Glucuronidase
HMBS	Hydroxymethylbilan-Synthase
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
RARRES2	retinoic acid receptor responder 2
TIG2	tazarotene inducible gene 2

Zusammenfassung

Sepsis ist charakterisiert durch hochgradige Inflammation und eine gleichzeitig auftretende akute Dysregulation des Glukosemetabolismus. Im Rahmen dieser metabolischen Dysregulation kommt es häufig zur Stresshyperglykämie, die mit erhöhter Krankheitsschwere und Mortalität assoziiert ist. Neben der gesteigerten hepatischen Glukoneogenese, einer peripheren Insulinresistenz mit konsekutiv verminderter Glukoseaufnahme und der Wirkung von Glukokortikoiden, Katecholaminen und proinflammatorischen Mediatoren werden Adipokine zunehmend als an der Regulation des Glukosemetabolismus bei Sepsis beteiligt angesehen. Das Adipokin Chemerin ist für verschiedene Erkrankungen, insbesondere den Typ 2 Diabetes mellitus (T2D), als mit Inflammation und Glukosemetabolismus assoziiert beschrieben. Wichtigster Chemerinrezeptor ist der chemokine-like receptor 1 (CMKLR1). Als weitere Rezeptoren sind C-C chemokine receptor-like 2 (CCRL2) und G protein-coupled receptor 1 (GPR1) beschrieben. Bislang ist vollkommen unklar, ob und wenn ja in welchem Maße Chemerin in die Wirtsreaktion bei Sepsis involviert ist.

Ziel dieser Arbeit ist es, erstmals eine mögliche Beteiligung von Chemerin an der Wirtsreaktion bei Sepsis nachzuweisen und zudem weitere Erkenntnisse über die Verknüpfung von Chemerin mit Vorgängen der hochgradigen Inflammation und der metabolischen Dysregulation im Allgemeinen zu gewinnen. Zunächst soll nachgewiesen werden, inwieweit es zu Veränderungen des zirkulierenden Chemerins kommt und in welchem Ausmaß das viszerale Fettgewebe hiermit im Zusammenhang steht. Zur Herausarbeitung möglicher pathophysiologischer und klinischer Funktionen des Chemerins soll zudem die Assoziation von Chemerin mit Parametern der systemischen Inflammation, der Stresshyperglykämie, der Fettgewebsinflammation sowie der Krankheitsschwere und der Mortalität untersucht werden.

Hierzu verknüpft diese Arbeit Untersuchungen am Menschen im Rahmen zweier Querschnittsstudien und eine tierexperimentelle Studie am PCI-Modell der peritonealen Sepsis bei der Maus. Zum Vergleich mit der Regulation des Chemerins bei chronischer Inflammation und Glukosedysregulation wurden, neben Kontrollen, Patienten mit T2D sowie ein T2D-Modell der Maus eingeschlossen. Es wurden Blutproben und Gewebeproben des viszeralen Fettgewebes (VAT) gewonnen und hinsichtlich der Chemerinexpression untersucht. Aus der tierexperimentellen Studie stand auch Lebergewebe zur Verfügung. Die Konzentration des zirkulierenden Chemerins im

Zusammenfassung

humanen Serum und murinen Plasma wurde mittels ELISA bestimmt, die Genexpression im VAT und in der murinen Leber mit quantitativer Reverse-Transkriptase PCR. Im VAT wurden histologisch die Adipozytengröße und die Zahl CD68⁺ Makrophagen in der Immunhistochemie untersucht. Zur Korrelation mit klinischen Parametern wurden Routinelabordaten hinzugezogen.

Chemerin scheint an der Wirtsreaktion bei Sepsis beteiligt zu sein, da es erhöhte Serumspiegel bei diesem Krankheitsbild im Vergleich zu Kontroll- und T2D-Patienten aufwies. Im viszeralen Fettgewebe und in der murinen Leber war seine Expression jedoch herabgesetzt. Bei Sepsispatienten war eine positive Korrelation der Fettgewebismakrophagenzahl mit dem zirkulierenden Chemerin zu finden, was eine Beteiligung des VAT an der Regulation der Chemerinsynthese demnach wahrscheinlich macht. Die Expression von CMKLR1 und GPR1 im viszeralen Fettgewebe war bei Sepsispatienten nicht signifikant verändert, die CCRL2-Expression jedoch signifikant erhöht. Die wesentlichen Daten zum Chemerin hinsichtlich der Gruppenunterschiede ließen sich im Mausmodell reproduzieren und waren auch im murinen Lebergewebe vergleichbar.

Es war eine positive Korrelation mit der Leukozytenzahl in der Sepsis und höhere Chemerinspiegel bei erhöhtem C-reaktiven Protein (CRP) beim T2D nachweisbar. Bei Sepsispatienten war Chemerin nach Adjustierung für das Geschlecht im Trend negativ mit dem CRP assoziiert. Die *Chemerin* mRNA im VAT war negativ mit der *CD68* mRNA im VAT und dem CRP assoziiert. Zudem bestand ein Zusammenhang des Chemerins mit erhöhter Plasmaglukose und Insulinresistenz, der in der zweiten Studiengruppe bestätigt werden konnte. Über die Assoziation mit Parametern der dysregulierten Glukosehomöostase und der systemischen Inflammation scheint eine Beteiligung des Chemerins an diesen Prozessen wahrscheinlich. Außerdem war Chemerin über den APACHEII Score mit einer höheren Krankheitsschwere assoziiert. In einer zweiten Patientenkohorte konnte eine Assoziation mit der Prognose, in Abhängigkeit vom glykämischen Status, aufgezeigt werden.

Somit scheint das erhöhte Chemerin an der Dysregulation der Glukosehomöostase und der systemischen Inflammation bei Sepsis beteiligt zu sein und könnte sogar prognostische Relevanz besitzen. Damit bietet sich Chemerin zur weiteren Evaluation als diagnostische oder sogar therapeutische Zielstruktur an.

1. Einleitung

1.1. Wirtsantwort bei Sepsis – Systemische Inflammation und Stresshyperglykämie

1.1.1. Definition und Pathophysiologie der Sepsis

Tagtäglich muss sich der menschliche Körper mit eindringenden Fremdorganismen auseinandersetzen. Durch die konzertierte Abfolge der lokalisierten Immunantwort kommt es im Normalfall zur Begrenzung und Beseitigung der Infektion. Durchdringt ein solcher Keim – Bakterium, Virus oder Pilz – die Körperbarriere, so werden mikrobielle Bestandteile freigesetzt. Diese, auch als pathogen associated molecular pattern (PAMPs) bezeichneten Moleküle binden an sogenannte pattern recognition receptors (PRRs), unter anderem Toll-like-Rezeptoren (TLR). Dadurch wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, in deren Folge pro- und antiinflammatorische Zytokine (z.B. Tumornekrosefaktor α , Interleukin (Il)-1, Il-6, Interferon γ (IFN γ), Il-4, Il-10) und Chemokine freigesetzt werden. Zusammen mit einer lokalen endothelialen Aktivierung führt dies zur Einwanderung von Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten, welche lokal die Infektion begrenzen und die eingedrungenen Keime beseitigen. Begleitet wird dies durch eine lokale Gerinnungsaktivierung mit dem Ziel den Gewebedefekt zu verschließen (Bauer et al. 2006, Wiersinga et al. 2014). Diese lokalisierte Entzündungsreaktion ist gekennzeichnet durch Rötung, Überwärmung, Schwellung, Schmerzen und Funktionsverlust.

Gelingt die lokale Begrenzung der Infektion nicht, können erhebliche Mengen von Erregerbestandteilen (PAMPs) und vitalen Erregern in die Blutzirkulation eindringen, was eine systemische Entzündungsreaktion zur Folge hat. Die Abwehrmechanismen, die lokal zu einer Bekämpfung der Infektion führen, treten nun im gesamten Organismus auf und schädigen den Wirt (Seeley et al. 2012). Diese systemische Inflammationsreaktion äußert sich als Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) und kann auch durch verschiedene andere Ursachen, etwa Trauma oder Ischämie, ausgelöst werden. Das SIRS umfasst Veränderungen der Körpertemperatur (Hyper- oder Hypothermie), Tachykardie, Tachypnoe und Leukozytose oder Leukozytopenie und kann diagnostiziert werden, wenn 2 der vorgenannten Kriterien erfüllt sind. Tritt dieses SIRS als Folge einer mikrobiologisch oder klinisch nachgewiesenen Infektion auf, wird die klinische Diagnose einer Sepsis gestellt. Treten Organdysfunktionen (z.B. Nierenversagen, Enzephalopathie,

Thrombozytopenie, Leberversagen) hinzu, spricht man von einer schweren Sepsis, beim Auftreten von anhaltender arterieller Hypotension trotz adäquater Volumentherapie oder einem anhaltenden Bedarf an vasoaktiven Medikamenten zur Aufrechterhaltung einer Normotonie vom septischen Schock. Die Kriterien zur Diagnose einer Sepsis, einer schweren Sepsis und des septischen Schocks der deutschen S2k-Leitlinie sind im Anhang (8.1) beigefügt (Reinhart et al. 2010).

Lange Zeit galt das Dogma, dass es in der Wirtsantwort bei Sepsis zunächst zu einer Phase der Hyperinflammation im Sinne eines Zytokinsturms kommt, die dann von einer immunsuppressiven Phase der Hypoinflammation gefolgt ist (Hotchkiss und Karl 2003). Nach diesem Konzept wurde vor allem die proinflammatorische Immunantwort als den Organismus schädigend angesehen. Allerdings laufen vom Beginn der systemischen Inflammationsantwort an pro- und antiinflammatorische Prozesse gleichzeitig ab. Vergleichbar kommt es zeitgleich zur Aktivierung und Hemmung des Gerinnungssystems und des Komplementsystems. Schädlich ist in der Wirtsantwort bei Sepsis also eher die Störung der Immun-Homöostase. Diese These wird dadurch gestützt, dass reine antiinflammatorische supportive Therapieregime in Studien bisher nicht nachhaltig erfolgreich waren (Deutschman und Tracey 2014, Hotchkiss et al. 2013).

1.1.2. Stresshyperglykämie als klinisches Problem

Begleitend zur systemischen Inflammation, mit ihren potentiellen Organschäden, sind Störungen des Glukosemetabolismus ein häufiges Phänomen bei Patienten mit Sepsis. Es kommt hierbei sowohl zu Hypoglykämien als auch zu Hyperglykämien, wobei in diesem Kontext von Stresshypoglykämie und Stresshyperglykämie gesprochen wird. Diese Störungen treten jedoch nicht isoliert bei Patienten mit Sepsis auf, sondern können auch andere kritisch Kranke betreffen, z.B. Patienten mit Polytrauma oder mit postoperativem SIRS (Dungan et al. 2009). Die Stresshyperglykämie wird in der Literatur uneinheitlich definiert. Daher wird ihre Inzidenz in verschiedenen Studien auch sehr verschieden angegeben. Nimmt man den einmaligen Anstieg der Plasmaglukose über 7,0 mmol/L als ausreichendes Kriterium – dies entspricht dem Grenzwert für die Diagnose eines Diabetes mellitus anhand der Nüchternglukose – so beträgt die Prävalenz bei kritisch Kranken während des gesamten Aufenthaltes auf der Intensivstation bis zu 98% (Finfer 2014). Schließt man Patienten mit vorbestehendem Diabetes mellitus aus und nur solche ein, die

an mindestens zwei aufeinanderfolgenden Tagen die Hyperglykämie-Kriterien der American Diabetes Association erfüllt haben (American Diabetes Association 2010), wird bei Sepsispatienten eine Inzidenz von 12,0 bis 17,7% angegeben (Leonidou et al. 2008, Umpierrez et al. 2002). Nach diesen Kriterien wird von einer Stresshyperglykämie gesprochen, wenn im venösen Plasma der Nüchtern glukosespiegel über 7,0 mmol/l oder der Zufallsglukosespiegel über 11,1 mmol/l liegt (American Diabetes Association 2010).

Patienten mit Stresshyperglykämie weisen eine höhere Mortalität im Vergleich zu Patienten ohne Stresshyperglykämie auf (Badawi et al. 2012, Leonidou et al. 2008). Die Senkung der Glukosespiegel durch Insulintherapie kann zu einer Reduktion der Mortalität führen, wobei die intensivierete Insulintherapie mit dem Ziel einer Plasmaglukose zwischen 4,4 – 6,1 mmol/l jedoch zu einem höheren Risiko unerwünschter Hypoglykämien führt (Brunkhorst et al. 2008). Als Erklärungen für die erhöhte Mortalität werden diskutiert, dass die Hyperglykämie Ausdruck einer schwerwiegenden zellulären Dysfunktion ist (Losser et al. 2010) oder auch Ausdruck vorbestehender metabolischer Erkrankungen (Dungan et al. 2009). Hinzu kommen die schädlichen Auswirkungen der erhöhten Glukosespiegel selbst (Marik und Raghavan 2004). Einige Autoren weisen auch auf die adaptive Funktion einer milden bis mäßigen Stresshyperglykämie hin, welche die zelluläre Glukoseversorgung im Rahmen der Hypozirkulation und Diffusionsstörung bei Sepsis sicherstellt (Marik und Bellomo 2013).

1.1.3. Pathophysiologie der Stresshyperglykämie

Es werden verschiedenste Mechanismen in der Entstehung der Stresshyperglykämie, bei kritisch kranken Patienten im Allgemeinen und bei Sepsispatienten im Speziellen, diskutiert. Direkte Daten zur Pathophysiologie liegen jedoch in aller Regel nicht vor, sodass meist von bekannten Mechanismen des Typ 2 Diabetes mellitus auf Veränderungen des Glukosestoffwechsels bei hochgradiger systemischer Inflammation rückgeschlossen werden muss (Marik und Raghavan 2004). Die wesentlichen bekannten intrazellulären Mechanismen, die zur Stresshyperglykämie beitragen sind zusammengefasst in Abbildung 1 stark vereinfacht dargestellt.

In der Wirtsantwort bei Sepsis kommt es zu einer massiven endogenen Freisetzung von Katecholaminen, Glukokortikoiden, Zytokinen (z.B. IL-1, IL-6, TNF α) und Glukagon (Dungan et al. 2009). Hinzu kommen exogene Einflussfaktoren, wie etwa die

therapeutische Gabe von Katecholaminen und Glukokortikoiden oder die parenterale Ernährungstherapie (Whitcomb et al. 2005).

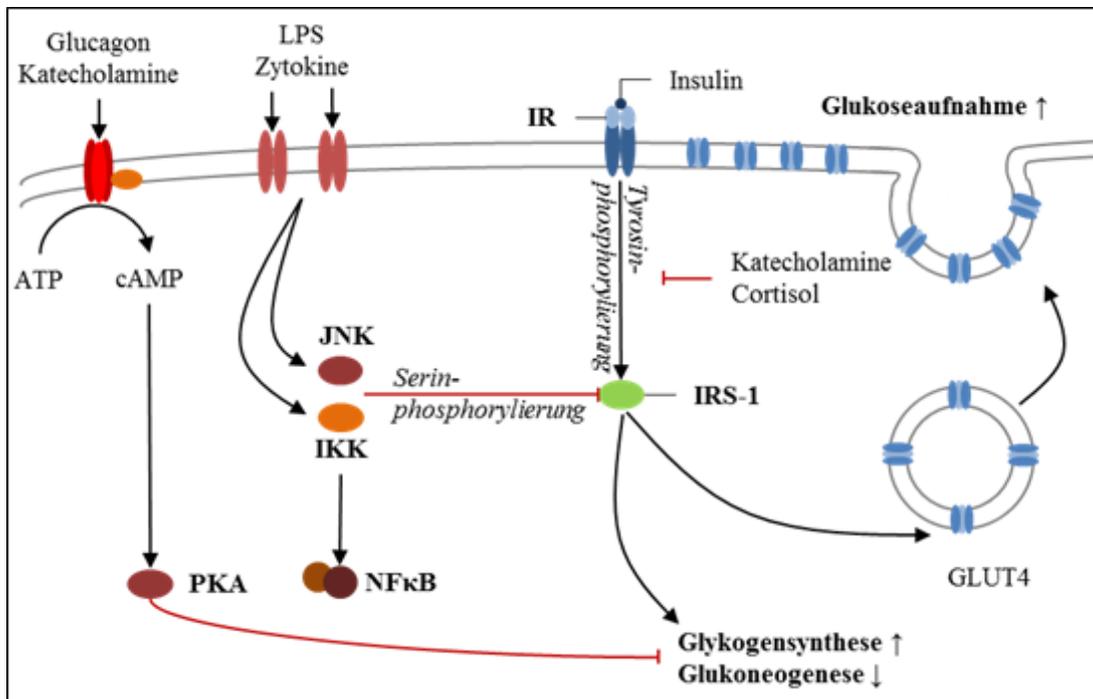


Abbildung 1: Mechanismen der Stresshyperglykämie bei SIRS und Sepsis. (verändert nach Marik und Raghavan 2004)

Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor (IR) führt zur Autophosphorylierung des IR und anschließend zur Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats 1 (IRS-1). Über verschiedene Zwischenschritte bedingt dies die Translokation des insulinabhängigen Glukosetransporters 4 (GLUT4) in die Zellmembran und somit eine gesteigerte Glukoseaufnahme. Außerdem kommt es zur Steigerung der Glykogensynthese und einer Hemmung der Glukoneogenese. Verschiedene Faktoren der Stressantwort führen zu einer Hemmung dieser Mechanismen. Katecholamine und Cortisol verhindern die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1. Lipopolysaccharide (LPS) und verschiedene Zytokine führen über Aktivierung der Inhibitor κ B Kinase (IKK) und der c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) zur hemmenden Serinphosphorylierung vom IRS-1. Die IKK aktiviert zudem den nukleären Faktor κ B (NF κ B), der daraufhin im Zellkern als Transkriptionsfaktor aktiv wird. Glukagon führt über die Bildung von cyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintri-phosphat (ATP) zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die über Zwischenschritte die Glykogensynthese hemmt und die Glukoneogenese aktiviert.

Wesentlicher Mechanismus in der Entstehung der Stresshyperglykämie ist eine Steigerung der hepatischen Glukoseproduktion (Jeevanandam et al. 1990). Glukagon wird als wesentlicher Mediator hierfür angesehen (Lang et al. 1989), wobei die Glukagonfreisetzung unter anderem durch proinflammatorische Zytokine wie TNF α

vermittelt wird (Blumberg et al. 1995). Zusätzlich sind Adrenalin und Glukokortikoide auch direkt und unabhängig an der gesteigerten hepatischen Glukoneogenese beteiligt (Fujiwara et al. 1996, McGuinness et al. 1997).

Weiterhin kann es in der Sepsis infolge der massiven Insulinresistenz zu einer verminderten zellulären Glukoseaufnahme vor allem in der Skelettmuskulatur kommen (Lang et al. 1990). Normalerweise führt die Aktivierung des Insulinrezeptors zur Aktivierung des Insulin-Rezeptorsubstrats-1 (IRS-1) durch Tyrosinphosphorylierung. Daraufhin resultiert, vermittelt durch verschiedene Zwischenschritte, eine GLUT4-Translokation in die Zellmembran und eine Steigerung der Glukoseoxidation und Glykogensynthese (Marik und Raghavan 2004). Dies führt zur vermehrten Glukoseaufnahme in die Zellen und zum vermehrten Verbrauch. Proinflammatorische Signalkaskaden führen zur Reduktion der Aktivität des Insulinrezeptors und des IRS-1 durch Serinphosphorylierung. Eine wesentliche Beteiligung proinflammatorischer Zytokine unter Vermittlung des NFκB-Signalwegs wird angenommen (Shoelson et al. 2006).

1.2. Adipositas-induzierte Insulinresistenz und Fettgewebsinflammation

Zur Pathophysiologie der Insulinresistenz liegen für den Adipositas-induzierte Typ 2 Diabetes mellitus (T2D) bisher die meisten Daten vor. Hierbei führt die chronische Hyperalimentation über verschiedene Mechanismen zur Insulinresistenz und darauf folgend zur Hyperglykämie.

Durch Hyperalimentation kommt es auch beim Stoffwechselgesunden zur postprandialen Erhöhung der Glukosespiegel mit entsprechend darauf folgender Insulinfreisetzung. Die resultierende Hyperinsulinämie hat eine Insulindesensitivierung zur Folge, die zum Teil durch Rezeptorinternalisierung bedingt ist (Di Guglielmo et al. 1998). Des Weiteren kommt es durch die postprandialen Hyperglykämieepisoden zur Glykierung von Proteinen. Diese glykierten Proteine können nun auch zur Insulinresistenz beitragen (Nowotny et al. 2015). Bei einem dieser glykierten Proteine handelt es sich um das Hämoglobin A_{1c}, das bei einem Anteil > 6,5% vom Gesamthämoglobin die Diagnose des T2D erlaubt (American Diabetes Association 2010). Infolge der vermehrten Zufuhr von Fetten und der Fettgewebshypertrophie mit gesteigerter Lipolyse kommt es weiterhin zu erhöhten

Einleitung

Plasmaspiegeln freier gesättigter Fettsäuren, die an Leber und Skelettmuskulatur eine Insulinresistenz hervorrufen (Capurso und Capurso 2012).

Ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese des Adipositas-induzierten T2D ist die Fettgewebshypertrophie. Das hypertrophierte Fettgewebe setzt vermehrt proinflammatorische Zytokine, etwa IL-1 β , IL-6 und TNF α frei (Maury und Brichard 2010), deren Insulin-desensitivierende Wirkung bereits unter 1.1.3 besprochen wurde. Neben diesen setzen hypertrophierte Adipozyten weitere chemotaktische Peptide frei, die eine Infiltration und Vermehrung fettgewebsständiger Makrophagen bewirken (Olefsky und Glass 2010). Zudem kommt es bei extremer Adipozytenhypertrophie zur Instabilität der Zytoplasmamembran mit folgendem Adipozytenuntergang. Diese untergehenden Zellen locken wiederum phagozytierende Makrophagen an, die sich dann in Form von Crown-like structures (CLS) um die Adipozyten anordnen können (Cinti et al. 2005). Somit sind diese CLS Ausdruck einer schwerwiegenden, Adipositas-induzierten Fettgewebsinflammation. Die genannten Prozesse der Fettgewebsinflammation spielen sich vorwiegend bei viszeraler Adipositas im viszeralen Fettgewebe ab, was auf verschiedene Mechanismen, unter anderem den erhöhten intraabdominellen Druck, zurückgeführt wird. (Matsuzawa 2008). Diese Infiltration des Fettgewebes durch proinflammatorische Makrophagen korreliert mit Insulinresistenz und dem Auftreten des T2D (Olefsky und Glass 2010). Eine erhöhte Zahl von Fettgewebsmakrophagen im viszeralen Fettgewebe ist auch für die Sepsis beschrieben, wobei diese vorwiegend dem eher antiinflammatorischen M2-Phänotyp zugeordnet werden (Langouche et al. 2011) und deren Bedeutung in der Pathophysiologie der Sepsis bisher weitestgehend unverstanden ist.

Im Rahmen der Fettgewebshypertrophie und –inflammation kommt es neben der Freisetzung der oben genannten Zytokine auch zur Freisetzung weiterer Adipokine, das heißt von Zytokinen, die vom Fettgewebe gebildet werden. Eine Vielzahl von Adipokinen wurde bisher in der Literatur beschrieben, wobei die prominentesten Vertreter Leptin, Adiponectin, Resistin und Visfatin sind. Adipokine unterhalten zum einen die chronisch-niedriggradige Inflammation bei Patienten mit Adipositas-induziertem T2D und sind auch an der metabolischen Regulation direkt über Insulin-desensitivierende und –sensitivierende Wirkungen beteiligt (Conde et al. 2011).

1.3. Chemerin

Adipokine sind zunehmend Gegenstand aktueller Forschung auf dem Gebiet der Sepsis, da sie funktionell mit Inflammation und gestörtem Glukosemetabolismus assoziiert sind (Hillenbrand et al. 2012). Insbesondere für Adiponectin und Leptin sind Zusammenhänge mit der Krankheitsschwere bei Sepsis beschrieben (Chen et al. 2014a, Vassiliadi et al. 2012). Chemerin (Genname retinoic acid receptor responder 2, RARRES2; auch Tazarotene inducible gene 2, TIG2 genannt) ist ein Adipokin, für das eine Rolle in der Sepsis postuliert wurde, das aber bisher für dieses Krankheitsbild nicht beschrieben ist (Hillenbrand et al. 2012). Es wird hauptsächlich im Fettgewebe sowie in Leber und Pankreas gebildet (Bozaoglu et al. 2007, Chamberland et al. 2013, Wittamer et al. 2003). Unter physiologischen Bedingungen fungiert Chemerin als wichtiger Adipozytendifferenzierungsfaktor (Goralski et al. 2007), ist antibakteriell wirksam (Banas et al. 2013, Kulig et al. 2011) und an der Chemoattraktion bestimmter Leukozytenpopulationen beteiligt (Wittamer et al. 2003). Für verschiedene metabolische, inflammatorische und autoimmune Erkrankungen zeigen Studien eine Beteiligung von Chemerin. Hierzu zählen unter anderem das Metabolische Syndrom und der T2D (Bozaoglu et al. 2007, Bozaoglu et al. 2009), die Nichtalkoholische Steatohepatitis (Döcke et al. 2013, Krautbauer et al. 2013), die Rheumatoide Arthritis (Scotece et al. 2011), chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Weigert et al. 2010a) und die chronische Pankreatitis (Adrych et al. 2012). Die pathophysiologische Bedeutung des Chemerins und die zugrundeliegenden Mechanismen für diese Krankheitsbilder sind bisher nur unzureichend bekannt.

Da die vorliegende Arbeit auf das Verhalten von Chemerin bei Patienten mit Sepsis fokussiert, soll im Folgenden die Physiologie und Pathophysiologie von Chemerin näher erläutert werden.

1.3.1. Struktur, Synthese und posttranslationale Modifikation

Chemerin ist ein Proteinhormon, das strukturell der Cathelicidin/Cystatin-Proteinfamilie zugeordnet wird (Wittamer et al. 2003). Das Präprochemerin, bestehend aus 163 Aminosäuren, wird im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Hieraus entsteht durch intrazelluläre Abspaltung des N-terminalen Signalpeptides, welches als Lokalisierungssequenz für die Bildung im rauen endoplasmatischen Retikulum fungiert,

Einleitung

Prochemerin (Chemerin-163) (Nagpal et al. 1997, Wittamer et al. 2003). Ob die Abspaltung des Signalpeptids co- oder posttranslational erfolgt, ist in der Literatur bisher nicht bekannt (Zabel et al. 2014). Das Prochemerin wird dann, über bislang nicht ausreichend verstandene Mechanismen sezerniert (Zabel et al. 2014). Im Plasma liegt dann im Wesentlichen das inaktive, unprozessierte Prochemerin vor (Zabel et al. 2005, Zhao et al. 2011). In der Zirkulation und im Interstitium erfolgt die Abspaltung C-terminaler Peptide durch Serin-, Cystein- und Carboxypeptidasen, wodurch Chemerin-Isoformen mit unterschiedlicher Aktivität und spatiotemporaler Verteilung resultieren (siehe Abbildung 2) (Mattern et al. 2014). Diese Isoformen werden als eigentliches Chemerin bezeichnet. Durch C-terminale Abspaltung von 5 Aminosäureresten durch beispielsweise Plasmin entsteht das Chemerin-158 (Du et al. 2009), das durch Carboxypeptidase N/B in Chemerin-157 umgewandelt werden kann (Du et al. 2009, Wittamer et al. 2003), welches auch durch direkte Proteolyse durch Elastase entsteht und die aktivste Isoform ist (Zabel et al. 2005). Cathepsin G und Kallikrein 7 sind in der Lage, sieben Aminosäurereste vom Prochemerin abzuspalten, sodass das ebenfalls aktive Chemerin-156 resultiert (Schultz et al. 2013, Zabel et al. 2005). Chemerin-156 und Chemerin-157 können dann durch Proteolyse zum Chemerin-154 inaktiviert werden, wobei im Wesentlichen das Enzym Chymase als ursächlich beschrieben ist (Guillabert et al. 2008). Durch Proteinase 3 kann Prochemerin zudem direkt in das inaktive Chemerin-155 umgewandelt werden (Guillabert et al. 2008). Inaktive Chemerin-Isoformen sind auch in der Lage, zumindest wenn sie in sehr hoher Konzentration vorliegen, als Chemerin-Antagonisten am Rezeptor zu wirken (Yamaguchi et al. 2011).

In der Wirtsreaktion bei Sepsis kommt es zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und der Gerinnungskaskade (Hotchkiss und Karl 2003). Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 werden unter anderem von aktivierten neutrophilen Granulozyten freigesetzt, während es bei der Gerinnungsaktivierung zeitgleich auch zur Aktivierung von Plasmin kommt (Borregaard 2010, Levi und van der Poll 2010). Für die Sepsis ist ebenfalls die Carboxypeptidase N als im Plasma erhöht beschrieben (Jiao et al. 2014). Somit liegen bei Sepsis verschiedene aktive Proteasen im Plasma vor, welche in der Lage sind die Chemerinaktivität zu modulieren.

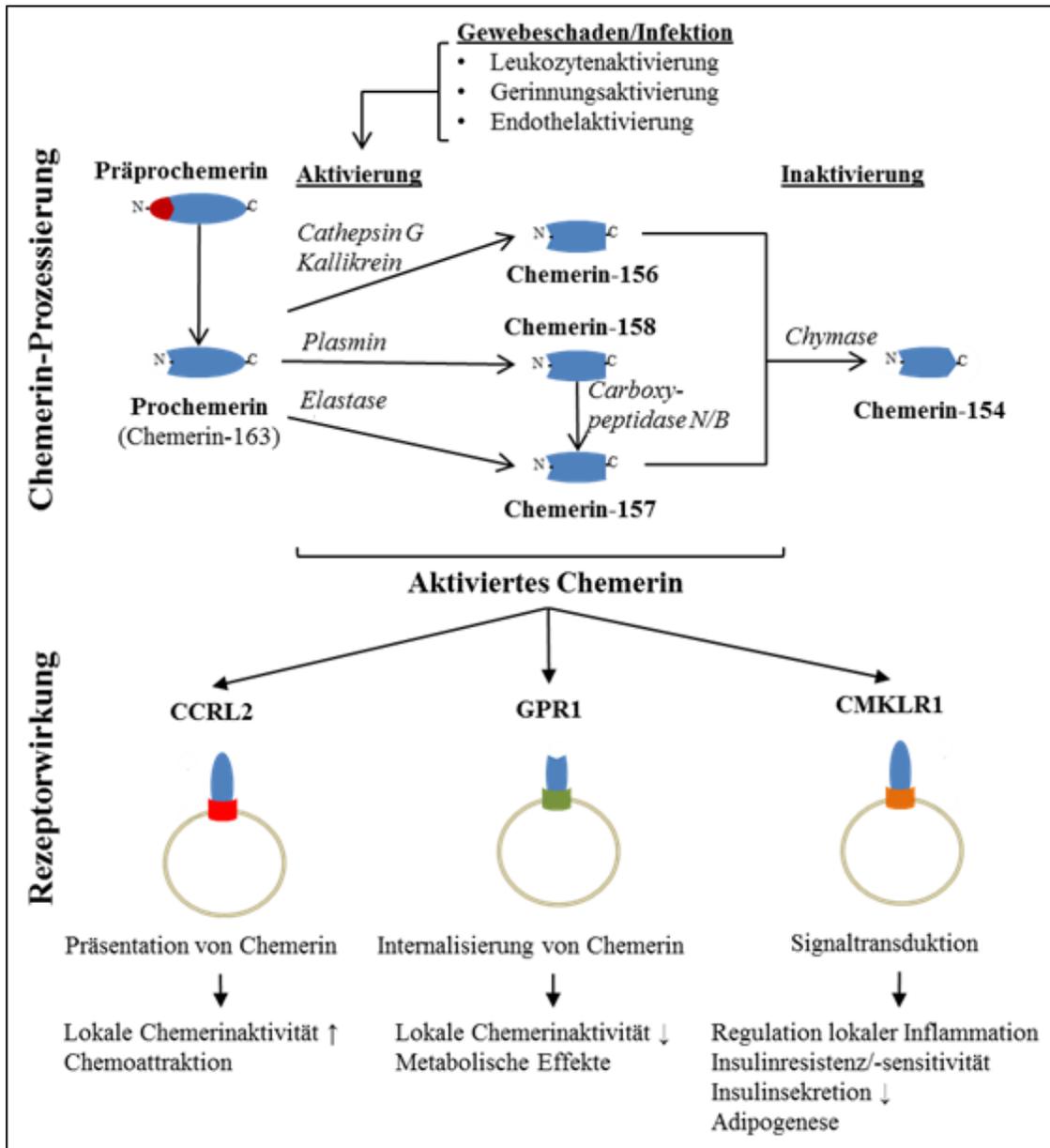


Abbildung 2: Prozessierung und Rezeptorwirkung von Chemerin (modifiziert nach Mattern et al. 2014 und Bondue et al. 2011a)

Chemerin wird als Präprochemerin im endoplasmatischen Retikulum gebildet. Anschließend entsteht durch Abspaltung eines N-terminalen Signalpeptids das Prochemerin (Chemerin-163), das von der Zelle sezerniert wird. Gewebeschädigung und Infektion führen zur Freisetzung und Aktivierung verschiedener Proteasen, die Chemerin entweder aktivieren oder deaktivieren. Die aktivierten Chemerinisoformen Chemerin-156, Chemerin-157 und Chemerin-158 binden an die Chemerinrezeptoren chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) C-C chemokine receptor-like 2 (CCRL2) und G protein-coupled receptor 1 (GPR1) mit den daraus folgenden rezeptorabhängigen Effekten. Die aktivierten Chemerinisoformen können zudem durch das Enzym Chymase zum Chemerin-154 inaktiviert werden. Außerdem entsteht das inaktive Chemerin-155 direkt durch Proteolyse des Prochemerins durch die Proteinase 3 (nicht dargestellt).

1.3.2. Chemerin-Rezeptoren und ihre Funktion

Für Chemerin sind drei verschiedene Rezeptoren bekannt, die alle in etwa die gleiche Bindungsaffinität zum Chemerin aufweisen (Barnea et al. 2008, Zabel et al. 2008). Der Hauptrezeptor ist das Protein chemokine-like receptor 1 (CMKLR1). Dieser wird hauptsächlich auf verschiedenen leukozytären Zellpopulationen exprimiert, unter anderem Zellen der monozytären Zellreihe, Mikroglia und Natürlichen Killer-Zellen. Nicht exprimiert wird der CMKLR1 auf B- und T-Lymphozyten, Granulozyten und Thrombozyten. Für eine Reihe nicht-leukozytärer Zellen, namentlich vor allem Adipozyten, Hepatozyten, Myozyten, Chondrozyten, Osteoklasten und Endothelzellen ist ebenfalls eine CMKLR1-Expression beschrieben (Döcke et al. 2013, Mattern et al. 2014). Eine wesentliche Funktion des CMKLR1 ist die Vermittlung des chemoattrahierenden Chemerin-Effektes auf Leukozyten (Bondue et al. 2011a). Außerdem werden einige metabolische Effekte des Chemerins in Adipozyten und Skelettmuskelzellen über CMKLR1 vermittelt (Ernst und Sinal 2010).

C-C chemokine receptor-like 2 (CCRL2) und G protein-coupled receptor 1 (GPR1) sind ebenfalls Chemerinrezeptoren, von denen angenommen wird, dass sie die lokale Chemerin-Aktivität modulieren (Bondue et al. 2011a). CCRL2 wird auf Endothelzellen exprimiert und bindet Chemerin, ohne dieses zu internalisieren und kann damit Chemerin nach außen präsentieren (Gonzalvo-Feo et al. 2014, Monnier et al. 2012). Es wird postuliert, dass hierdurch eine Verstärkung der lokalen Chemerinaktivität resultiert (Zabel et al. 2014). Außerdem ist CCRL2 noch auf Mastzellen, aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und ist auch an der Immunregulation und Chemoattraktion dieser Zellen beteiligt (Otero et al. 2010, Zabel et al. 2008). GPR1 bindet ebenfalls Chemerin, internalisiert allerdings nach Bindung und ist daher wahrscheinlich am Abbau von Chemerin beteiligt, wobei es die lokale Chemerinaktivität vermindert (Zabel et al. 2014). Der Rezeptor wird in der Stroma-Fraktion des weißen Fettgewebes, in der Skelettmuskulatur, Plazenta, Genitalorganen und im Gehirn exprimiert (Rourke et al. 2014, Zabel et al. 2014). Aktuelle Studien zeigen, dass GPR1 auch wesentlich an der Vermittlung metabolischer Effekte des Chemerins beteiligt ist (Rourke et al. 2014).

1.3.3. Chemerin und metabolische Regulation

Chemerin kommt eine wesentliche Rolle in der metabolischen Regulation zu. Die Zusammenhänge mit dem Glukosestoffwechsel sind komplex und unterscheiden sich je nach untersuchtem Zelltyp oder Gewebe und je nach untersuchtem Modell.

In vitro ist Chemerin in der Lage, sowohl Insulin-sensitivierend als auch die Insulinresistenz fördernd zu wirken. In einer murinen immortalisierten Adipozytenzelllinie (3T3-L1-Zellen) führt etwa die Zugabe von Chemerin zu einer Steigerung der Glukoseaufnahme und der Phosphorylierung des IRS-1 (Takahashi et al. 2008). In Skelettmuskelzellen wird jedoch die Entwicklung von Insulinresistenz nach Behandlung mit Chemerin beobachtet (Sell et al. 2009). Die adenovirale Herabregulation der CMKLR1-Expression und damit die Reduktion der CMKLR1-abhängigen Chemerinwirkung in Myozyten führt ebenfalls zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme (Issa et al. 2012). Die Leber ist ein weiteres entscheidendes metabolisch aktives Organ, wenn es um die Glukoseaufnahmekapazität des Gesamtorganismus geht. Zur Leber, im Speziellen den Hepatozyten, liegen jedoch keine Untersuchungen zu einer direkten Wirkung von Chemerin auf die Insulinsensitivität und Glukoseaufnahme vor.

Murine *in vivo*-Diabetes-Modelle mit systemischer Applikation von rekombinantem Chemerin oder adenoviraler Chemerinüberexpression führen zu einer diabetischen Stoffwechsellage, gemessen mittels Insulin- und Glukosetoleranztest (Becker et al. 2010, Ernst et al. 2010). Gleichzeitig führt der Verlust von CMKLR1 *in vivo* durch Knockout im Mausmodell jedoch nicht zu einer Insulinsensitivierung. Dieser Knockout bedingt dennoch eine Glukoseintoleranz im Glukosetoleranztest, wobei dieser Effekt im Wesentlichen durch eine verminderte Insulinfreisetzung hervorgerufen zu sein scheint (Issa et al. 2012).

Die klinischen Daten zum Chemerin in Bezug auf die metabolische Regulation beschränken sich im Wesentlichen auf reine Korrelation- und Regressionsanalysen. Funktionelle Daten zum Chemerin im Menschen sind derzeit in der Literatur nicht verfügbar. Chemerin ist assoziiert mit Komponenten des metabolischen Syndroms wie Adipositas, Insulinresistenz und Dyslipoproteinämie (Fatima et al. 2013). Durch Lebensstilinterventionen (Kim et al. 2014) und bariatrische Chirurgie (Ress et al. 2010) kann die Chemerinkonzentration im Blut ebenso reduziert werden, wie durch eine medikamentöse Behandlung mit Thiazolidindionen oder Biguaniden (Esteghamati et al. 2014).

1.3.4. Chemerin und Inflammation

Ebenso wie das Zusammenspiel von Chemerin und Regulation des Glukosemetabolismus sind auch die Zusammenhänge zwischen Inflammation und Chemerinwirkung komplex und abhängig vom untersuchten System.

Der postulierte Hauptmechanismus der Chemerinwirkung auf die Inflammationsantwort beinhaltet, dass das im Plasma zirkulierende Prochemerin am Ort von Inflammation und Gewebeschädigung durch Proteolyse aktiviert wird (Mattern et al. 2014) und dann eine Attrahierung CMKLR1-positiver Leukozyten bewirkt (Wittamer et al. 2003). Dies führt dann zur Einwanderung dieser Leukozyten (Parolini et al. 2007, Vermi et al. 2005). Damit übereinstimmend wurde in klinischen Studien bisher insbesondere über eine positive Assoziation von Chemerin mit Inflammation berichtet. Chemerin ist assoziiert mit der Rekrutierung von Leukozyten in entzündete Hautläsionen (Parolini et al. 2007) und lymphatische Gewebe (Vermi et al. 2005), mit Inflammation bei T2D (Weigert et al. 2010b) und mit der Entzündungsaktivität und Krankheitsschwere bei Osteoarthritis, rheumatoider Arthritis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Buechler 2014, Ha et al. 2014, Huang et al. 2012). Außerdem finden sich erhöhte Chemerinspiegel bei Patienten mit chronischer Pankreatitis (Adrych et al. 2012). Nichtsdestotrotz ist Chemerin in *in vivo* Inflammationsmodellen eher mit antiinflammatorischen Effekten verknüpft: Die Gabe von C-terminalen Chemerinpeptiden im Modell der Zymosan-induzierten Peritonitis (Cash et al. 2008) und die Chemerinapplikation im LPS-Modell der akuten Pneumonie (Luangsay et al. 2009) führen zu einer Reduktion sowohl der Inflammationsantwort als auch der Einwanderung proinflammatorischer Zellen in das geschädigte Gewebe. Im viralen Pneumonie-Modell der Maus führt der Knockout von CMKLR1 zu einer verminderten Entzündungsreaktion, gleichzeitig jedoch auch zu einer erhöhten Viruslast (Bondue et al. 2011b). Die antiinflammatorischen Chemerin-Effekte in diesem Modell scheinen hierbei im Wesentlichen durch nicht-leukozytäre CMKLR1-positive Zellen vermittelt zu sein (Bondue et al. 2011b). Somit kann Chemerin nicht *per se* als pro- oder antiinflammatorisches Agens in der Inflammationsantwort betrachtet werden. Chemerin kommt wahrscheinlich eher eine immunmodulatorische Funktion zu, wobei die Begleitumstände, z.B. ob eine sterile Entzündung oder eine bakterielle Infektion vorliegen, über die genaue Immunantwort entscheiden (Zabel et al. 2014). Die Beteiligung nicht-leukozytärer Zellen und metabolischer Mechanismen an den Inflammations-modulierenden Effekten von Chemerin sind weitgehend unbekannt (Zabel et al. 2014).

2. Ziele und Hypothesen

Im Rahmen der Wirtsantwort bei Sepsis kommt es zu einer massiven Inflammationsreaktion und einer Dysregulation der Glukosehomöostase. Einige Adipokine, wie etwa Adiponektin oder Leptin, gelten als hieran beteiligt. Chemerin ist bei Patienten mit metabolischem Syndrom sowohl mit Inflammation als auch Insulinresistenz und Hyperglykämie assoziiert. Daher ist es wahrscheinlich, dass diesem neuen Adipokin auch eine Rolle bei der Modulation der Wirtsantwort bei Sepsis zukommt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, eine erste Beschreibung des Verhaltens von Chemerin, sowohl seiner Serumkonzentration als auch der Expression in Fettgewebe und Leber, für das Krankheitsbild Sepsis vorzunehmen. Zur Einordnung der Befunde sollten diese mit Daten von Patienten mit T2D und Kontrollpatienten verglichen und tierexperimentellen Befunden gegenübergestellt werden. Es wurde folgende Arbeitshypothese formuliert:

Chemerin ist in die Wirtsreaktion bei Sepsis involviert. Hierbei ist es mit der systemischen Inflammationsantwort, der gestörten Glukosehomöostase der Krankheitsschwere und der Prognose assoziiert.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden folgende Fragestellungen formuliert:

- I. Ist die Konzentration des zirkulierenden Chemerins bei Patienten mit Sepsis gegenüber Kontrollpatienten und Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 erhöht?
- II. Besteht eine gesteigerte Expression von Chemerin im viszeralen Fettgewebe?
- III. Ist die Konzentration des zirkulierenden Chemerins mit klinischen Parametern der systemischen Inflammation, Insulinresistenz und gestörten Glukosehomöostase assoziiert?
- IV. Besteht ein Zusammenhang zwischen Fettgewebsinflammation und zirkulierendem Chemerin?
- V. Besteht eine Assoziation des zirkulierenden Chemerins mit Krankheitsschwere und Prognose?
- VI. Lassen sich die Befunde aus I. und II. im murinen polymikrobiellen Modell der peritonealen Sepsis reproduzieren?

3. Material und Methoden

3.1. Studiendesign

Diese Arbeit beinhaltet eine klinische Querschnittstudie, die Chemerin und seine Assoziationen mit Parametern der Inflammation und metabolischen Dysregulation bei Patienten mit Sepsis, Typ 2 Diabetes mellitus (T2D) oder Kontrollen ohne diese beiden Erkrankungen untersucht. Es wurden Blut- und viszerale Fettgewebsproben von Patienten, die sich einer therapeutischen Laparotomie unterzogen, entnommen und Routinelabordaten erhoben. Die Spiegel des zirkulierenden Chemerins wurden mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) quantifiziert und die Genexpression von Chemerin und seinen Rezeptoren im viszeralen Fettgewebe mittels quantitativer Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) erfasst. Ergänzend wurden Daten und Blutproben eines größeren zweiten unabhängigen klinischen Studienkollektivs hinzugezogen, um eine Aussage über die mögliche prognostische Bedeutung des Chemerins bei Patienten mit Sepsis treffen zu können.

Verknüpft wurden diese klinischen Studien mit Untersuchungen am Mausmodell der polymikrobiellen peritonealen Sepsis, um die Eignung des Tiermodells zum Studium des Chemerins bei Sepsis zu überprüfen. Um dem Studiendesign der klinischen Studie zu entsprechen wurde des Weiteren ein Mausmodell des Adipositas-induzierten T2D mittels hochkalorischer fettreicher Diät integriert.

3.2. Patientencharakterisierung und Ethikvotum

3.2.1. INSIGHT-Studienkollektiv

Alle Patienten der ersten Querschnittsstudie wurden im Rahmen der INSIGHT-Studie eingeschlossen, welche im Deutschen Register Klinischer Studien registriert ist (Registriernummer DRKS00005450). Ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Jena liegt vor (Registriernummer 3247-09/11). Bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit handelt es sich um die Auswertung nachträglich durchgeführter Messungen, die im Studienprotokoll nicht als Endpunkte aufgeführt sind. Alle Patienten oder deren gesetzliche Betreuer haben ihr informiertes Einverständnis in die Maßnahmen dieser Studie gegeben. Die Erhebung der Basisdaten erfolgte mit Hilfe eines standardisierten Interviews mit einem standardisierten

Fragebogen, der im Anhang hinterlegt ist (siehe 8.2). Bei den Sepsispatienten wurden der APACHE II-, SOFA- und SAPS II-Score am ersten postoperativen Tag berechnet (Knaus et al. 1985, Le Gall et al. 1993, Vincent et al. 1996).

Es wurden Patienten eingeschlossen, die sich einer therapeutischen Laparotomie unterzogen haben, mindestens 18 Jahre alt waren und in den letzten fünf Tagen keine weitere chirurgische Intervention hatten. Die Patienten der Sepsis-Gruppe haben die Kriterien der aktuell gültigen deutschen S2k Leitlinie der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (Reinhart et al. 2010) erfüllt (siehe 8.1). Patienten der Typ 2 Diabetes mellitus Gruppe (T2D) erfüllten die American Diabetes Association (ADA) Kriterien bezüglich Nüchternblutglukose oder HbA_{1c} zur Diagnose des T2D (American Diabetes Association 2010) oder hatten einen bereits diagnostizierten T2D mit aktueller oraler antidiabetischer Therapie. Die Kontrollgruppe bestand aus Patienten, die weder die Kriterien zur Diagnose einer Sepsis noch zur Diagnose eines T2D oder eines metabolischen Syndroms entsprechend der NCEP-ATPIII Panel Kriterien erfüllt haben (NCEP-ATPIII 2002).

Ausschlusskriterien waren: Typ 1 Diabetes mellitus, Chemotherapie innerhalb der letzten zwei Monate, Langzeittherapie mit immunsuppressiven Medikamenten, Zustand nach Organtransplantation, Behandlung chronischer oder akuter rheumatoid-inflammatorischer Erkrankungen, Drogen- oder Alkoholabusus (definiert als täglicher Ethanolkonsum von mehr als 20g bei Frauen und mehr als 40 g bei Männern (Brunt und Tiniakos 2005)), vorbestehende chronische Niereninsuffizienz mit der Notwendigkeit der Nierenersatztherapie oder Leberzirrhose.

3.2.2. HMOX-Studienkollektiv

Zur Untersuchung der Assoziation von Chemerin mit der Stresshyperglykämie (SHG) und der 28-Tage-Mortalität an einem zusätzlichen unabhängigen Datensatz, wurden Proben der HMOX-Studie hinzugezogen und hinsichtlich der Chemerinspiegel im Plasma untersucht. In dieser Studie wurden Patienten ausgewählt, die in den letzten 24 Stunden die Diagnose einer Sepsis erhielten und älter als 18 Jahre waren. Weitere Ein- oder Ausschlusskriterien bestanden nicht. Von diesen Patienten wurden 37 mit abdominellem Fokus ausgewählt und in drei Subgruppen eingeteilt: Patienten ohne SHG, Patienten mit SHG bei bereits bekanntem T2D und Patienten mit echter SHG ohne vorbekanntem Diabetes mellitus Typ 1

oder 2. Die Einteilung erfolgte retrospektiv anhand der im COPRA-Dokumentationssystem hinterlegten Patientenkurven. Eine Stresshyperglykämie wurde in dieser Arbeit definiert als das Auftreten eines Nüchtern-glukosewertes $> 7,0$ mmol/l, einer Zufallsglukose $> 11,1$ mmol/l oder der Notwendigkeit einer Insulintherapie zur Aufrechterhaltung nahe-normoglykämischer Glukosespiegel (American Diabetes Association 2010, Dungan et al. 2009). Auch für diese Studie liegen entsprechende positive Voten der zuständigen Ethikkommission des UKJ vor (Registrier-Nummern: 3624-11/12, 2712-12/09, 2160-11/07).

3.3. Blut- und Gewebeentnahme am Menschen

Bei den Kontroll- und T2D-Patienten wurde nach einer Nüchternphase von mindestens 8 Stunden morgens präoperativ EDTA-Blut (S-Monovette 9ml K3E, Sarstedt, Deutschland) und Serum (S-Monovette 9ml Z, Sarstedt, Deutschland) abgenommen. Die Blutentnahme bei den Sepsispatienten erfolgte ebenfalls morgens nach 8 Stunden Nüchternheit, allerdings erst am ersten postoperativen Tag. Orale Antidiabetika wurden mindestens 24 Stunden präoperativ abgesetzt. Die viszeralen Fettgewebsproben wurden bei allen Patienten nach Eröffnung der Bauchhöhle und peritonealer Adhäsionslyse möglichst früh im operativen Verlauf aus dem *Omentum majus* entnommen und anschließend entsprechend für die RNA-Isolation und Histologie aufgearbeitet (siehe 3.8 und 3.9).

Die Blutproben wurden bis zur Zentrifugation auf Eis gelagert. Anschließend wurden Serum und EDTA-Plasma durch Zentrifugation (Biofuge Stratos, Heraeus, Deutschland) mit $3.000\times g$ für 10 Minuten bei 4°C abgetrennt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.4. Klinische Chemie

Das Blutbild sowie CRP- und Kreatininwerte, wurden aus der Routinepatientendokumentation entnommen. Nachträglich erfolgte die Bestimmung der Nüchtern-glukose, des HbA_{1c} , des Seruminsulins und des IL-6 aus den gewonnenen Proben. Diese Messungen erfolgten im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Jena mit den ortsüblichen Methoden der Routinediagnostik.

Das Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) als Maß für die Insulinresistenz wurde, wie in der Literatur beschrieben (Matthews et al. 1985), aus den

Werten für die Nüchtern glukose und das Nüchtern insulin nach folgender Formel berechnet:

$$HOMA - IR = \frac{Glukose [mmol/l] \times Insulin [mU/l]}{22,5}$$

3.5. Konfirmatorische Tierstudie

Alle Tierexperimente wurden entsprechend den Vorgaben der deutschen Gesetzgebung zum Tierschutz durchgeführt. Das experimentelle Protokoll wurde durch die Tierschutzkommission der Universität Jena genehmigt (Geschäftszeichen 02-038/12). Die hier genannten Tierexperimente wurden im Rahmen des Masterarbeitsprojektes des Promovenden durchgeführt. Die in der vorliegenden Promotionsschrift präsentierten Daten wurden nicht für andere Qualifikationsvorhaben verwendet.

Männliche, sechs Wochen alte C57BL/6J Mäuse wurden in der Serviceeinheit Kleintierhaltung am Forschungszentrum Lobeda unter standardisierten Laborbedingungen gehalten. Die Mäuse erhielten für zwölf Wochen entweder das hausinterne Standardfutter (control diet, KD) oder eine hochkalorische, fettreiche Diät (high fat diet, HFD; ssniff, Deutschland, EF R/M D12492 mod.) welche einen Fettanteil von 34% enthielt. Die HFD diente als Modell des Adipositas-induzierten Typ 2 Diabetes mellitus (Surwit et al. 1988). Alle Versuchstiere wurden in zweiwöchigen Abständen gewogen, um die adäquate Gewichtszunahme durch die Fütterung zu überprüfen. Das HFD-Modell rief eine Adipositas und eine gestörte Glukosetoleranz hervor und spiegelt somit einen Typ 2 Diabetes mellitus ähnlichen Phänotyp wieder (Horn et al. 2016).

Nach zwölfwöchigem Füttern wurden die Tiere in die Sepsis- und die Kontrollgruppe randomisiert, sodass sich folgende Gruppen ergaben: $KD_{Kon(trolle)}$, $HFD_{Kon(trolle)}$, $KD_{Sep(sis)}$ und $HFD_{Sep(sis)}$. Die Sepsisinduktion erfolgte mit dem Modell der peritonealen Kontamination und Infektion (*peritoneal contamination and infection*, PCI) (Gonnert et al. 2011). Es handelt sich hierbei um das Modell einer kotigen Peritonitis, bei welchem 1,25 μ l/g Körpergewicht verdünnte humane Stuhlsuspension intraperitoneal mit einer Hohlnadel instilliert wurden. Die Krankheitsschwere wurde mithilfe des Clinical Severity Score (CSS) eingeschätzt (Gonnert et al. 2011). Nach 12 Stunden wurde bei sichtbar kranken Tieren ($CSS > 1$) eine subkutane Volumenersatztherapie mit 20 μ l/g Körpergewicht physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, B. Braun Melsungen AG,

Deutschland) durch Injektion mit einer dünnen Hohnadel in die Nackenfalte durchgeführt. 24 Stunden nach Sepsisinduktion oder im Zustand ohne Sepsis (Kontrollen) wurden die Tiere in tiefe Isoflurannarkose versetzt. In Narkose erfolgte anschließend die Entnahme von Citrat-antikoaguliertem Blut (S-Monovette 3ml 9NC, Sarstedt, Deutschland) durch Herzpunktion, wodurch die Tiere verstarben. Durch Zentrifugation (Biofuge Stratos, Heraeus, Deutschland) für 10 Minuten bei 2.500xg und 4°C wurde das Plasma gewonnen und anschließend bei -80°C gelagert. Das epididymale Fettgewebe wurde als murines Äquivalent des humanen viszeralen Fettgewebes entnommen.

3.6. Inflammationsmodell in der Zellkultur an HepaRG-Zellen

Zur Überprüfung der Auswirkung von proinflammatorischen Stimuli auf die hepatozelluläre Chemerinexpression wurde die HepaRG-Zelllinie verwendet. Hierbei handelt es sich um eine humane Hepatocholangiokarzinom-Zelllinie, die unter entsprechenden Kulturbedingungen in Hepatozyten und Gallengangsepithel differenziert (Kanebratt und Andersson 2008).

Die Zellkultivierung, Stimulation und Gewinnung der Proben wurde freundlicherweise durch Frau Esther Fröhlich durchgeführt und die Proben für die Auswertung in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt. Im Folgenden sollen die Kultur- und Stimulationsbedingungen kurz zusammengefasst dargestellt werden. Sämtliche Stimulationen und Einzelkomponenten wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (USA), Gibco (USA), PAA Laboratories (Deutschland), Octapharma (Deutschland), Calbiochem (Deutschland) oder Carl Roth (Deutschland) bezogen.

Zunächst erfolgte die Kultivierung von HepaRG-Zellen der Passage 19 im Wachstumsmedium (Tabelle 1) für zwei Wochen, anschließend zur Induktion der Zellausdifferenzierung in Hepatozyten und Gallengangsepithel im Differenzierungsmedium (Tabelle 1) für drei weitere Wochen.

Die ausdifferenzierten Zellen wurden anschließend im Stimulationsmedium (Tabelle 2) equilibriert und nach Zusatz der entsprechenden Stimulantien für 6 bzw. 24 Stunden stimuliert. Die Stimulation erfolgte mit Zytokinmix (ZM) in nativer, 10fach oder 100fach verdünnter Lösung sowie mit den Einzelkomponenten des ZM Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin 4B), Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interferon γ (IFN γ) und Interleukin 1 β (IL-1 β) in gleicher Konzentration (Tabelle 3). Zusätzlich erfolgte eine Simulation mit 5%igem

Material und Methoden

septischen Serum im Stimulationsmedium über einen Zeitraum von 24 Stunden. Als Kontrolle wurde dem Stimulationsmedium hier humanes Serum gesunder Probanden hinzugefügt.

Tabelle 1: Zusammensetzung von Grundmedium, Wachstumsmedium und Differenzierungsmedium für die HepaRG-Zellkultur.

Medium	
Williams-Medium E	
+ Fetales Kälberserum	10 %
+ Insulin	5 µg/ml
+ L-Glutamin	2 mM
+ Penicillin	100 IE/ml
+ Streptomycin	100 µg/ml
Wachstumsmedium	
+ Hydrocortison	24,7 µg/ml
Differenzierungsmedium	
+ DMSO	2 %

Tabelle 2: Zusammensetzung des Stimulationsmediums

Williams-Medium E	
+ L-Alanyl-L-Glutamin	2 mM
+ Insulin	5 µg/ml
+ Humanes Serumalbumin	0,2 %
+ Hydrocortison	24,7 µg/ml
+ DMSO	1%

Tabelle 3: Zusammensetzung von Zytokinmix und Konzentration der Einzelkomponenten

Zytokinmix	
LPS (Endotoxin B4)	100 ng/ml
TNF α	50 ng/ml
IFN γ	10 ng/ml
IL-1 β	10ng/ml

Die mRNA-Isolation und PCR erfolgten anschließend äquivalent zur unter 3.8 genannten Methode unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (QIAgen, Deutschland).

3.7. Quantifizierung des zirkulierenden Chemerins

Die Konzentration des zirkulierenden Chemerins wurde in humanem Serum oder murinem Citrat-Plasma gemessen. Die Messungen erfolgten mittels ELISA mit folgenden kommerziell erhältlichen ELISA-Kits: Human Chemerin ELISA kit (Biovendor, Deutschland) und Mouse Chemerin Quantikine ELISA Kit (R&D systems, USA). Die ELISAs wurden den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die Waschungen mit dem Waschpuffer erfolgten mithilfe des ELISA-Platwasher Hydroflex (Tecan, Schweiz). Am Plattenlesegerät (Thermo max, MWG Biotech, Deutschland) konnte die Absorbanz jeder Probe bei den vorgegebenen Wellenlängen gemessen werden. Die Messung und Auswertung aller Proben erfolgte hierbei in Duplikaten, wobei jeweils der Mittelwert beider Messungen gebildet wurde. Zur Spezifität der in den ELISA Kits enthaltenen Antikörper für bestimmte Chemerin-Isoformen gibt die Produktinformation der Hersteller keine Auskunft.

3.8. Genexpressionsanalysen

3.8.1. Gewebeaufarbeitung, RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Das humane und murine viszerale Fettgewebe sowie das murine Lebergewebe wurden zum Zweck der Genexpressionsanalyse unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff mit der Methode nach Wollenberger et al. (1960) schockgefroren, um Hypoxie-bedingte Artefakte zu vermeiden. Die Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) des viszeralen Fettgewebes wurde mit dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAgen, Deutschland) den

Herstellereinstellungen entsprechend nach Homogenisierung der Proben mit dem TissueLyser (QIAGEN, Deutschland) am QIAcube, (QIAGEN, Deutschland) isoliert. Die RNA-Isolation aus murinem Lebergewebe erfolgte äquivalent mit dem RNeasy Tissue Mini Kit (QIAGEN, Deutschland). Die Messung der resultierenden RNA-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch am NanoDrop 1000 (PepLab, Deutschland). Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde eine automatisierte Kapillargelelektrophorese am Experion Automated Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, USA) durchgeführt. Als Qualitätskriterium für die RNA-Integrität wurde vom Programm der RNA quality indicator (RQI; Skala von 0 bis 10) anhand des Verhältnisses von 28S-, 18S- und prä-18S-RNA berechnet. Es wurden nur RNA-Proben verwendet, die einen $RQI \geq 7$ aufwiesen, was einer guten bis sehr guten RNA-Integrität entspricht. Anschließend wurde die mRNA mit Hilfe des RevertAid first Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas, USA) entsprechend den Herstellerangaben revers in codogene Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben. Diese PCR-Reaktion wurde mit dem Peltier Thermal Cycler 200 (Bio-Rad Laboratories, USA) durchgeführt.

3.8.2. Primerdesign und –etablierung

Die bei der qRT-PCR verwendeten Primer wurden mit Hilfe der NCBI Primer BLAST-Datenbank erstellt (Ye et al. 2012). Folgende Kriterien mussten durch die Primer erfüllt sein:

Primergröße: 18 – 22 Basenpaare

GC-Gehalt: 45 – 55%

Max Self Complementarity: any: 4,00; 3': 2,00

Produktgröße: 70 – 125 Basenpaare

Primer-Schmelztemperatur: 59 – 61°C

Exon-überspannend: falls möglich

Die somit vorhergesagten Sequenzen der PCR-Produkte wurden anschließend mithilfe des Browser-basierten Programms OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, USA) hinsichtlich der möglichen Bildung von Haarnadelstrukturen und Homo- oder Hetero-Dimeren untersucht. Als akzeptabel wurde eine freie Bindungsenthalpie von jeweils $\Delta G > -10$ kcal/mol angesehen.

Ausgenommen von diesen Regeln waren folgende Primer: ACTB, GAPDH, HMBS, PBGD, RARRES2, CD68, Actb, Gapdh, Gusb und Hmbs. Für diese lagen in der Arbeitsgruppe bereits Primer vor, die mit dem genutzten PCR-Protokoll hinlänglich etabliert waren.

Zur Überprüfung der Primerspezifität wurde zunächst mit einer Probe eine Amplifizierungs-PCR nach unten genanntem Protokoll (3.8.3) durchgeführt. Der Primer wurde als ausreichend spezifisch angesehen, wenn die Schmelzkurve des PCR-Produktes nur ein einziges Maximum besaß und die Schmelztemperatur um maximal 2 Kelvin von der vorhergesagten Schmelztemperatur abwich. Anschließend wurde die Primereffizienz (E) anhand einer Verdünnungsreihe des PCR-Produktes berechnet. Hierzu wurde eine Vorverdünnung des PCR-Produktes (1:1.000 bis 1:100.000, abhängig vom Ct-Wert in der Amplifizierungs-PCR) in Triplikaten in \log_{10} -Stufen weiterverdünnt. Die Verdünnungen wurden dann ebenfalls dem unten genanntem PCR-Protokoll unterzogen. Anhand der Steigung (m) der resultierenden Standardreihe wurde anschließend die Effizienz berechnet (Abbildung 3). Es wurden nur Primer verwendet, die eine Effizienz $> 1,90$ besaßen.

$$E = 10^{\frac{1}{m}}; \quad m = \frac{\Delta Ct}{\Delta \text{Verdünnung}}$$

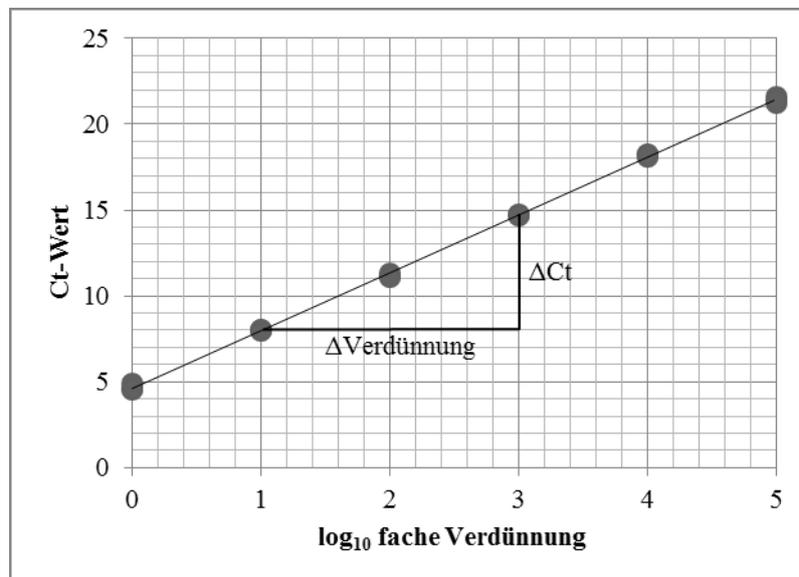


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung einer Standardkurve zur Berechnung der Primereffizienz.

Die Sequenzen der in dieser Arbeit genutzten Primer können der Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Liste der in dieser Arbeit genutzten Primersequenzen (Biomers)

Gen-Symbol	5' - 3' Primer-Sequenz	Produktgröße (bp)
ACTB (hum)	fw: ggc atg ggt cag aag gat t rv: agg tgt ggt gcc aga ttt tc	133
GAPDH (hum)	fw: ctc tgc tcc tcc tgt tcg ac rv: caa tac gac caa atc cg ttg ac	116
HMBS (hum)	fw: cct ggc gtc gtg att agt gat rv: aga cgt tca gtc ctg tcc ata a	131
PBGD (hum)	fw: atg tct ggt aac ggc aat gc rv: cgt ctg tat gcg agc aag c	105
RARRES2 (hum)	fw: aga caa gct gcc gga aga gg rv: tgg aga agg cga act gtc ca	252
CMKLR1 (hum)	fw: agc tgc atg aac ccc att ct rv: tag agc att gac cag gcg ag	90
CCRL2 (hum)	fw: tag caa ata cct ctg ccg ct rv: aca ctt cgg tgg aat ggt ca	113
GPR1 (hum)	fw: ttg gtt cac ggg gtt caa gt rv: gta cag ggg cag aaa gag aag a	100
CD68 (hum)	fw: gct aca tgg cgg tgg agt aca a rv: atg atg aga ggc agc aag atg g	262
Actb (mur)	fw: gct ctt ttc cag cct tcc tt rv: cgg atg tca acg tca cac tt	95
Gapdh (mur)	fw: caa cag caa ctc cca ctc ttc rv: ggt cca ggg ttt ctt act cct t	164
Gusb (mur)	fw: gaa acc cgc cgc ata tta c rv: ccc cag gtc tgc atc ata tt	109
Hmbs (mur)	fw: gaa atc att gct atg tcc acc a rv: gcg ttt tct agc tcc ttg gta a	98
Rarres2 (mur)	fw: aga cca act gcc cca aga ag rv: att tcc gcc ttc tcc cgt tt	72
Cmklr1 (mur)	fw: gcc aac att cat ggg aag at rv: tgt ctg ctg tac cct gtg ga	110
Ccrl2 (mur)	fw: gcc tcc atc ttc acg aca gt rv: ggc tca taa aac aca gac tcg g	101
Gpr1 (mur)	fw: ctc ctg cta ctt gtg cct ca rv: agg tga taa ggg gtc cag ca	123

3.8.3. Durchführung und Auswertung der PCR-Reaktion

Die eigentlichen PCR-Reaktionsansätze wurden folgendermaßen mit einem Pipettierroboter (CAS-1200, Corbett Life Science, UK) pipettiert:

Tabelle 5: Reagenzien für den qRT-PCR-Ansatz

Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix (Stratagene, USA)	10 µl
5 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Biomers, Deutschland)	5µl
cDNA 5ng/ml	5µl
Gesamtreaktionsvolumen:	20 µl

Die RT-qPCR-Reaktion und –Vermessung erfolgte dann mittels Rotor-Gene Q (QIAGEN, Deutschland). Der Ct-Wert gibt den Zyklus an, bei dem die Fluoreszenzintensität exponentiell zu steigen beginnt. In dieser Arbeit wurde dies definiert als Überschreiten der normalisierten Fluoreszenz von 0,05.

Die Expression jedes Gens wurde anhand der Ct-Werte der Transkripte und Referenzgene sowie der entsprechenden Primer-Effizienzen mit der Methode nach Pfaffl, (Pfaffl 2001) bestimmt. Hierfür war es notwendig, die Expression auf entsprechende Referenzgene zu normalisieren. Hierzu wurde das bestmögliche Referenzgen oder die bestmögliche Kombination von Referenzgenen mit dem Programm Normfinder (Andersen et al. 2004) evaluiert. Diese Analyse ergab für die humanen VAT-Proben die Kombination von ACTB, GAPDH, HPRT und PBGD als am besten geeignet. In der Mausstudie ergab sich Gapdh allein als das am besten geeignete Referenzgen im VAT. In der murinen Leber waren Gapdh und Hpvt zusammengenommen die am besten geeigneten Referenzgene, in den humanen HepaRG-Zellen PBGD. Der Mittelwert der relativen Expressionen der jeweils ausgewählten Referenzgene wurde für die weitere Auswertung als Normalisierungsfaktor genutzt (Vandesompele et al. 2002). Durch Division der relativen Expression des Zielgens durch den Normalisierungsfaktor ergab sich dann die normalisierte Genexpression des Zielgens, die nochmals \log_2 -transformiert wurde. Alle Genexpressionsdaten werden als \log_2 -fache Expression in Bezug auf den Median der jeweiligen Kontrollgruppe dargestellt (Pfaffl 2001).

3.9. Histologische Aufarbeitung des humanen viszeralen Fettgewebes

Von den Fettgewebeproben wurden unmittelbar Teile für die weitere histologische Aufarbeitung abgetrennt und für 24 Stunden in 4,5%igem Formalin (Roti Histofix 4,5%, Carl Roth, Deutschland) fixiert. Anschließend erfolgte die Auswaschung des Formalins mit Aqua dest II für eine Stunde und die Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanol- und Xylolreihe (Carl Roth, Deutschland) über Nacht (TP 1020 Tissue Processor, Leica, Deutschland). Daraufhin wurden die Gewebestücke in Paraffin eingebettet (EG 1160 Tissue Embedding Station, Leica, Deutschland). Aus den entstandenen Paraffinblöcken wurden mittels Rotationsmikrotom (RM 2165, Leica, Deutschland) 4 µm dünne Gewebeschnitte gewonnen, die dann, wie untenstehend beschrieben, weiterverarbeitet wurden.

3.9.1. Quantifizierung der Fettgewebsmakrophagen

Im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena, Labor Immunhistologie, wurde in diesen Schnitten immunhistochemisch CD68 als Oberflächenantigen für Makrophagen angefärbt. Die Färbung erfolgte mit dem anti-CD68 Antikörper PG-M1 (Dako cytometry, Deutschland) und wurde mit dem Dako REAL™ Detection System (LSAB+) AP/RED (Dako cytometry, Deutschland) entwickelt. Beide Schritte wurden entsprechend den Angaben des Herstellers und dem Standardfärbeprotokoll der diagnostischen Routine des Instituts durchgeführt. Dies resultierte in einer roten Färbung der Makrophagen (Abbildung 4). Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Am Mikroskop Olympus Provis (Olympus, Deutschland) wurden dann Aufnahmen in 400facher Vergrößerung angefertigt.

Für die Quantifizierung der Fettgewebsmakrophagen wurde folgendermaßen vorgegangen: In einer Fläche von 200 Adipozyten wurden mithilfe des Programms ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health) alle rot gefärbten CD68⁺ Zellen in diesem Areal ausgezählt (Abbildung 5). Es wurden hierbei nur Zellen berücksichtigt, die in diesem Areal lagen und nicht an die Außenzone dieses Areals heranreichten. Die resultierende Fettgewebsmakrophagenzahl wurde dann durch 200 geteilt und das Ergebnis für die statistische Auswertung genutzt. Falls es nicht möglich war 200 Adipozyten auszuzählen, wurde ein entsprechend kleineres Areal vermessen und mit der dementsprechend kleineren Adipozytenzahl dividiert. Präparate, die durch starke Artefakte, etwa durch intraoperative

Kauterisierung des Gewebes, nicht beurteilbar waren, wurden von den Analysen ausgeschlossen.

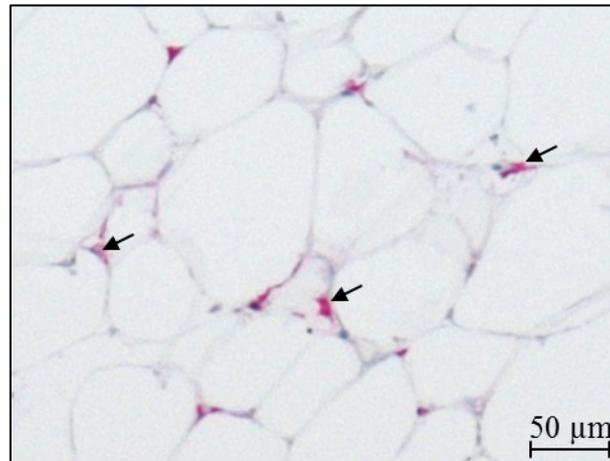


Abbildung 4: Repräsentative Darstellung der CD68-Färbung im viszeralen Fettgewebe eines Sepsispatienten. Die CD68⁺ Zellen können an ihrer roten Färbung erkannt werden (➤).

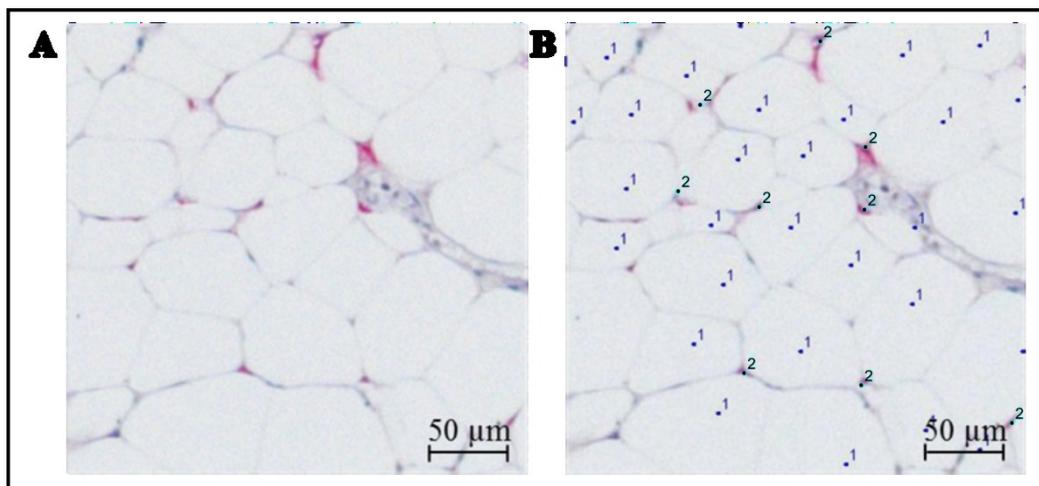


Abbildung 5: Repräsentative Darstellung der Auszählung rot gefärbter CD68⁺ Zellen im viszeralen Fettgewebe eines Sepsispatienten. Dargestellt ist ein Ausschnitt des tatsächlich ausgezählten Bereiches. **A:** Histologische Aufnahme vor Zählung, **B:** Es wurden 200 Adipozyten ausgezählt und markiert (1) und anschließend die in diesem Bereich gelegenen CD68⁺ Zellen gezählt (2).

3.9.2. Adipozytenmorphometrie

Zur Abschätzung der mittleren Adipozytengröße wurde eine morphometrische Messung der Adipozytenflächen im Gewebeschnitt mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Hierzu wurden zunächst Fotos mit 40facher Vergrößerung mittels Phasenkontrastmikroskopie erstellt (Abbildung 6A). Für das Programm ImageJ wurde eine Befehlsabfolge

programmiert, welche es ermöglichte, die folgenden Bildverarbeitungs- und -messschritte reproduzierbar durchzuführen. Zunächst wurde das Bild in ein 8-bit-Graustufenbild transformiert und dann der Bildhintergrund subtrahiert (Abbildung 6B). Anschließend erfolgte die Binarisierung des Bildes, wonach die bildmorphologischen Lücken zwischen den Adipozyten geschlossen werden mussten (Abbildung 6C). Dies wurde durch Anwendung von Rangordnungsfiltren (Minimumfilter und Maximumfilter) erzielt, wobei anschließend trotzdem einzelne Adipozytengrenzen per Hand nachgezeichnet werden mussten (Abbildung 6D). Es erfolgte eine abschließende Sichtkontrolle des resultierenden Bildes, in der nicht auswertbare Bildabschnitte ausradiert wurden, damit diese die Messung nicht beeinflussen (Abbildung 6E). Die Messung der mittleren Adipozytengröße erfolgte dann mit der Funktion „Measure particle“, wobei eingestellt wurde, dass nur Objekte vermessen werden, die in gewisser Näherung kreisförmig sind („circularity“, s.u.) und von der Größe zwischen der vorgegebenen Mindest- und Maximalgröße liegen („size“, s.u.) (Abbildung 6F).

Die Befehls-Abfolge der Adipozytenmorphometrie lautete wie folgt:

```
run("8-bit");
run("Subtract Background...", "rolling=50");
run("Window/Level...");
setMinAndMax(5, 17);
run("Apply LUT");
setThreshold(0, 31);
run("Convert to Mask");
run("Minimum...", "radius=5");
run("Maximum...", "radius=5");
run("Analyze Particles...", "size=1000-25000 circularity=0.30-1.00 show=Outlines
display summarize")
```

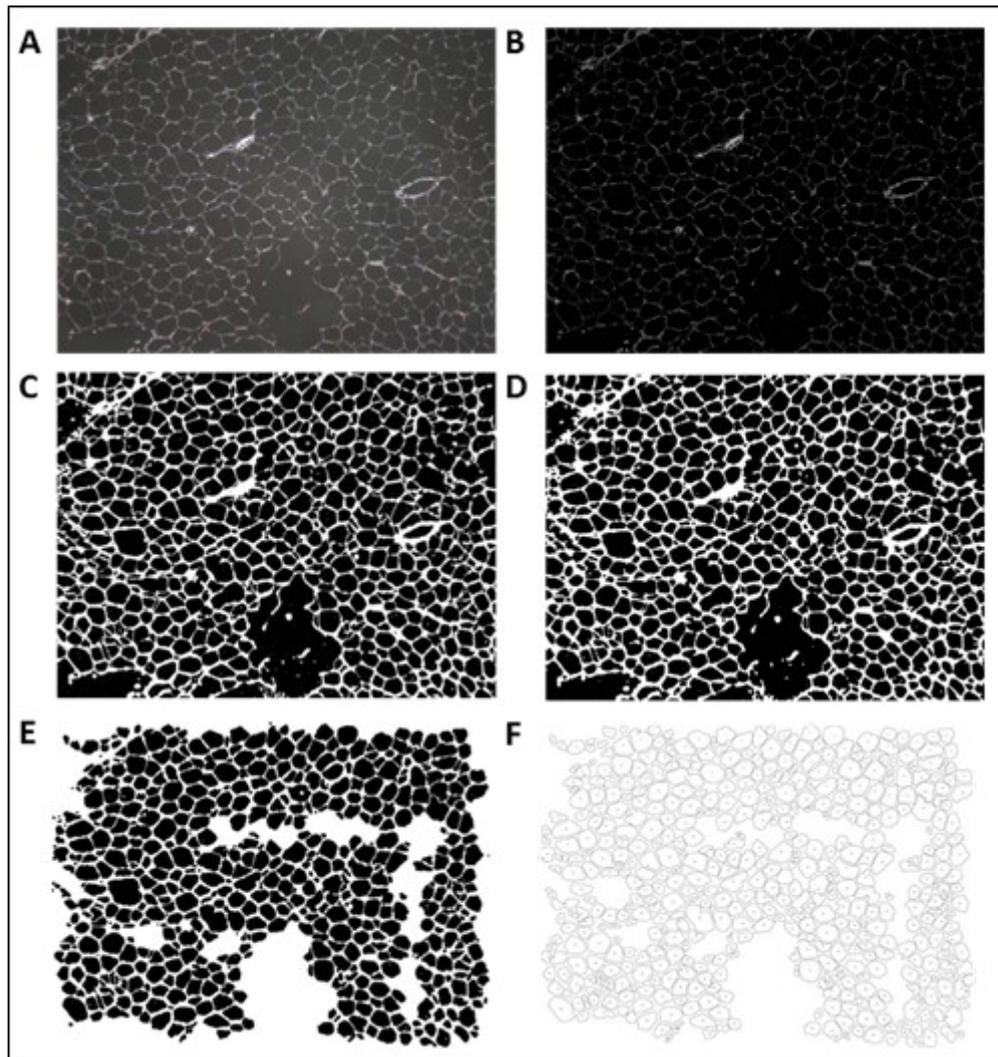


Abbildung 6: Dargestellt ist eine repräsentative Bildfolge der Vermessung der Adipozytengröße. **A:** Phasenkontrastbild, **B:** Nach Subtraktion des Hintergrundes und Umwandlung in Graustufen, **C:** Nach Binarisierung, **D:** Nach Schließen der Lücken mit Rangordnungsfiltern und Nachzeichnen per Hand, **E:** Nach Radierung nicht auswertbarer Bereiche, **F:** Kontrollbild zur Überprüfung des Ergebnisses.

3.10. Statistik

Für alle statistischen Analysen wurde die Software SPSS 22.0 (SPSS Inc, USA) genutzt. Die Alternativhypothese wurde akzeptiert, wenn der zweiseitige p-Wert kleiner war als 0,05. Alle statistischen Diagramme wurden mit dem Programm Origin 9G (OriginLab, USA) erstellt.

Alle Daten sind, soweit nicht anders genannt, als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Daten der Gruppenvergleiche sind jeweils als Box-Plots dargestellt, wobei die Whisker die gesamte Spannweite der Gruppenwerte umfassen und die Box von der 25. Perzentile zur 75. Perzentile reicht. Es wurde mit dem Shapiro-Wilks-Test auf

Material und Methoden

Normalverteilung getestet und, falls nötig und möglich, die Daten mittels dekadischen Logarithmiers transformiert, um die Normalverteilung zu erreichen. Zum Testen auf Varianzhomogenität wurde die Lévenne-Prozedur angewendet. In Abhängigkeit von der Datenverteilung wurden für Gruppenvergleiche folgende statistische Test durchgeführt: Ein-Weg Analyse der Varianz (ANOVA) mit post-hoc Bonferroni-Korrektur, der Kruskall-Wallis-Test oder Mann-Whitney-U-Test. Der Post-hoc-Test nach Kruskall-Wallis-Test wurde händisch im Programm Excel nach Bonferroni-Holm durchgeführt. Der Vergleich von Gruppen hinsichtlich nominaler Variablen erfolgte mit χ^2 -Test. Zur Testung auf signifikante Korrelation wurden der Pearson-Korrelationskoeffizient für parametrische oder der Spearmans-Rangkorrelationskoeffizient für nichtparametrische Daten angewendet. Um auf unabhängige lineare Assoziationen zu testen wurden multivariate lineare Regressionsanalysen, mit zirkulierendem Chemerin als abhängiger Variable, berechnet. Die Adjustierung der Chemerinspiegel für die Variabilität klinischer Parameter erfolgte durch Division der Chemerinkonzentration durch den jeweiligen Wert des entsprechenden Parameters.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der Studienpopulation

Die Basisdaten der Studienpatienten des ersten Studienkollektivs (INSIGHT) werden in Tabelle 6 wiedergegeben. Es konnten insgesamt 52 Patienten eingeschlossen werden, wobei 17 Patienten in die Kontrollgruppe, 21 Patienten in die T2D-Gruppe und 14 Patienten in die Sepsisgruppe eingeschlossen wurden. Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich Alter, Body Mass Index (BMI), Leukozytenzahl, Hämoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) und HOMA-IR (jeweils $p < 0,05$), wobei die Sepsispatienten zu T2D-Patienten vergleichbar bezüglich Alter, BMI und HOMA-IR waren. Sepsispatienten waren vergleichbar zu Kontroll-Patienten bezüglich des HbA_{1c} (jeweils $p > 0,05$). Wie zu erwarten war, wiesen die Sepsispatienten signifikant höhere Werte für das C-reaktive Protein (CRP) und die Leukozytenzahl auf, verglichen mit Kontroll- und T2D-Patienten ($p < 0,05$). Die meisten Patienten wiesen eine maligne Grunderkrankung auf, wobei jedoch alle Gruppen in dieser Hinsicht vergleichbar waren ($p = 0,736$). Bezüglich der OP-Indikation waren die Patienten der Kontroll- und T2D-Gruppe vergleichbar, mit numerisch höherer Zahl primärer hepatobiliärer Malignome ($p = 0,432$; Anhang 8.3; Tabelle 15). Die Patienten der Sepsisgruppe wiesen ein anderes Indikationsspektrum zur OP auf (Anhang 8.3; Tabelle 15).

Zum Zweck der statistischen Vergleiche zwischen den Gruppen, wurden Subgruppen mit jeweils zehn Patienten bezüglich Alter und BMI gematcht, um die Gruppen vergleichbarer zu gestalten. Die Subgruppencharakteristika sind in Tabelle 7 dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 6: Demographische und klinische Charakterisierung der INSIGHT-Studiengruppen

	Kontrolle	T2D	Sepsis	p-Wert
n (%männlich)	17 (30)	21 (81)	14 (57)	0,06*
Alter [a]	56±3^a	68±1^b	69±3^b	<0,001
BMI [kg/m ²]	24,8±1,0^a	28,9±0,9^b	29,5±1,2^b	0,003
CRP [mg/l]	3,5±0,5^a	15,9±9,5^b	220,5±26,8^c	<0,001
IL6 [pg/ml]	5,6±1,3^a	6,8±1,4^a	680,0±198,6^b	<0,001
Leukozyten [x10 ³ /μl]	6,1±0,4^a	6,9±0,5^a	16,7±1,6^b	<0,001
Thrombozyten [x10 ³ /μl]	235,8±17,0^a	232,3±13,6^a	327,4±49,1^a	0,239
HbA _{1c} [%]	5,5±0,1^a	7,8±0,4^b	5,9±0,3^a	<0,001
HOMA-IR [AU]	1,5±0,3^a	5,6±1,4^b	4,3±1,3^b	0,022
Kreatinin [μmol/l]	65,4±1,8^a	91,4±4,3^b	213,2±32,3^c	<0,001
Albumin [g/l]	37,9±0,8^a	37,5±0,9^a	21,4±2,2^b	<0,001
Bilirubin [μmol/l]	9,7±1,4^a	9,6±0,9^a	20,4±3,7^b	0,011
ALAT [μmol/l]	0,6±0,4^a	0,7±0,1^a	0,7±0,2^a	0,355
γGT [μmol/l]	0,8±0,1^a	1,6±0,5^a	2,9±0,8^a	0,067
Quick [%]	109,4±2,7^a	95,1±5,5^a	76,4±3,0^b	<0,001
Maligne Erkrankung	11/17	16/21	9/14	0,736*

Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SEM oder als absolute Zahlen. Zum Gruppenvergleich wurde der Kruskal-Wallis-Test und multiple Mann-Whitney-U-Test mit post-hoc Bonferroni-Holm α -Fehlerkorrektur genutzt. Unterschiedliche hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an. * χ^2 -Test

Ergebnisse

Tabelle 7: Demographische und Klinische Charakterisierung nach Matching

	Kontrolle	T2D	Sepsis	p-Wert
n (%männlich)	10 (30)	10 (90)	10 (80)	0,01*
Alter [a]	61±2^a	67±2^b	66±2^b	0,094
BMI [kg/m ²]	24,4±0,9^a	27,9±0,6^b	29,0±1,6^b	0,024
CRP [mg/l]	3,4±0,7^a	8,7±2,1^b	221,1±33,3^c	<0,001
IL6 [pg/ml]	7,6±1,9^a	4,7±1,1^a	791,2±254,9^b	<0,001
Leukozyten [x10 ³ /μl]	6,0±0,4^a	6,3±0,5^a	18,8±1,8^b	<0,001
Thrombozyten [x10 ³ /μl]	242,1±25,2^a	214,7±24,5^a	382,9±43,8^b	0,016
HbA _{1c} [%]	5,5±0,1^a	8,2±0,6^b	5,7±0,3^a	<0,002
HOMA-IR [AU]	1,4±0,3^a	7,5±2,4^b	5,0±1,7^b	0,089
Kreatinin [μmol/l]	66,2±2,6^a	92,5±7,0^b	232,7±40,3^c	0,003
Albumin [g/l]	37,6±1,2^a	37,1±1,0^a	20,3±1,8^b	0,001
Bilirubin [μmol/l]	10,5±2,3^a	9,2±1,3^a	17,7±4,6^b	0,174
ALAT [μmol/l]	0,5±0,1^a	0,6±0,1^a	0,5±0,1^a	0,728
γGT [μmol/l]	0,8±0,1^a	2,6±1,1^a	2,9±1,0^a	0,378
Quick [%]	110,6±4,2^a	105,2±4,7^a	76,4±2,4^b	<0,001
Maligne Erkrankung	7/10	8/10	7/10	0,861*

Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SEM oder als absolute Zahlen. Zum Gruppenvergleich wurde der Kruskal-Wallis-Test und multiple Mann-Whitney-U-Test mit post-hoc Bonferroni-Holm α -Fehlerkorrektur genutzt. Unterschiedliche hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an. * χ^2 -Test

4.2. Zirkulierendes Chemerin bei humaner und muriner peritonealer Sepsis

Die Spiegel des zirkulierenden Chemerins waren bei den Patienten mit Sepsis im Vergleich zu T2D- und Kontrollpatienten signifikant erhöht ($p < 0,05$) (Abbildung 7A). Zwischen den Kontroll- und T2D-Patienten war diesbezüglich kein Unterschied nachweisbar ($p > 0,05$) (Abbildung 7A). Diese Ergebnisse ließen sich größtenteils im Mausmodell der peritonealen Sepsis reproduzieren. Hier waren die Spiegel des zirkulierenden Chemerin zwischen den Studiengruppen signifikant verschieden, mit den höchsten Werten in KD_{Sep} und HFD_{Sep} ($p < 0,05$) (Abbildung 7B).

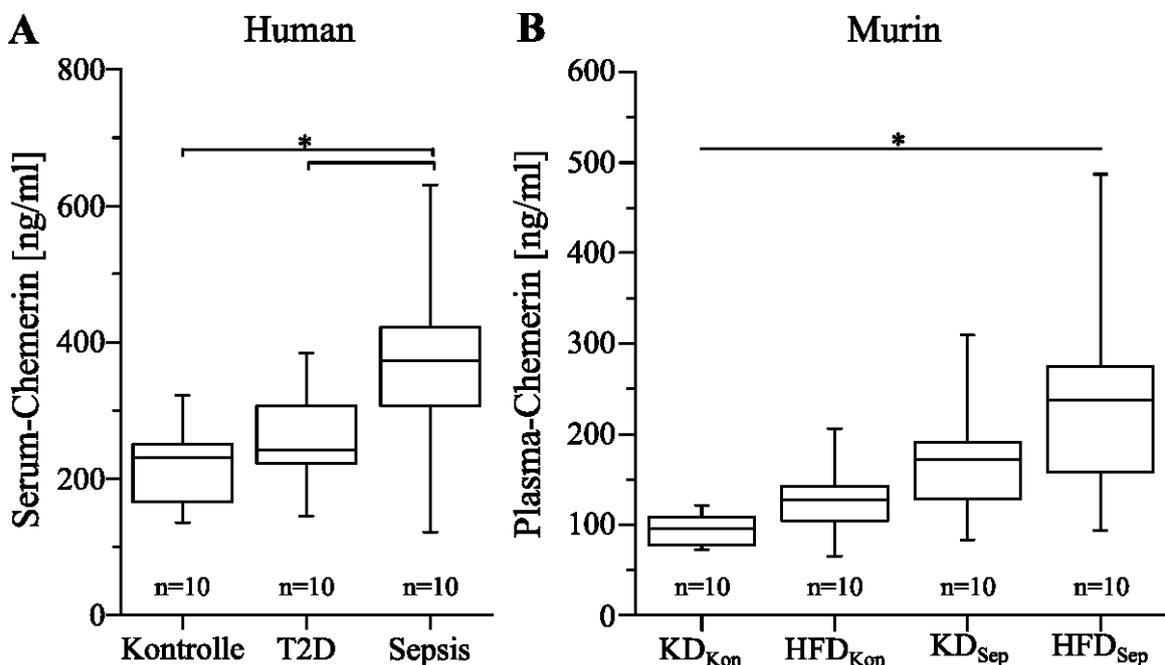


Abbildung 7: Dargestellt sind die Spiegel des zirkulierenden Chemerins in den Studienpatienten und Mäusen. **A:** Die zirkulierenden Chemerinspiegel waren signifikant höher bei Sepsispatienten verglichen sowohl mit der Kontrollgruppe ($p=0,003$) als auch mit T2D ($p=0,024$). **B:** Das zirkulierende Chemerin in der Maus war nach Sepsisinduktion signifikant erhöht ($p=0,028$). * $p < 0,05$; One-Way-ANOVA oder Kruskal-Wallis-Test und multiple Mann-Whitney-U-Tests mit post-hoc Bonferroni-Holm α -Fehlerkorrektur

Mit Bezug auf das Geschlecht wiesen weibliche Sepsispatienten signifikant niedrigere Chemerinspiegel auf als männliche Sepsispatienten ($p < 0,05$) (Abbildung 8). Dieser Unterschied verschwand nach Adjustierung für entweder Seruminsulin oder CRP ($p > 0,05$) (Abbildung 9) und war für Kontroll- und T2D-Patienten nicht nachweisbar ($p > 0,05$) (Abbildung 8). Die weiteren demographischen und klinischen Charakteristika der Sepsispatienten, getrennt nach Geschlecht, sind im Anhang wiedergegeben (siehe 8.3;

Ergebnisse

Tabelle 16). In der zweiten untersuchten unabhängigen Studienkohorte war kein Unterschied der Chemerinspiegel zwischen den Geschlechtern nachweisbar (siehe Anhang 8.3; Abbildung 37).

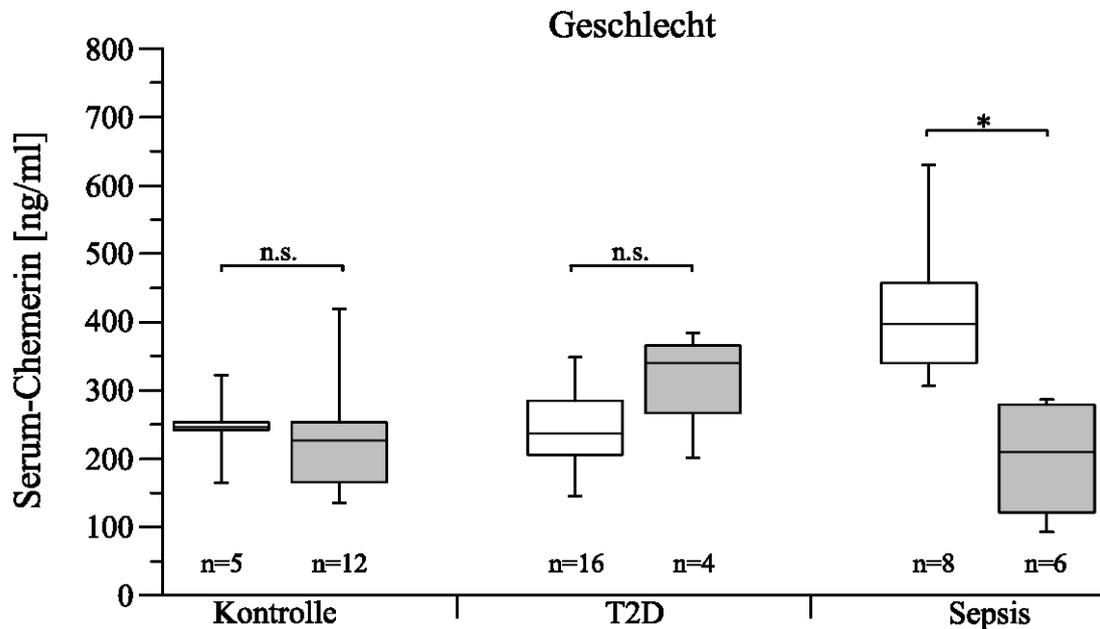


Abbildung 8: Gezeigt sind die Unterschiede bezüglich des zirkulierenden Chemerins zwischen Männern (□) und Frauen (■). Diese waren signifikant niedriger in weiblichen, verglichen zu den männlichen Sepsispatienten ($p=0,001$). Solch ein Unterschied war bei den Kontroll- und T2D-Patienten nicht vorhanden (jeweils $p>0,05$). * $p<0,05$; n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

Beim Vergleich von Patienten mit benigner oder maligner Grunderkrankung bestanden bezüglich des zirkulierenden Chemerins keine signifikanten Unterschiede in den drei Studiengruppen ($p>0,05$) (Abbildung 10).

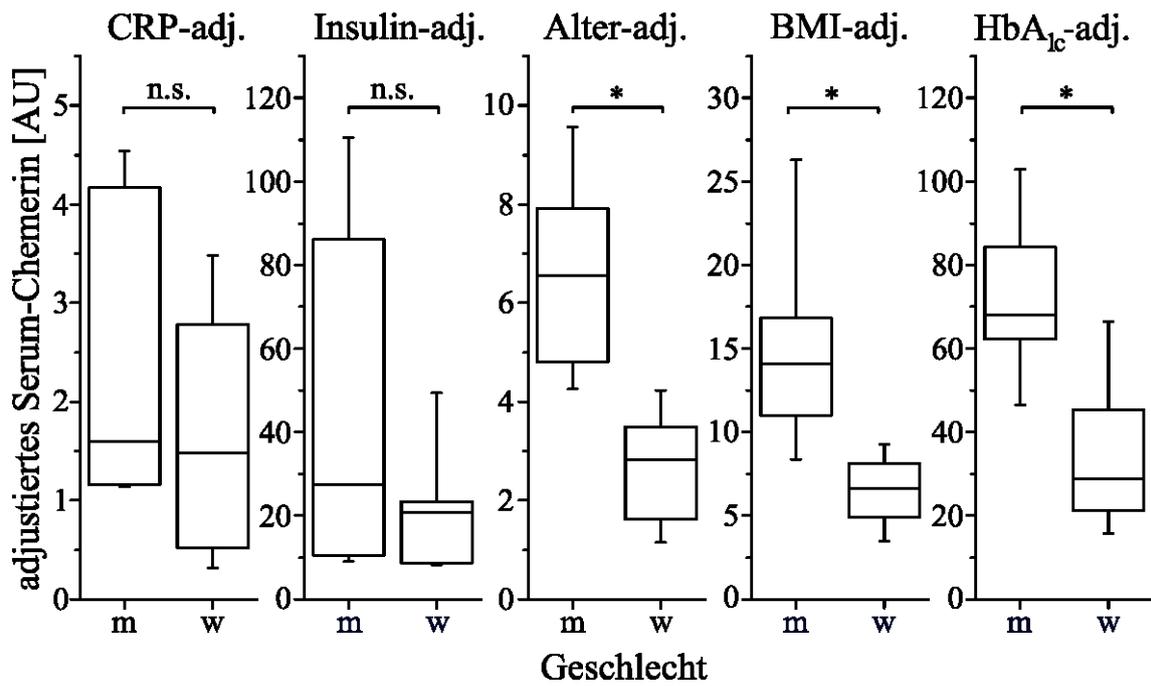


Abbildung 9: Veränderung des Geschlechtsunterschieds bezüglich Serum-Chemerin nach Adjustierung für verschiedene klinische Parameter. Nach Adjustierung für CRP und Insulin verschwindet der Unterschied ($p=0,534$ und $p=0,202$), während das Serum-Chemerin nach Adjustierung für Alter, BMI oder HbA_{1c} signifikant unterschiedlich blieb ($p=0,001$, $p=0,001$ und $p=0,005$). * $p<0,05$; n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

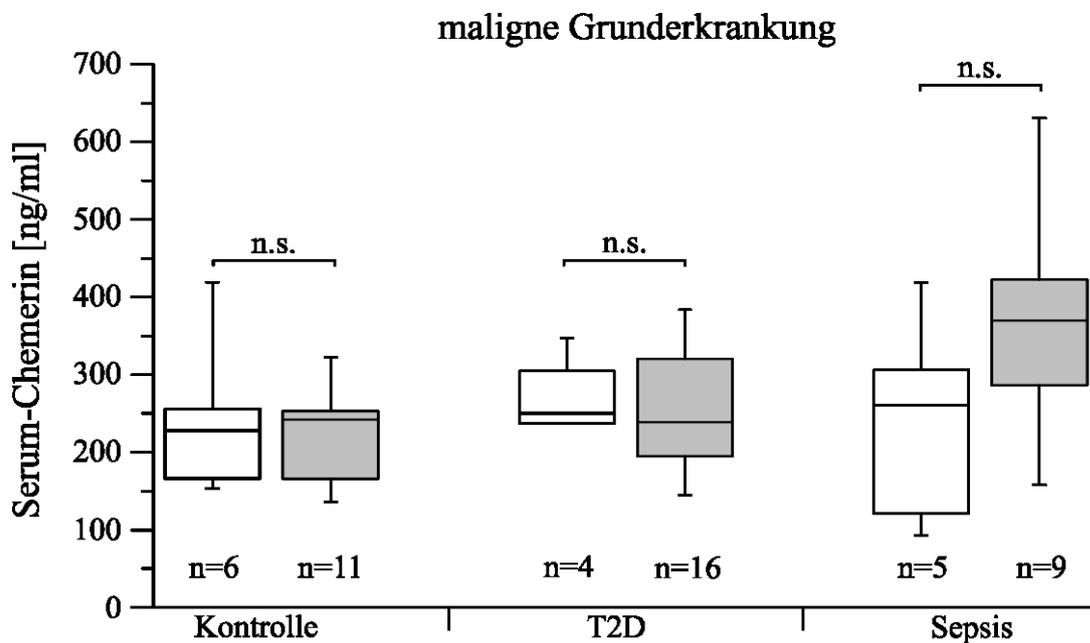


Abbildung 10: Dargestellt sind die Unterschiede bezüglich des zirkulierenden Chemerins zwischen Patienten mit benigner (□) oder maligner (■) Grunderkrankung. Für keine der Studiengruppen konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. n.s.=nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

Ergebnisse

Univariate Korrelationen des Serumchemerins mit verschiedenen demografischen und klinischen Parametern sind, getrennt für die jeweiligen Gruppen der ersten Studienkohorte, in Tabelle 8 dargestellt. Bei Patienten mit Sepsis konnte eine positive Korrelation des Chemerins mit der Leukozyten- sowie der Thrombozytenzahl im peripheren Blut nachgewiesen werden (jeweils $p < 0.05$). Eine solche Korrelation fehlte bei Kontroll- und T2D-Patienten. Die Albuminkonzentration war bei T2D-Patienten deutlich und signifikant negativ mit den Chemerinspiegeln korreliert ($p < 0.05$); ein Zusammenhang, der in den anderen Studiengruppen nicht nachzuweisen war ($p > 0.05$). Mit weiteren erhobenen Parametern, insbesondere mit Alter, BMI, CRP, IL6, HbA_{1c}, HOMA-IR oder der glomerulären Filtrationsrate (GFR) war keine signifikante Korrelation zu erkennen.

Tabelle 8: Univariate Korrelationsanalysen zwischen zirkulierendem Chemerin und anthropometrischen, klinischen sowie laborchemischen Patientendaten

	Kontrolle		T2D		Sepsis	
	R	p	R	p	R	p
Alter	0,020	0,940	0,017	0,942	-0,454	0,103
BMI	0,231	0,372	0,407	0,075	-0,083	0,777
CRP	-0,119	0,649	0,327	0,160	-0,049	0,867
IL6	-0,031	0,906	0,206	0,397	-0,193	0,507
Leukozyten	0,259	0,316	0,186	0,433	0,628	0,016
Thrombozyten	0,363	0,152	0,415	0,069	0,585	0,028
HbA _{1c}	0,016	0,951	0,341	0,153	0,065	0,825
HOMA-IR	0,061	0,815	-0,233	0,337	0,193	0,508
GFR	0,034	0,898	0,105	0,670	0,058	0,850
Albumin	-0,365	0,149	-0,545	0,013	-0,463	0,177
Bilirubin	-0,250	0,332	-0,307	0,188	-0,335	0,264
ALAT	0,149	0,567	-0,305	0,191	-0,391	0,235
γGT	0,443	0,075	-0,210	0,374	0,041	0,904
Quick	0,261	0,311	-0,115	0,629	0,031	0,920

BMI, Body Mass Index; CRP, C-reaktives Protein; IL6, Interleukin 6; HbA_{1c}, Hämoglobin A_{1c}; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment; GFR, glomeruläre Filtrationsrate; ALAT, Alanin-Aminotransferase; γGT, gamma Glutamyltransferase

4.3. Genexpression von Chemerin und seinen Rezeptoren im viszeralen Fettgewebe

Die mRNA-Expression von Chemerin war im VAT deutlich und signifikant herabgesetzt ($p < 0,05$) (Abbildung 11) und erreichte mit Überschreiten einer log₂-fachen Veränderung auch ein biologisch relevantes Niveau. Unterschiede zwischen den Kontrollen und T2D

Ergebnisse

waren diesbezüglich nicht nachweisbar. Im PCI-Mausmodell war die Chemerin mRNA im VAT in HFD_{Sep} und KD_{Sep} nach Sepsisinduktion im Vergleich zu HFD_{Kon} signifikant herabgesetzt ($p < 0,05$), nicht jedoch im Vergleich zu KD_{Kon} ($p > 0,05$) (Abbildung 12). Diese Veränderungen bei der Maus waren jedoch nur gering und konnten das Niveau der biologischen Bedeutsamkeit nicht erreichen.

Die mRNA-Expression von CMKLR1 zeigte sich bei T2D im Vergleich zu den Kontrollen erhöht ($p > 0,05$), war jedoch bei Sepsis nicht signifikant verändert ($p > 0,05$) (Abbildung 11). Demgegenüber war die CCRL2 mRNA-Expression im VAT in der Sepsis-Gruppe im Vergleich zu Kontrollen und T2D erhöht (jeweils $p < 0,05$) (Abbildung 11), während sich hier für die Genexpression von GPR1 kein signifikanter Gruppenunterschied zeigte ($p > 0,05$) (Abbildung 11). Diese Veränderungen waren jeweils geringer als das vordefinierte biologische Signifikanzniveau.

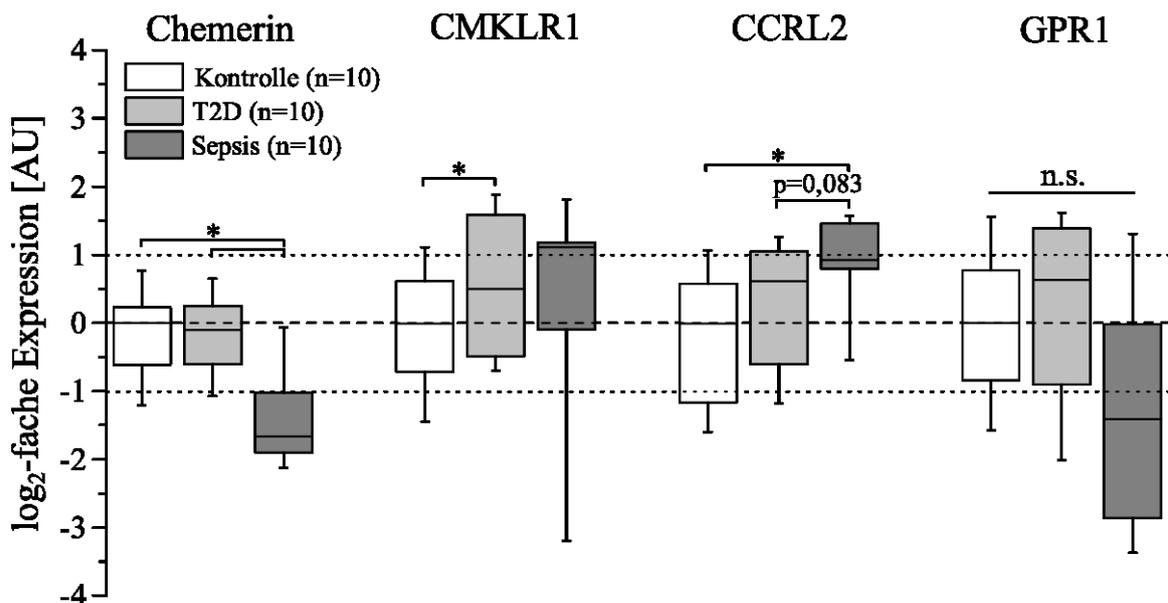


Abbildung 11: log₂-fache mRNA Expression von *Chemerin* und seinen Rezeptoren im humanen VAT. Die *Chemerin* VAT mRNA war bei Sepsispatienten gegenüber den Kontroll- ($p = 0,010$) und den T2D-Patienten ($p = 0,041$) signifikant vermindert. Die *CMKLR1* mRNA war bei T2D-Patienten gegenüber Kontrollen signifikant erhöht ($p = 0,029$). Die *CCRL2* mRNA war signifikant erhöht bei Sepsispatienten gegenüber Kontrollen ($p = 0,031$) und im Trend gegenüber T2D ($p = 0,082$). Für die GPR1 mRNA-Expression konnte kein Gruppenunterschied gefunden werden. * $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Kruskal-Wallis-Test und multiple Mann-Whitney-U-Tests mit post-hoc Bonferroni-Holm α -Fehlerkorrektur

Ergebnisse

Im Mausmodell der Sepsis war in KD_{Sep} und HFD_{Sep} die *Cmklr1* mRNA-Expression im VAT signifikant herabgesetzt ($p < 0,05$) und die *Ccr12* mRNA im VAT signifikant erhöht ($p < 0,05$) (Abbildung 12). Zusätzlich zur statistischen Signifikanz fielen die Veränderungen für die *Cmklr1* und *Ccr12* mRNA auch groß genug aus, um von einer biologisch relevanten Veränderung zu sprechen. Die *Gpr1* mRNA-Expression im VAT war durch die Sepsisinduktion nicht signifikant beeinflusst ($p > 0,05$) (Abbildung 12).

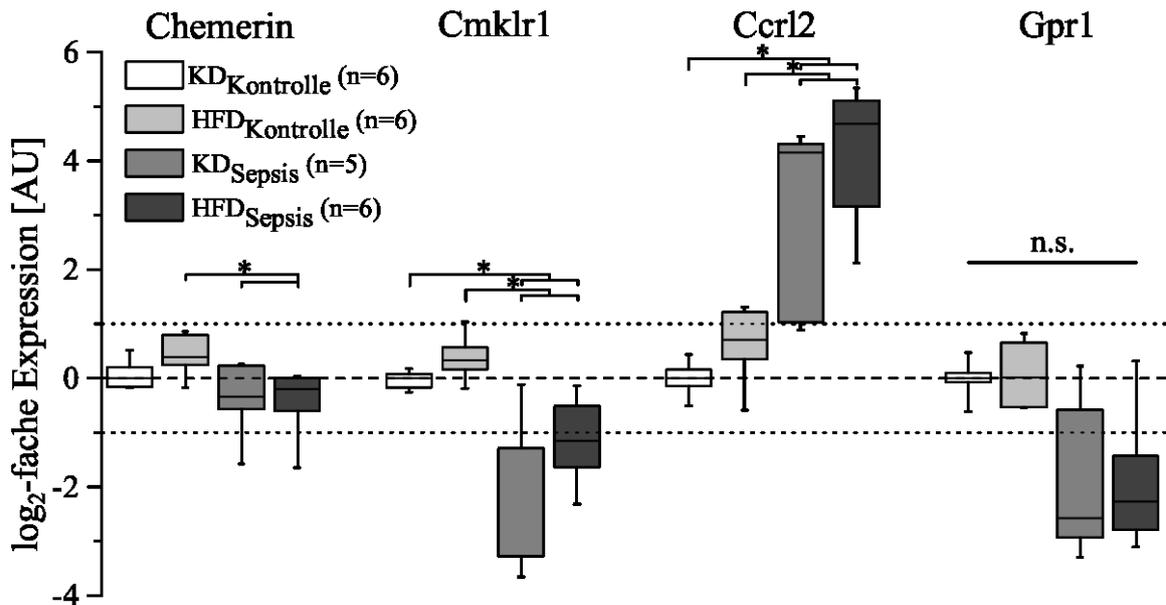


Abbildung 12: \log_2 -fache mRNA Expression von *Chemerin* und seinen Rezeptoren im murinen VAT. Die *Chemerin* VAT mRNA war sowohl bei KD_{Sep} - als auch HFD_{Sep} -Mäusen gegenüber HFD_{Kon} -Mäusen ($p=0,01$ und $p=0,003$) nicht jedoch gegenüber KD_{Kon} -Mäusen (jeweils $p > 0,05$) vermindert. Die *Cmklr1* mRNA war bei sowohl KD_{Sep} - als auch HFD_{Sep} -Mäusen im Vergleich zu KD_{Kon} - ($p=0,001$ und $p < 0,001$) und HFD_{Kon} -Mäusen ($p = 0,017$ und $p < 0,001$) signifikant vermindert. Die *Ccr12* mRNA war bei KD_{Sep} - und HFD_{Sep} -Mäusen im Vergleich zu KD_{Kon} - ($p=0,024$, beide) und HFD_{Kon} -Mäusen ($p=0,012$, beide) signifikant erhöht. Für die *Gpr1* mRNA-Expression konnte kein signifikanter Gruppenunterschied gefunden werden. * $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Kruskal-Wallis-Test und multiple Mann-Whitney-U-Tests mit post-hoc Bonferroni-Holm α -Fehlerkorrektur

4.4. Genexpression von Chemerin und seinen Rezeptoren in der murinen Leber

Ebenso wie im VAT kam es in der Leber im PCI-Sepsismodell zu einer statistisch signifikanten Verminderung der *Chemerin* mRNA-Expression gegenüber den Kontrollen nach Sepsisinduktion ($p < 0,05$) (Abbildung 13), welche für die HFD_{24h} -Gruppe auch ein biologisch relevantes Niveau erreichte. Außerdem war, wie schon im VAT, die *Ccr12* mRNA-Expression signifikant – und bei HFD_{24h} biologisch relevant – erhöht ($p < 0,05$)

Ergebnisse

(Abbildung 13). Für die *Cmklr1*- und die *Gpr1*-Expression war kein signifikanter Gruppenunterschied nachweisbar ($p > 0,05$) (Abbildung 13).

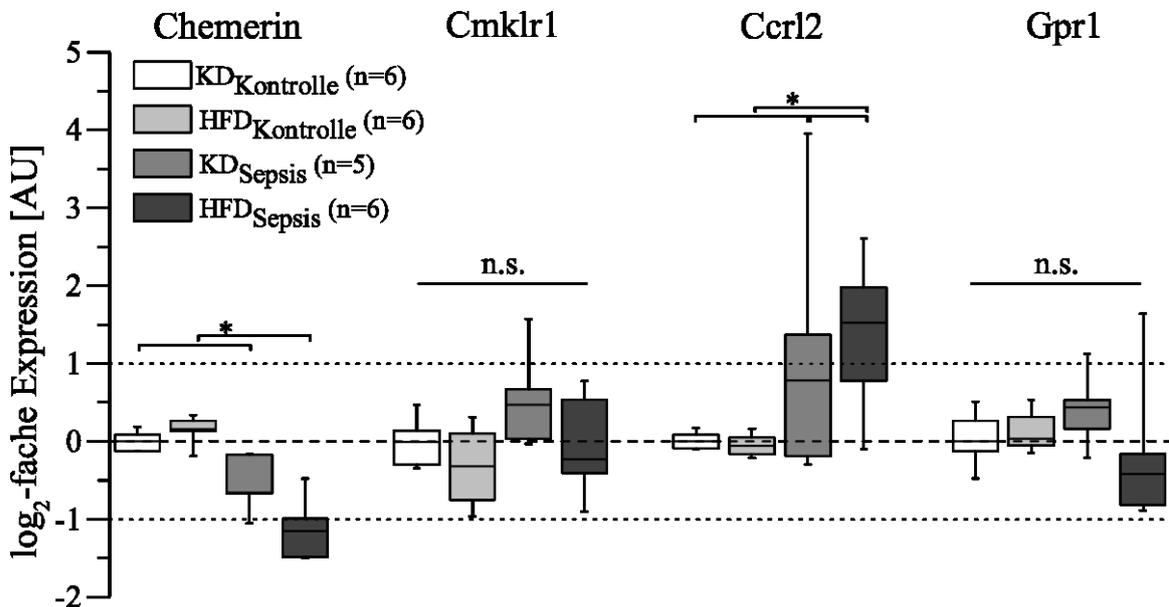


Abbildung 13: \log_2 -fache mRNA Expression von *Chemerin* und seinen Rezeptoren in der murinen Leber. Die *Chemerin* mRNA war sowohl bei KD_{Sep} - als auch HFD_{Sep} -Mäusen gegenüber den Fütterungskontrollen vermindert ($p=0,012$ und $p=0,008$). Die *Ccr12*-Expression war sowohl bei KD_{Sep} - als auch HFD_{Sep} -Mäusen gegenüber den Fütterungskontrollen signifikant erhöht ($p=0,008$ und $p=0,03$) als auch bei HFD_{Sep} gegenüber KD_{Sep} ($p=0,008$). Für die *Cmklr1*- und die *Gpr1*-Expression fanden sich keine signifikanten Unterschiede. * $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Kruskal-Wallis-Test und multiple Mann-Whitney-U-Tests mit post-hoc Bonferroni-Holm α -Fehlerkorrektur

Um einen Eindruck von der Expressionsstärke der einzelnen untersuchten Transkripte zu vermitteln, sind die mittleren Ct-Werte der jeweiligen Kontrollgruppe für die einzelnen Organe in der Tabelle 9 aufgelistet. Hierbei waren die Ct-Werte für die Chemerinrezeptoren im humanen VAT deutlich höher als im murinen VAT, was auf eine geringere Expression beim Menschen hindeutet. Die Chemerinexpression erscheint hier zwischen den Spezies in etwa vergleichbar.

Beim direkten Vergleich der Chemerinexpression zwischen muriner Leber und murinem VAT konnte in keiner der experimentellen Tiergruppen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p > 0,05$) (Abbildung 14), wobei jedoch die Streuung in der HFD_{Sep} -Gruppe sehr hoch ausfiel.

Ergebnisse

Tabelle 9: Ct-Werte für die einzelnen untersuchten Transkripte in den jeweiligen Organen bei Menschen und Mäusen

	Ct Chemerin	Ct CMKLR1	Ct CCRL2	Ct GPR1
VAT human	13,63	19,91	21,66	23,84
VAT murin	13,30	15,06	19,49	20,82
Leber murin	14,60	23,87	23,44	28,51

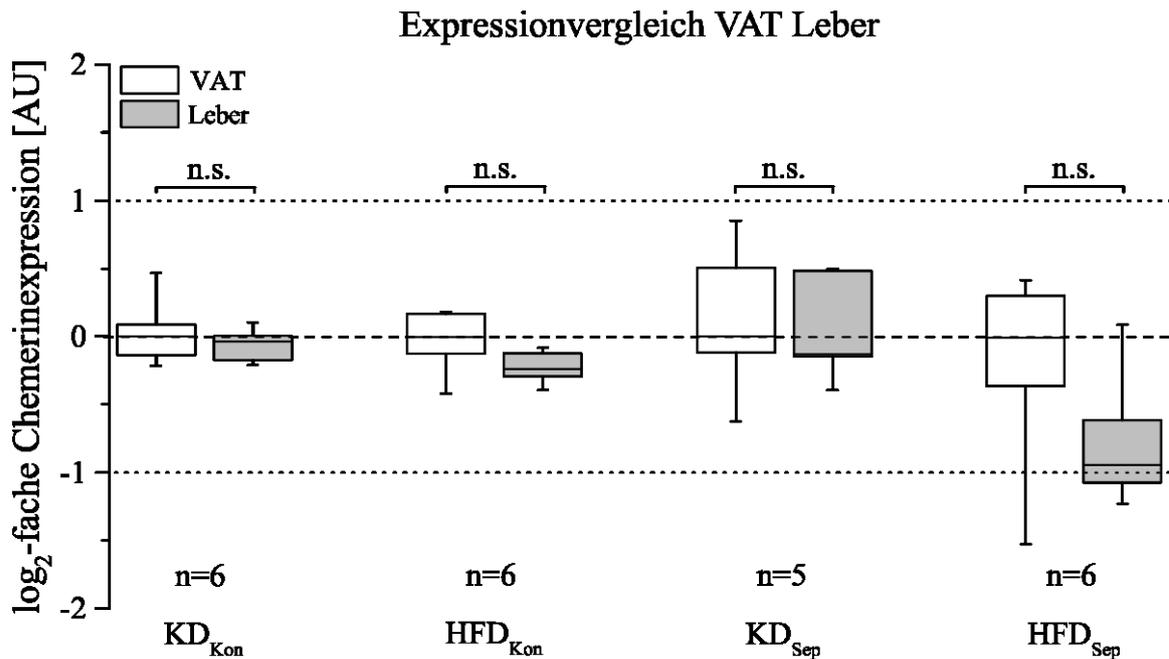


Abbildung 14: Dargestellt ist die Chemerinexpression in der murinen Leber im Vergleich zum murinen VAT, aufgetrennt nach den jeweiligen experimentellen Gruppen. In allen Gruppen war keine signifikant unterschiedliche Expression nachweisbar ($p > 0,05$). n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

4.5. Chemerinexpression im Inflammationsmodell der HepaRG-Zellen

Da für diese Arbeit keine humanen Leberproben von Patienten mit Sepsis zur Verfügung standen, wurden Zellen einer humanen Hepatozyten- und Gallengangsepithel-Zelllinie mit verschiedenen proinflammatorischen Stimulantien behandelt und hinsichtlich der Auswirkung auf die Chemerin mRNA Expression untersucht. Sowohl nach 6 stündiger als auch nach 24 stündiger Stimulation mit dem Zytokinmix kam es zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Chemerinexpression im Vergleich zur Kontrollbehandlung (Abbildung 15). Diese fiel nach 24 Stunden deutlich höher aus und erreichte mit einer im Median mehr als Verdopplung der Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrolle auch ein biologisch bedeutsames Niveau (Abbildung 15). Bei Stimulation mit einem Zehntel oder

Ergebnisse

Hundertstel Konzentration des Zytokinmix (ZM 1/10 und ZM 1/100) fiel der Effekt dosisabhängig geringer aus als nach Stimulation mit dem nativen Zytokinmix (Abbildung 15). Nach Stimulation mit humanem septischem Serum ließ sich nach 24 Stunden kein Effekt auf die Chemerin mRNA-Expression nachweisen (Abbildung 15). Ebenso war, trotz teilweise statistisch signifikanter Unterschiede ($p < 0,05$), kein biologisch relevanter Effekt der Einzelkomponenten des Zytokinmixes auf die Chemerin mRNA-Expression nach 6 oder 24 Stunden festzustellen (Abbildung 15).

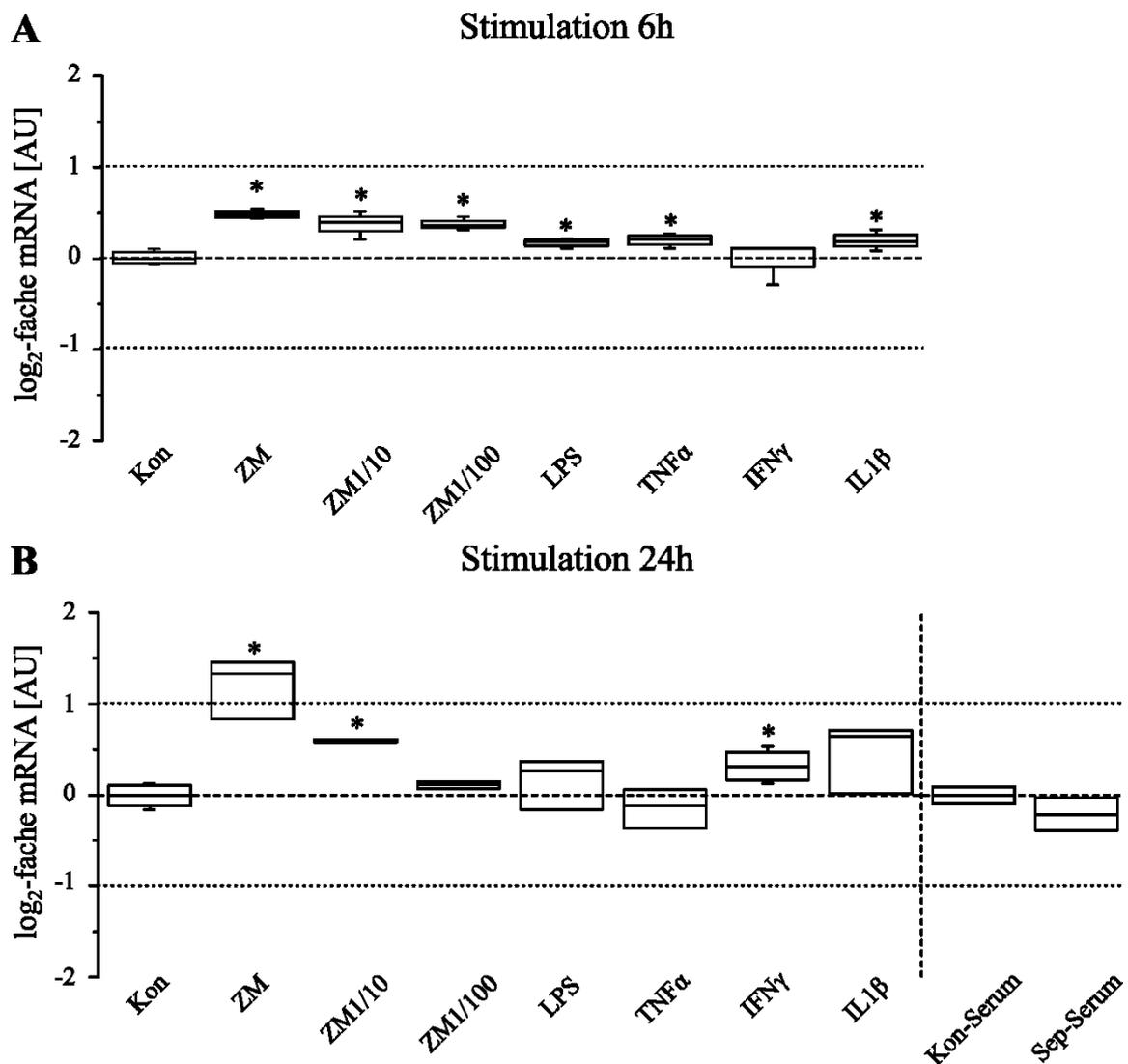


Abbildung 15: Relative Chemerinexpression nach Stimulation zu den Zeitpunkten 6 (A) und 24 Stunden (B). Signifikante Hochregulation der Chemerinexpression zum 6h-Zeitpunkt mit ZM, LPS, TNF α und IL1 β , jedoch ohne biologische Signifikanz (A). Signifikante Hochregulation der Chemerinexpression zum 24h-Zeitpunkt mit ZM pur, 1/10 verdünnt und IFN γ . Nur ZM ergab eine biologisch relevante Expressionsänderung. Die Stimulation mit septischem Serum ergab keinen Effekt (B). * $p < 0,05$. IFN γ , Interferon γ ; IL1 β , Interleukin 1 β ; Kon, Kontrolle; Kon-Serum, Kontroll-Serum; LPS, Lipopolysaccharid; Sep-Serum, septisches Serum; TNF α , Tumornekrosefaktor α ; ZM, Zytokinmix.

4.6. Assoziation mit Parametern der systemischen Inflammation

Um tiefere Einblicke in eine vermutete pathophysiologische Funktion des Chemerins in der Wirtsreaktion bei Sepsis zu erhalten, wurde die Assoziation des zirkulierenden Chemerins und der Chemerin mRNA-Expression im VAT mit Parametern der systemischen und lokalen Inflammation untersucht.

Die Chemerinspiegel korrelierten bei den Sepsispatienten signifikant positiv mit der zirkulierenden Leukozytenzahl ($r=0,628$, $p<0,05$) (Abbildung 16). Solch ein Zusammenhang fand sich nicht für Kontroll- und T2D-Patienten (s. Tabelle 8). In Quantilenanalysen zeigte sich zudem ein Zusammenhang der Chemerinspiegel mit dem CRP. Hierzu wurden in den jeweiligen Gruppen Patienten mit hohen und niedrigen CRP-Werten bezüglich Chemerin und Chemerin VAT mRNA verglichen. Für die Kontroll- und T2D-Patienten waren dies Werte unterhalb 2 mg/dl versus Werte oberhalb 2 mg/dl, entsprechend dem im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin Jena üblichen Grenzwert für ein normales CRP, und für die Sepsispatienten Werte unterhalb der 50%-Perzentile und Werte oberhalb der 50%-Perzentile (siehe Anhang 8.4, Tabelle 17). Bei T2D-Patienten war Chemerin bei erhöhten CRP-Werten ebenfalls signifikant erhöht ($p<0,05$) (Abbildung 17). Solch ein Unterschied fand sich jedoch nicht in den beiden anderen Patientengruppen. Wenn man diesen Zusammenhang jedoch bei den Sepsispatienten nach dem Geschlecht getrennt betrachtete, ergaben sich bei den männlichen Patienten niedrigere Chemerinspiegel bei höherem CRP. Dieser Zusammenhang erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,083$) und war für die weiblichen Sepsispatienten nicht nachweisbar (Abbildung 18). Höhere CRP-Werte waren bei Sepsispatienten zudem signifikant negativ mit der Chemerin mRNA-Expression im VAT assoziiert ($p<0,05$) (Abbildung 19). Eine solche Assoziation war bei Kontroll- und T2D-Patienten nicht festzustellen (Abbildung 19).

Ergebnisse

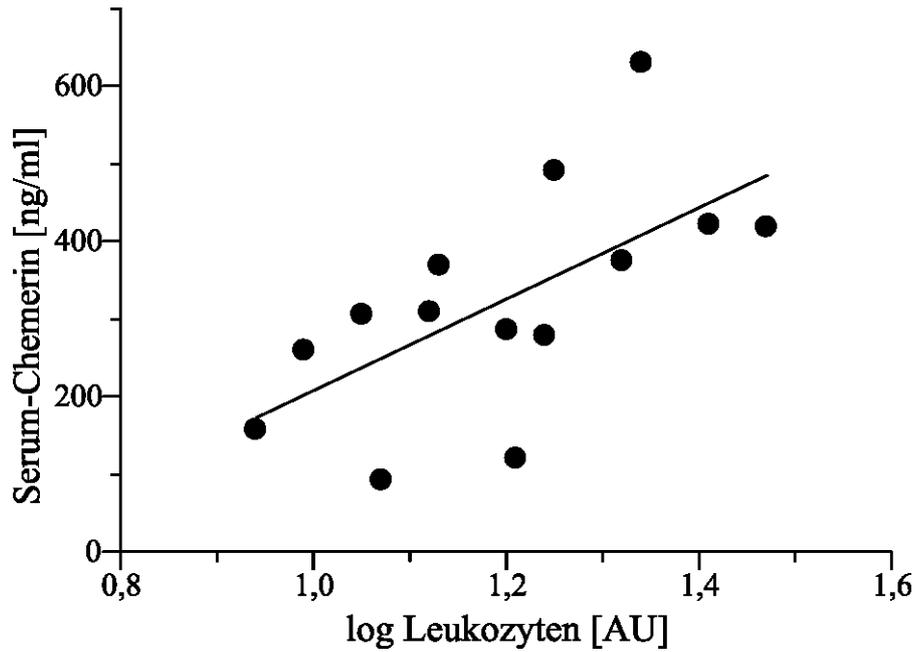


Abbildung 16: Die zirkulierenden Chemerinspiegel korrelieren bei Sepsispatienten mit der logarithmierten Blut-Leukozytenzahl ($r_s=0,628$; $p=0,016$; $n=14$).

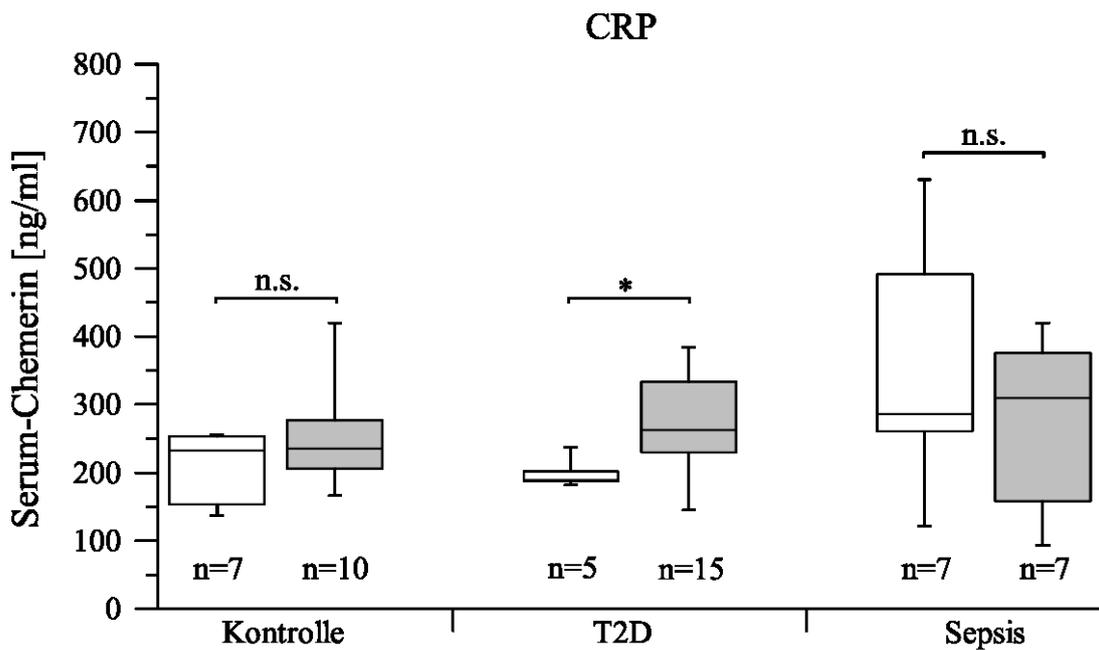


Abbildung 17: Vergleich der zirkulierenden Chemerinspiegel zwischen Patienten mit hohem (□) oder niedrigem (■) Serum-CRP. T2D-Patienten wiesen signifikant höhere Chemerinspiegel auf, wenn das CRP > 2 mg/L ($p=0,013$). Kein signifikanter Unterschied wurde für Kontroll- (CRP > 2 mg/L; $p>0,05$) oder Sepsispatienten (CRP > 50%-Perzentile; $p>0,05$) gefunden. * $p<0,05$; n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

Ergebnisse

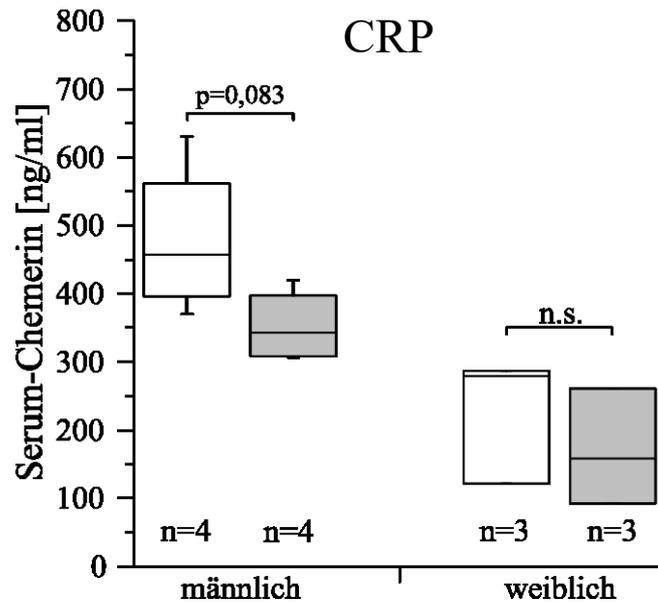


Abbildung 18: Geschlechtsbezogener Vergleich der Chemerinspiegel zwischen Sepsispatienten mit einem CRP < 50% Perzentile (□) und solchen mit CRP > 50% Perzentile (■). Höheres CRP war im Trend mit niedrigerem Chemerinspiegel bei männlichen ($p=0,083$) nicht jedoch bei weiblichen Patienten assoziiert ($p>0,10$). * $p<0,05$; n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

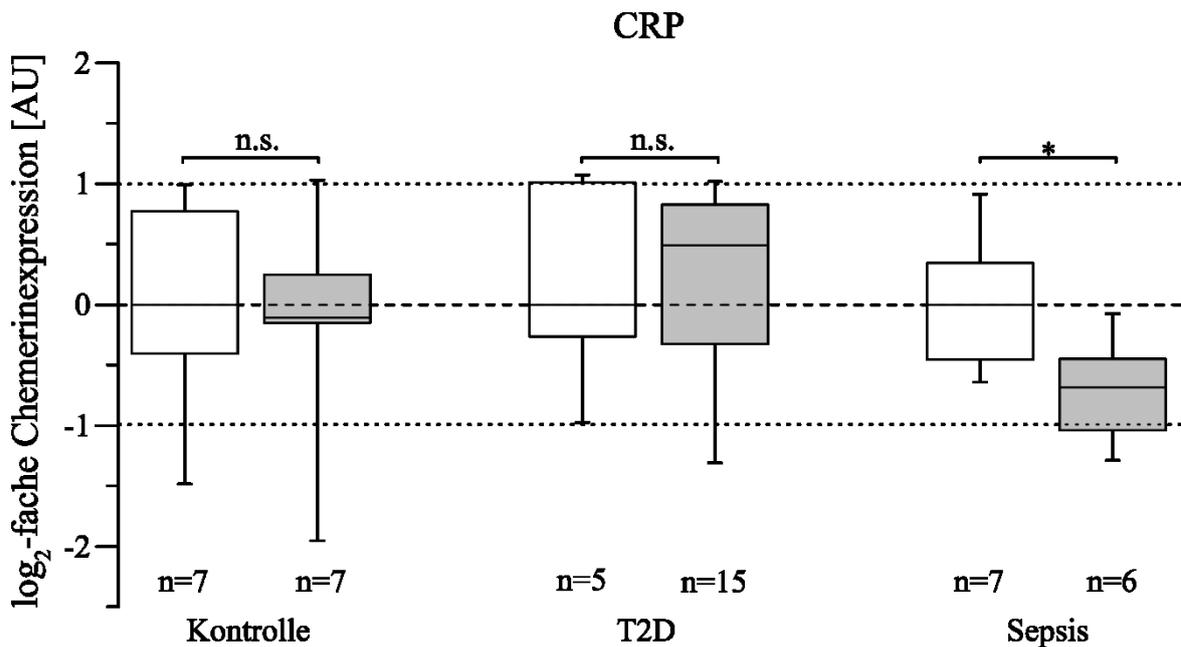


Abbildung 19: Vergleich der VAT mRNA-Expression von Chemerin zwischen Patienten mit niedrigem (□) oder hohem (■) Serum-CRP. Sepsispatienten hatten niedrigere Chemerin-mRNA, wenn Serum-CRP > 230 mg/L ($p=0,022$). Kein Unterschied bestand diesbezüglich bei den Kontroll- oder Diabetespatienten (jeweils CRP > 2 mg/L; $p>0,05$). * $p<0,05$; n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

4.7. Assoziation mit Parametern des Glukosemetabolismus

Bei den Sepsispatienten war in der Perzentilenanalyse eine Assoziation von hohen Nüchternglukosespiegeln mit höheren Chemerinspiegeln festzustellen ($p < 0,05$) (Abbildung 20). Für die Kontroll- und T2D-Gruppen war solch eine Assoziation mit der Nüchternglukose nicht zu finden ($p > 0,05$) (Abbildung 20). Mit der Nüchtern- und der OP-Glukose bestand in der Kontrollgruppe jedoch eine signifikante positive lineare Korrelation (jeweils $p < 0,05$) (Abbildung 21). Bei den Sepsispatienten bestand eine signifikante positive logarithmische Korrelation der OP-Glukose mit den Chemerinspiegeln ($p < 0,05$) sowie im Trend eine positive lineare Korrelation der Nüchternglukose mit den Chemerinspiegeln ($p < 0,10$) (Abbildung 21). Ein solcher Zusammenhang war für T2D-Patienten nicht nachweisbar (Abbildung 21). Ein hoher BMI war bei den T2D-Patienten mit höheren zirkulierenden Chemerinspiegeln assoziiert ($p < 0,05$), nicht jedoch bei Kontroll- oder Sepsis-Patienten (Abbildung 22). Für den HOMA-IR und Chemerin war eine solche Assoziation in der Perzentilenanalyse in keiner der drei Studiengruppen nachweisbar (Abbildung 23). Für die Grenzwerte der Perzentilenanalysen siehe Anhang 8.4, Tabelle 17.

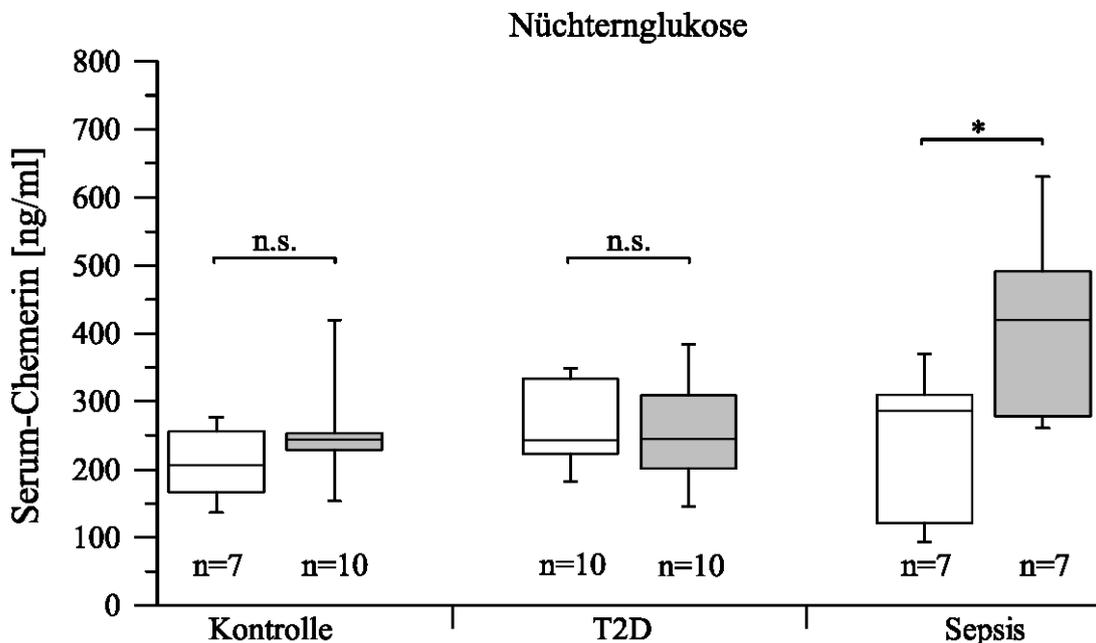


Abbildung 20: Vergleich der zirkulierenden Chemerinspiegel zwischen Patienten mit niedriger (□) oder hoher (■) Nüchternglukose. Sepsispatienten hatten höhere Chemerinspiegel, wenn die Nüchternglukose > 6 mmol/l betrug ($p = 0,016$). Für Kontroll- (FG $> 5,1$ mmol/l) oder T2D-Patienten (FG $> 8,0$ mmol/l) war diesbezüglich kein signifikanter Unterschied nachweisbar. * $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

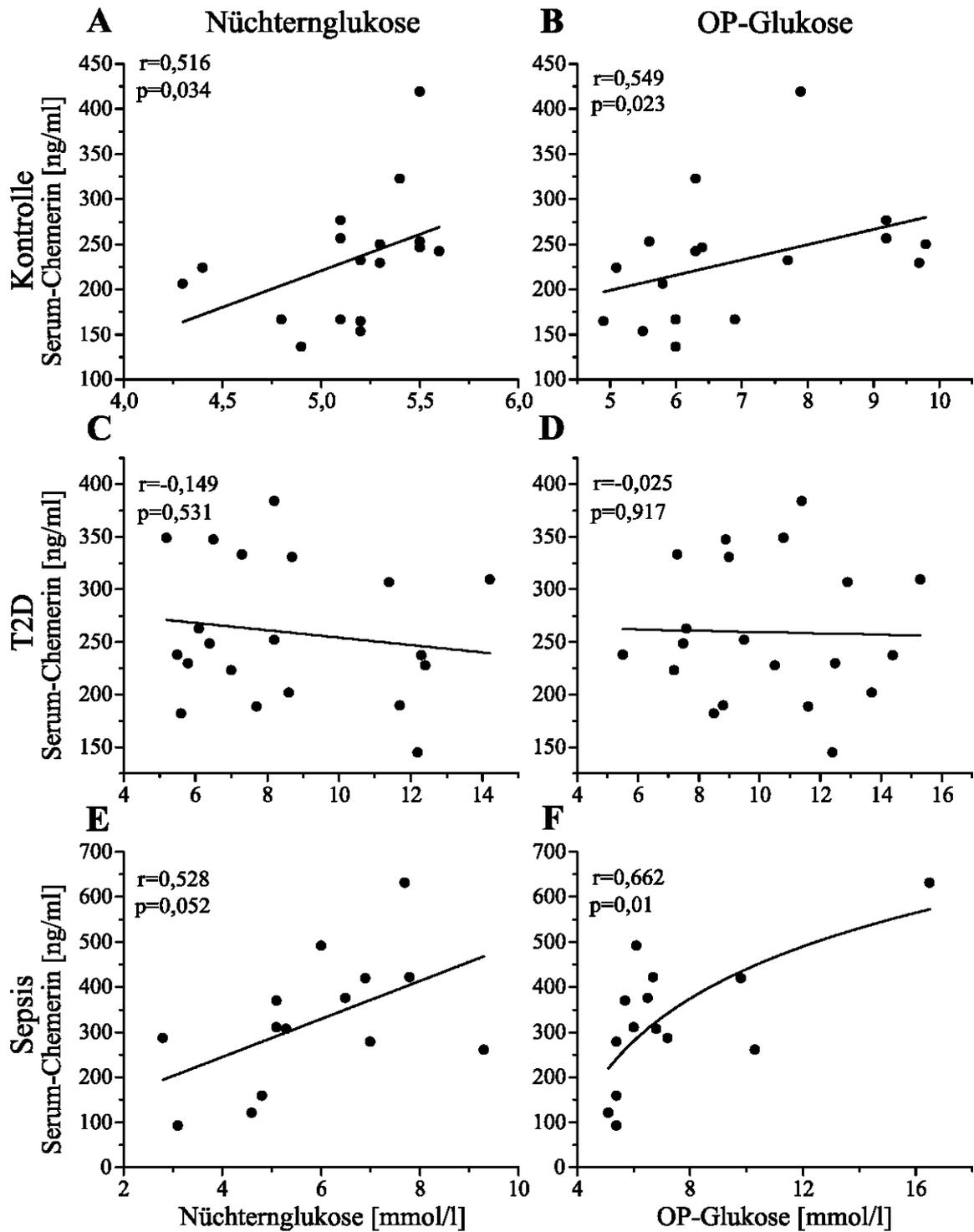


Abbildung 21: Dargestellt ist das Serum-Chemerin in Abhängigkeit von Nüchtern-glukose und OP-Glukose für die drei Studiengruppen. Bei den Kontrollpatienten ($n=17$) korrelierte das Chemerin signifikant positiv mit Nüchtern- (A) und OP-Glukose (B) (Spearman-Korrelation). Bei den T2D-Patienten ($n=20$) korrelierte das Serum-Chemerin nicht mit der Nüchtern- (C) oder OP-Glukose (D). Eine positive lineare Korrelation konnte bei den Sepsispatienten ($n=14$) für die Nüchtern-glukose nachgewiesen werden (E, Pearson-Korrelation). Eine logarithmische Korrelation war bei den Sepsispatienten für die OP-Glukose nachweisbar (F).

Ergebnisse

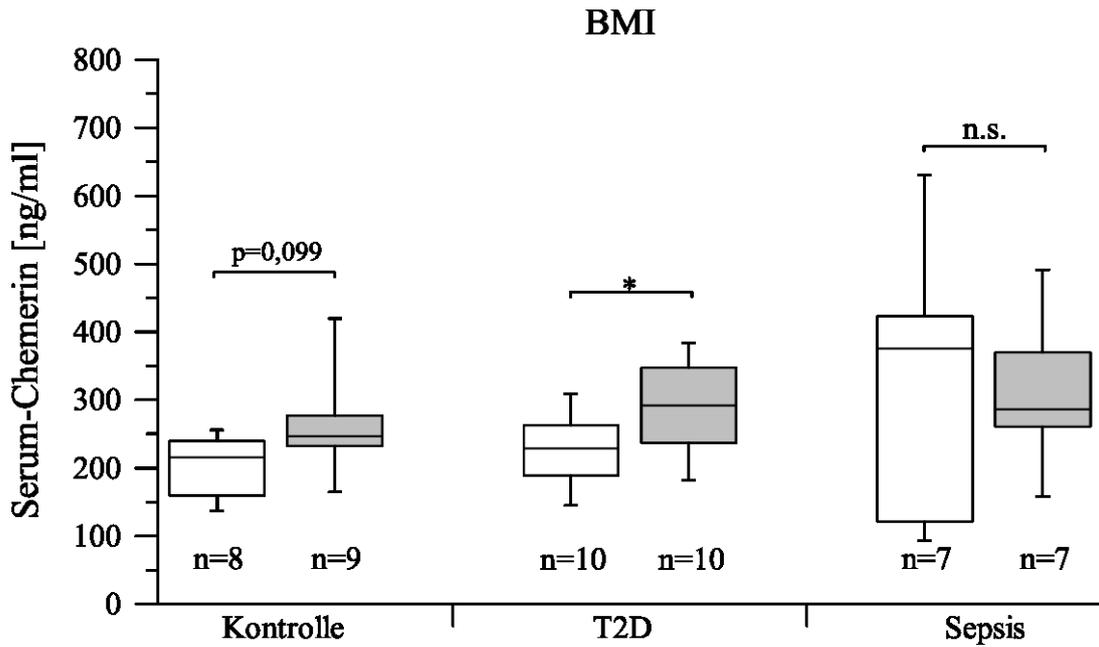


Abbildung 22: Vergleich der zirkulierenden Chemerinspiegel zwischen Patienten mit niedrigem (\square) oder hohem (\blacksquare) BMI. Die Chemerinspiegel waren signifikant höher bei T2D-Patienten ($p=0,043$) und im Trend erhöht bei Kontrollpatienten ($p=0,099$), wenn der BMI > 50%-Perzentile war. Bei den Sepsispatienten war kein diesbezüglicher Unterschied nachweisbar. * $p<0,05$; n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

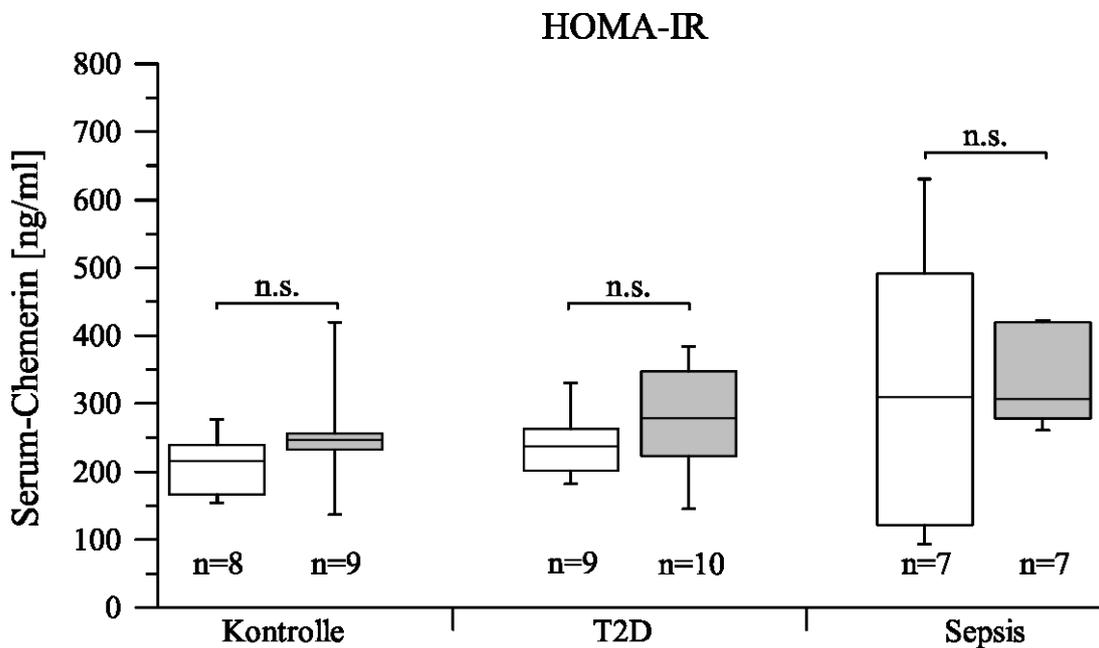


Abbildung 23: Vergleich der zirkulierenden Chemerinspiegel zwischen Patienten mit einem HOMA-IR < 50%-Perzentile (\square) und HOMA-IR > 50%-Perzentile (\blacksquare). Die Chemerinspiegel waren bei Kontroll-, T2D- und Sepsispatienten diesbezüglich nicht signifikant unterschiedlich. n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

Ergebnisse

Im untersuchten Mausmodell konnte ebenfalls eine positive Assoziation des zirkulierenden Chemerins mit den Glukosespiegeln gezeigt werden. Zum Zeitpunkt 0h und 6h nach Sepsisinduktion waren hohe Chemerinspiegel mit höheren Plasma-Glukosespiegeln assoziiert ($p < 0,05$) (Abbildung 24A und B). Diese Assoziation war jedoch deckungsgleich mit den Fütterungsgruppen und 24h nach Sepsisinduktion nicht mehr nachweisbar ($p = 0,70$) (Abbildung 24C).

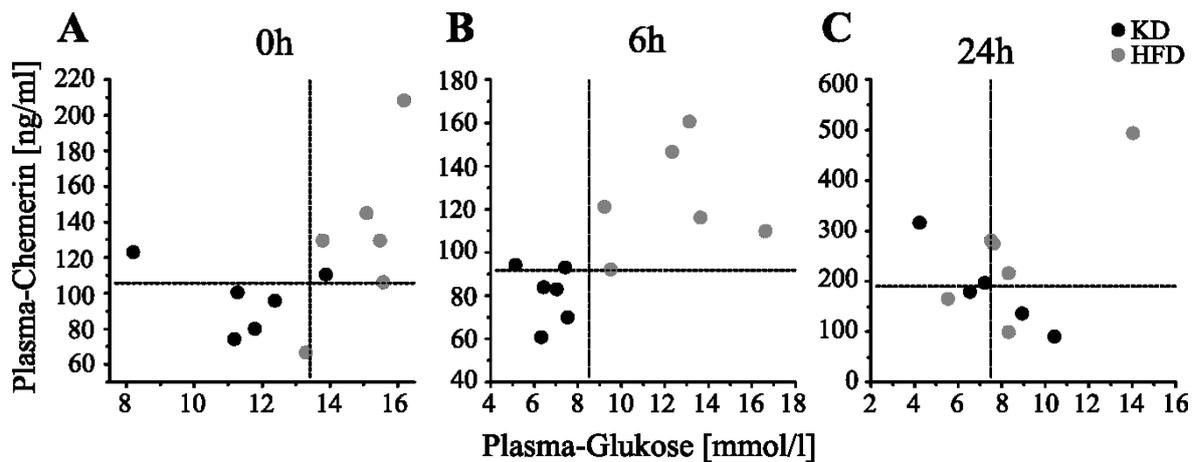


Abbildung 24: Dargestellt ist die Assoziation der Plasma-Chemerinspiegel mit der Plasmaglukose im Mausmodell zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die gestrichelten Linien zeigen den jeweiligen Median für Plasma-Chemerin oder Plasma-Glukose an. Zum Zeitpunkt 0h (A) und 6h (B) waren hohe Chemerinspiegel mit hohen Glukosewerten assoziiert ($p = 0,021$), während eine solche Assoziation zum 24h Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar war (C) ($p = 0,70$). χ^2 -Test

4.8. Identifikation unabhängiger Variablen

Um herauszufinden, ob die mit Chemerin assoziierten Parameter der systemischen Inflammation und metabolischen Dysregulation auch unabhängige Variablen darstellen, wurden multivariate lineare Regressionsmodelle mit Chemerin als abhängiger Variable gerechnet (Tabelle 10). In diesen Regressionsanalysen blieb das Geschlecht unabhängig mit den Chemerinspiegeln assoziiert. Bei den Sepsispatienten war hierbei das männliche Geschlecht mit höheren Chemerinspiegeln verbunden, während männliche T2D-Patienten niedrigere Chemerinspiegel aufwiesen als weibliche (Modell Sepsis A, B und C, Modell Diabetes, Tabelle 10). Auch die Assoziationen mit Parametern der systemischen Inflammation konnten mit dieser zweiten statistischen Methode nochmals bestätigt werden. Bei Sepsispatienten war das CRP unabhängig negativ mit den zirkulierenden Chemerinspiegeln assoziiert, wobei die statistische Signifikanz knapp verfehlt wurde

Ergebnisse

($p=0,079$) (Modell Sepsis C; Tabelle 10). Bei den T2D-Patienten war das CRP wiederum positiv und signifikant unabhängig mit Chemerin assoziiert ($p<0,05$; Modell Diabetes; Tabelle 10). Als Parameter der Dysregulation des Glukosemetabolismus waren der HOMA-IR oder die intraoperativen Glukosespiegel bei Sepsispatienten signifikant und unabhängig mit dem zirkulierenden Chemerin assoziiert (Modell Sepsis A und B; Tabelle 10). Der BMI war in der T2D-Gruppe positiv mit Chemerin assoziiert, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (Modell Diabetes; Tabelle 10; $p=0,097$).

Tabelle 10: Multivariate lineare Regression mit Chemerin als abhängiger Variable

	Modell Sepsis A β-Koeffizient (p-Wert)	Modell Sepsis B β-Koeffizient (p-Wert)	Modell Sepsis C β-Koeffizient (p-Wert)	Modell Diabetes β-Koeffizient (p-Wert)
Unabhängige Variablen	R=0,915; R ² =0,837; adj. R ² =0,765; p=0,001	R=0,897; R ² =0,805; adj. R ² =0,693; p=0,013	R=0,843; R ² =0,711; adj. R ² =0,582; p=0,016	R=0,799; R ² =0,638; adj. R ² =0,535; p=0,004
Geschlecht	-0,495 (0,017)	-0,749 (0,005)	-0,849 (0,004)	0,359 (0,049)
Alter	-0,220 (0,213)	-0,033 (0,867)	-0,110 (0,617)	0,174 (0,324)
BMI	0,116 (0,427)	0,217 (0,248)	0,070 (0,717)	0,292 (0,097)
Log OP Glukose	0,559 (0,005)	-	-	-
Log HOMA-IR	-	0,426 (0,042)	-	-
CRP	-	-	-0,394 (0,079)	-
Log CRP	-	-	-	0,552 (0,006)

4.9. Assoziation mit Fettgewebsmakrophagen und Adipozytengröße

Da das Fettgewebe in der Literatur als wichtiger Ort der Chemerinsynthese beschrieben ist, sollte eine Untersuchung des Zusammenhangs zwischen VAT-Inflammation, Adipozytengröße und Serum-Chemerin bei Patienten mit Sepsis erfolgen. Histologische Fettgewebsschnitte zweier Sepsispatienten waren aufgrund Entnahme-bedingter Artefakte leider nicht für die Makrophagenzählung auswertbar.

Auf mRNA-Ebene war die Chemerin-Expression im VAT deutlich signifikant negativ mit der CD68 mRNA-Expression in allen Gruppen korreliert ($r_{\text{Kontrolle}}=-0,926$, $r_{\text{T2D}}=-0,848$ und $r_{\text{Sepsis}}=-0,646$, jeweils $p<0,05$) (Abbildung 25).

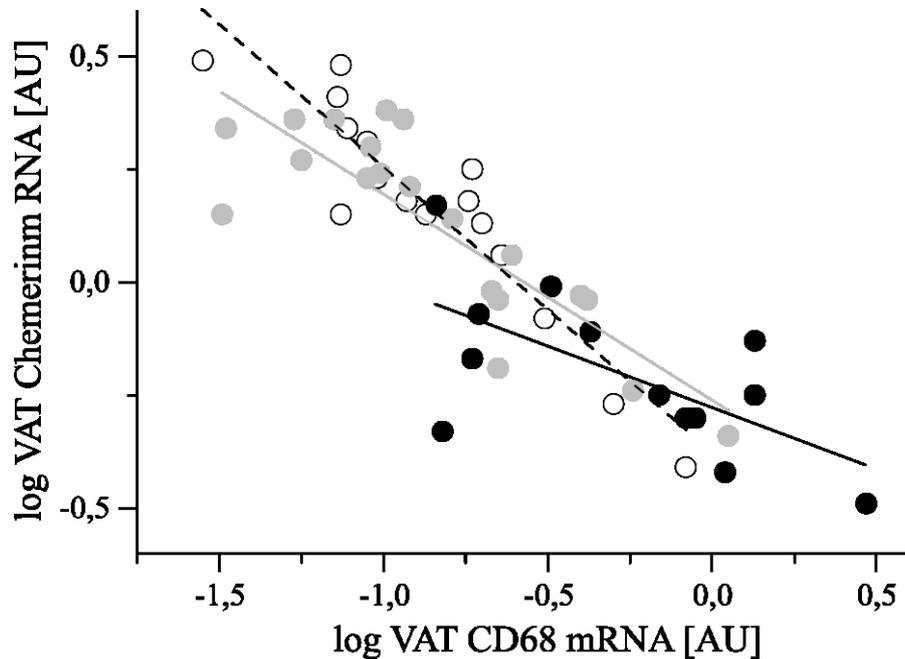


Abbildung 25: Die VAT mRNA Expression von Chemerin war in allen Gruppen negativ mit der CD68 VAT mRNA-Expression korreliert (Kontrollen(○): $r_{co}=-0,926$; $p<0,001$; $n=16$; T2D(●): $r_{T2D}=-0,848$; $p<0,001$; $n=20$; Sepsis(●): $r_s=-0,646$; $p=0,017$; $n=13$).

Eine Korrelation zwischen Adipozytengröße oder VAT-Makrophagenzahl und Serum-Chemerinspiegeln konnte zunächst nicht nachgewiesen werden (Abbildung 26 A und B, $p>0,05$). Bei der Betrachtung der CD68-gefärbten VAT-Schnitte fiel jedoch auf, dass unterschiedliche Verteilungsmuster der Makrophagen im VAT zu beobachten waren. Diese Verteilungsmuster waren: diffus, wobei die Makrophagen gleichmäßig zwischen den Adipozyten verteilt waren; perivasal, wobei sich die Makrophagen um kleine Blutgefäße gruppiert angeordnet zeigten; koronar, wobei einzelne Adipozyten oder Adipozytengruppen massiv von Makrophagen eingeschlossen wurden (Abbildung 27).

Ergebnisse

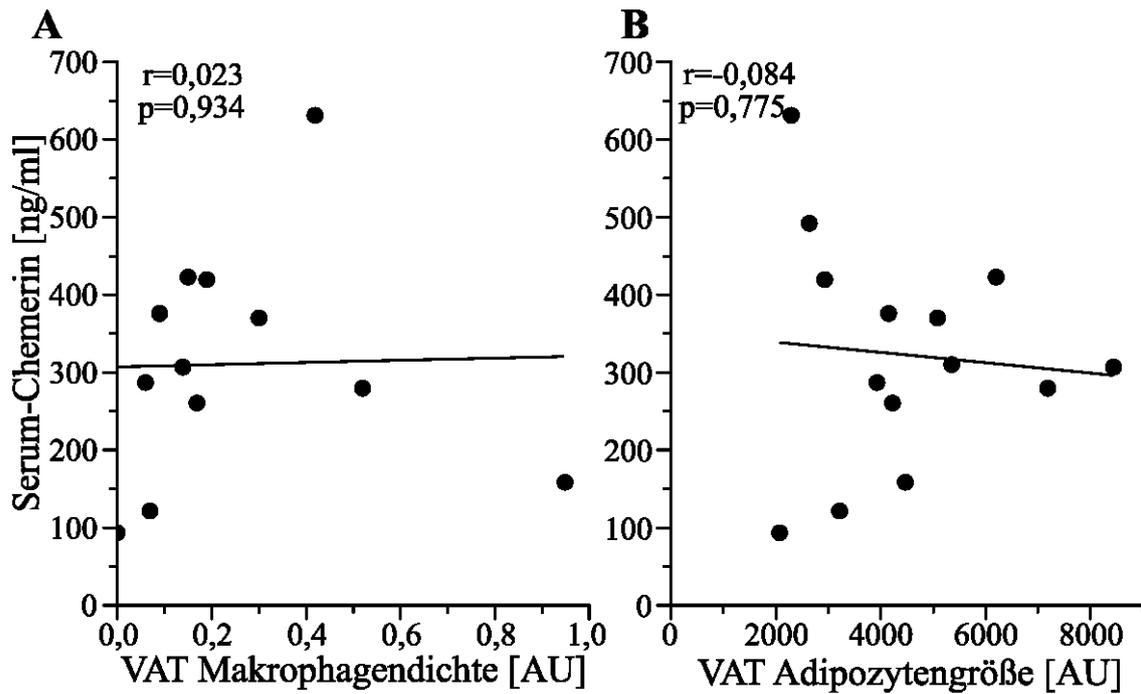


Abbildung 26: Korrelation des Serum-Chemerins mit der Makrophagedichte (n=12) (A) und der Adipozytengröße (n=14) (B) im VAT von Sepsispatienten.

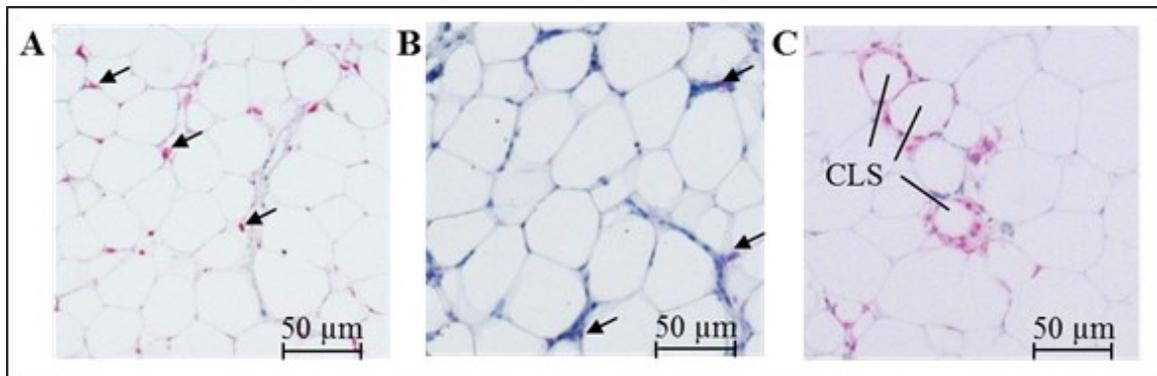


Abbildung 27: Darstellung der Makrophagenverteilungsmuster im VAT. Einzelne Makrophagen sind exemplarisch mit einem Pfeil (\blacktriangleleft) gekennzeichnet. **A:** diffuses Verteilungsmuster. **B:** perivasionales Verteilungsmuster. **C:** koronares Verteilungsmuster mit Crown-like-structures (CLS).

Zwischen diesen Verteilungsmustern konnte ein signifikanter Unterschied des Serumchemerins, mit den höchsten Werten bei diffuser Verteilung, festgestellt werden (Abbildung 28A, $p < 0,05$). Führt man die oben genannte Korrelationsanalyse nun nur bei solchen Patienten durch, die ein diffuses oder perivasionales Makrophagenverteilungsmuster aufwiesen, oder hinsichtlich der Färbung negativ waren, so korrelierten die Serumchemerinspiegel signifikant mit der Makrophagenzahl ($p < 0,05$) (Abbildung 28B).

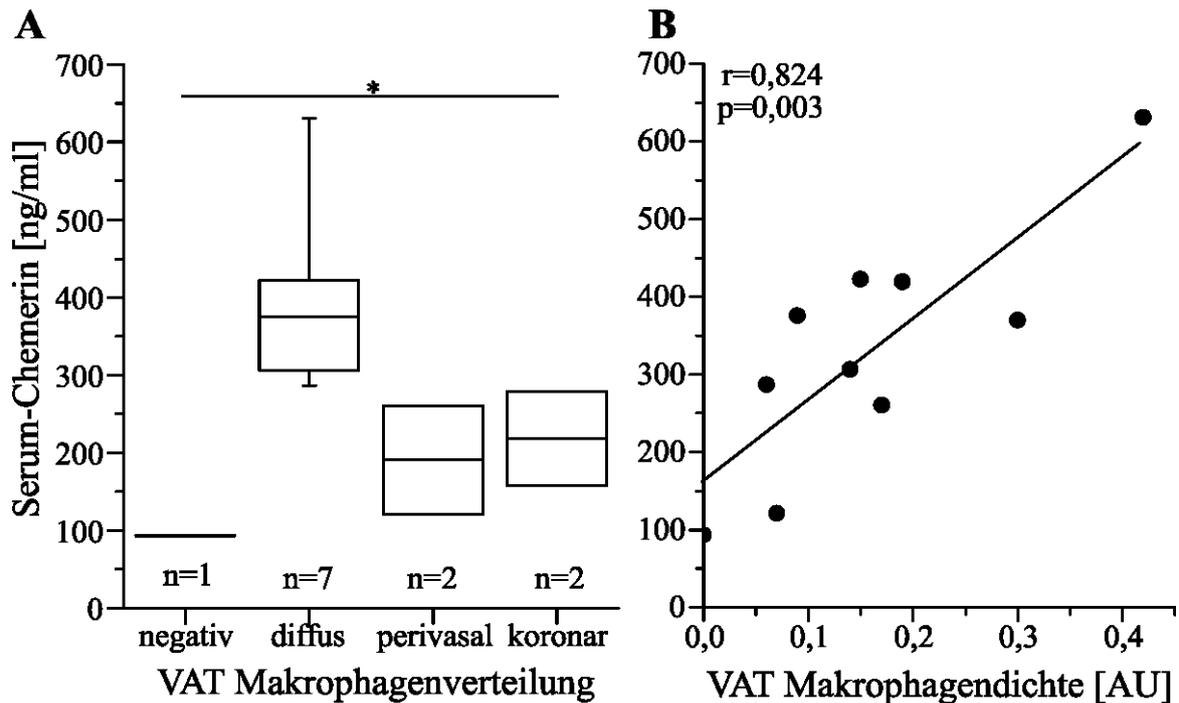


Abbildung 28: A: Unterschiede des Serum-Chemerins bei verschiedenen Verteilungsmustern der Makrophagen im VAT ($p=0,036$). B: Bei Sepsispatienten mit diffusem und perivalem Makrophagenverteilungstyp korreliert das Serum-Chemerin signifikant mit der Makrophagendichte im VAT ($n=10$). $*p<0,05$; Kruskal-Wallis-Test

4.10. Assoziation mit der Krankheitsschwere und –prognose

Neben der Evidenz für eine mögliche Beteiligung von Chemerin in der Wirtsreaktion bei Sepsis, wurde Chemerin hinsichtlich seines möglichen diagnostischen Nutzens in Patienten mit Sepsis untersucht. Eine direkte Assoziation der Serumchemerinspiegel mit dem 28-Tage-Überleben nach Studieneinschluss (Abbildung 29) sowie mit dem SOFA- und SAPS II-Score am Tag nach OP (Tabelle 18) konnte nicht gefunden werden. Allerdings bestanden höhere Serumchemerinspiegel bei Patienten mit einem APACHE II Score größer als 24 Punkten ($p<0,05$) (Abbildung 30A), was einer prognostizierten Mortalität von mehr als 40% entspricht (Knaus et al. 1985). Dieser Unterschied war nach Adjustierung für CRP oder die Nüchterninsulinspiegel nicht mehr nachweisbar ($p>0,05$), bestand jedoch nach Adjustierung für Alter, BMI oder den HbA_{1c} fort ($p<0,05$) (Abbildung 31).

Ein erhöhter Clinical Severity Score (CSS) (Gonnert et al. 2011) als Maß der Krankheitsschwere der Sepsis in Nagern war signifikant mit erhöhten zirkulierenden Chemerinspiegeln im PCI-Modell der Maus verbunden ($p<0,05$) (Abbildung 30B).

Ergebnisse

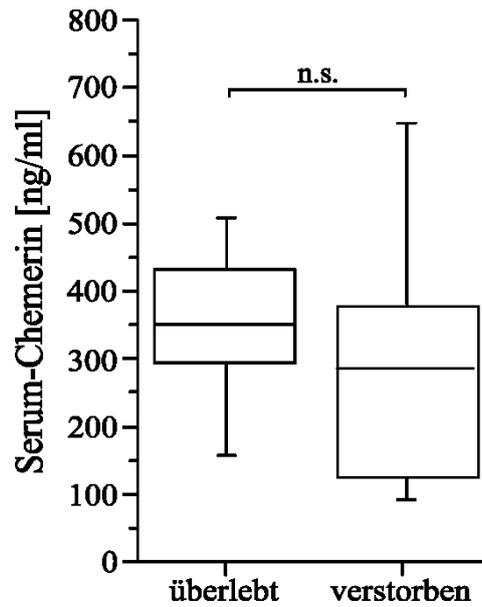


Abbildung 29: Das Serum-Chemerin war nicht signifikant unterschiedlich zwischen im Krankheitsverlauf nach 28 Tagen überlebenden und verstorbenen Sepsispatienten der INSIGHT-Gruppe ($p=0,371$). n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

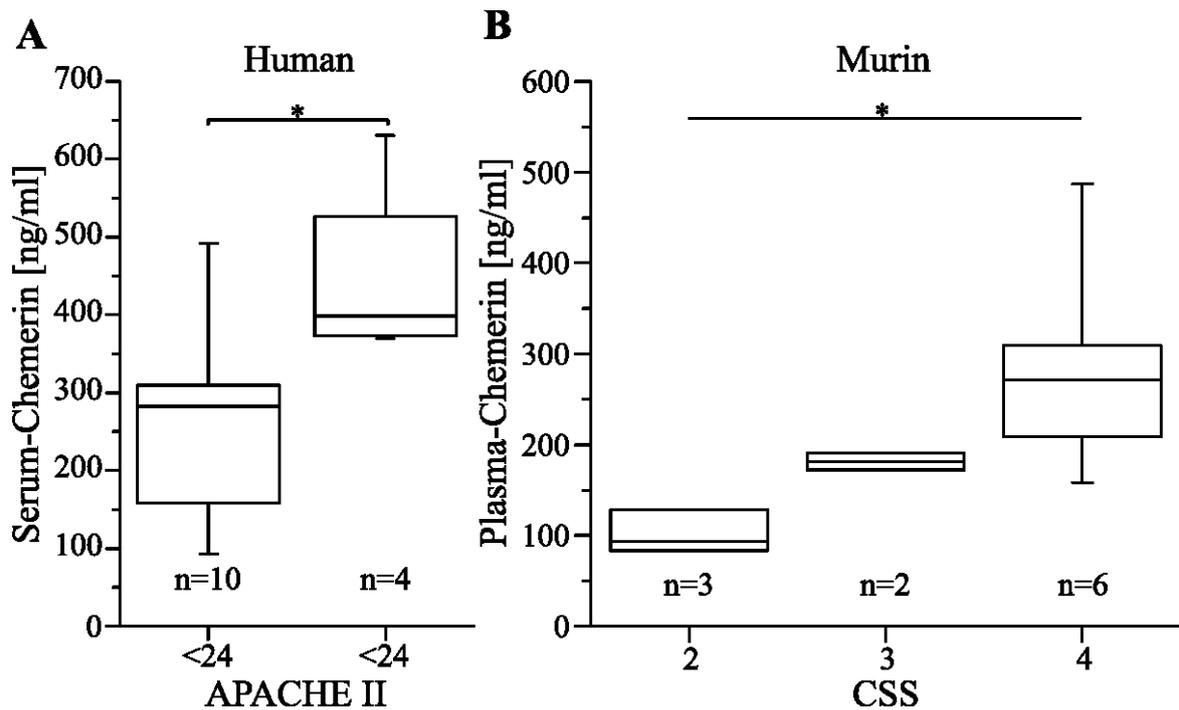


Abbildung 30: Assoziation des zirkulierenden Chemerins mit Parametern der Prognose und Krankheitsschwere bei Sepsis. **A:** Das zirkulierende Chemerin war bei Patienten mit einem APACHE II Score > 24 Punkten signifikant erhöht ($p=0,036$). **B:** Bei septischen Mäusen, war das zirkulierende Chemerin signifikant erhöht, wenn der Clinical Severity Score (CSS) ebenfalls erhöht war ($p=0,031$). * $p<0,05$; Mann-Whitney-U-Test (A) und Kruskal-Wallis-Test (B)

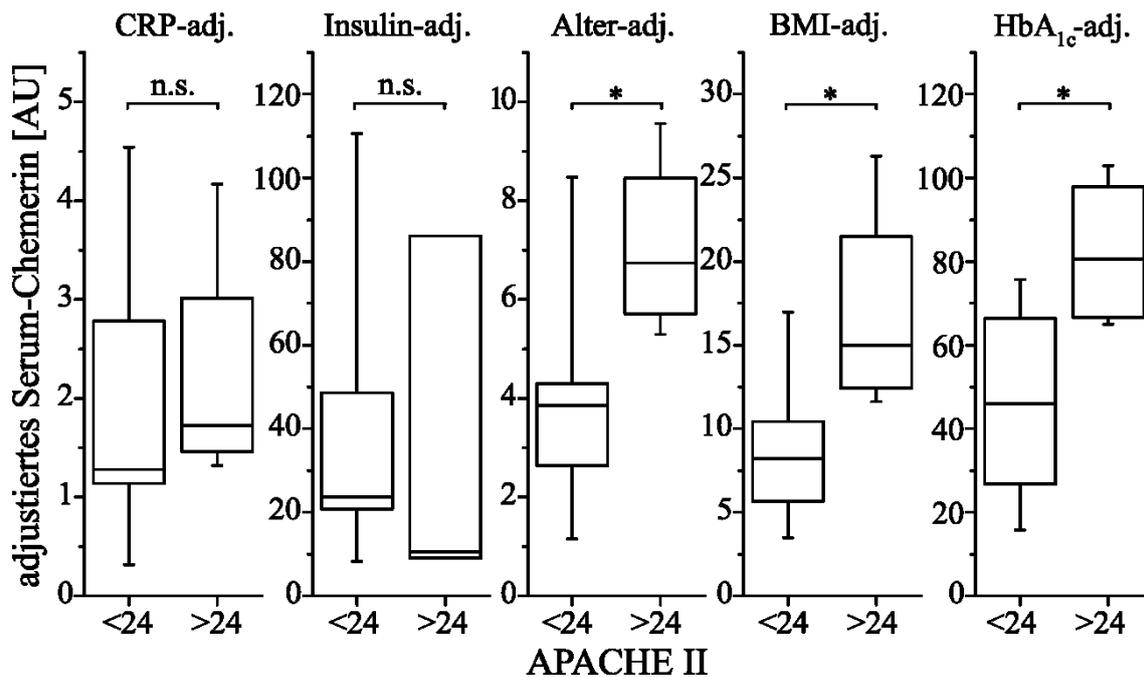


Abbildung 31: Veränderung des Unterschieds zwischen Patienten mit APACHE II Score <24 und >24 Punkten durch Adjustierung für verschiedene klinische Parameter. Nach Adjustierung für CRP und Insulin verschwindet der Unterschied ($p=0,414$ und $p=0,864$), während das Serum-Chemerin nach Adjustierung für Alter, BMI oder HbA_{1c} signifikant unterschiedlich bleibt ($p=0,034$, $p=0,036$ und $p=0,024$). * $p<0,05$; n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

4.11. Validierung in einer zweiten Studienkohorte

Um den Zusammenhang zwischen zirkulierendem Chemerin, der Stresshyperglykämie (SHG) und der 28-Tage-Mortalität genauer untersuchen zu können, wurde ein zweites klinisches Studienkollektiv evaluiert. Hierbei handelt es sich um 37 Patienten, die alle eine peritoneale Sepsis aufwiesen (s. 3.2.2). Entsprechend ihres klinischen Krankheitsverlaufes auf der Intensivstation konnten hinsichtlich des Auftretens einer Hyperglykämie drei Subgruppen gebildet werden: Patienten ohne SHG, Patienten mit SHG bei bereits bekanntem T2D und Patienten mit echter SHG ohne vorbekannten Diabetes mellitus Typ 1 oder 2. Diese drei Gruppen unterschieden sich einerseits signifikant hinsichtlich des Alters ($p=0,002$), mit den jüngsten Patienten in der Gruppe mit echter SHG, und andererseits hinsichtlich der Prävalenz von T2D ($p<0,001$) und Leberversagen ($p=0,008$) (Tabelle 11). In der Gruppe mit echter SHG wies fast die Hälfte ein Leberversagen auf, während in der Gruppe ohne SHG nur ein Patient ein Leberversagen entwickelte und kein Patient in der Gruppe mit SHG bei bekanntem T2D (Tabelle 11).

Ergebnisse

Tabelle 11: Demographische und klinische Charakterisierung der HMOX-Studiengruppen

Variable	Glykämischer Status auf ITS				p-Wert
	Alle Patienten	Keine SHG	SHG bei T2D	Echte SHG	
n (%männlich)	37(65)	11(64)	11(64)	15(67)	0,982
Alter [a]	63±2	68±3 ^a	70±2 ^a	54±4 ^b	0,002
BMI [kg/m ²]	27,8±1,0	28,0±2,2 ^a	31,2±2,0 ^a	25,2±1,1 ^a	0,064
CRP [mg/l]	142,0±18,8	149,4±39,3 ^a	170,7±37,4 ^a	115,6±95,8 ^a	0,477
Leukozyten [x10 ³ /μl]	12,2±1,2	9,4±1,7 ^a	11,7±1,6 ^a	14,7±2,4 ^a	0,210
Thrombozyten [x10 ³ /μl]	233,6±22,1	270,3±55,4 ^a	209,8±31,0 ^a	224,1±29,7 ^a	0,785
Glukose [mmol/l]	6,8±0,3	6,6±0,3	6,5±0,6	7,2±0,4	0,264
Kreatinin [μmol/l]	176,1±29,5	184,0±70,4 ^a	194,0±32,6 ^a	155,7±48,4 ^a	0,104
Bilirubin [μmol/l]	29,8±6,7	18,0±3,3 ^a	14,4±1,6 ^a	49,7±15,0 ^a	0,097
Quick [%]	65±3	69±4 ^a	60±5 ^a	65±7 ^a	0,457
Diabetes	12/37	0/11	11/11	0/15	<0,001*
Leberversagen	8/37	1/11	0/11	7/15	0,008*
Nierenersatz-therapie	3/37	1/11	1/11	1/15	0,965*
APACHE II	21,0 (18,0-28,0)	20,0 ^a (18,0-25,0)	27,0 ^a (20-33)	21,0 ^a (15,0-26,0)	0,185
SAPS	49,0 (37,0-64,5)	48 ^a (42,0-65,0)	63,0 ^a (48,0-71,0)	45,0 ^a (31,0-54,0)	0,112
Mortalität 28d	10/37	4/11	2/11	4/15	0,628*

Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SEM oder als absolute Zahlen, außer APACHEII und SAPS als Median und Interquartilsbereich. Zum Gruppenvergleich wurde der Kruskal-Wallis-Test und multiple Mann-Whitney-U-Test mit post-hoc Bonferroni-Holm α -Fehlerkorrektur genutzt. Unterschiedliche hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an. * χ^2 -Test

Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob das Vorliegen eines Leberversagens die Chemerinspiegel beeinflusst, wurden diese zwischen Patienten mit und ohne Leberversagen verglichen. Sowohl bei Betrachtung der Chemerinspiegel aller Patienten als auch bei der Subgruppenanalyse der Patienten mit echter SHG konnte kein signifikant unterschiedliches Chemerin bei Patienten mit Leberversagen nachgewiesen werden ($p=0,651$ und $p=0,536$) (Abbildung 32). Beim Vergleich der Chemerinspiegel zwischen den Subgruppen ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p>0,05$) (Abbildung 33). Univariate Korrelationsanalysen des zirkulierenden Chemerins mit verschiedenen erhobenen Parametern sind in Tabelle 12 wiedergegeben und zeigten keine signifikanten Assoziationen auf.

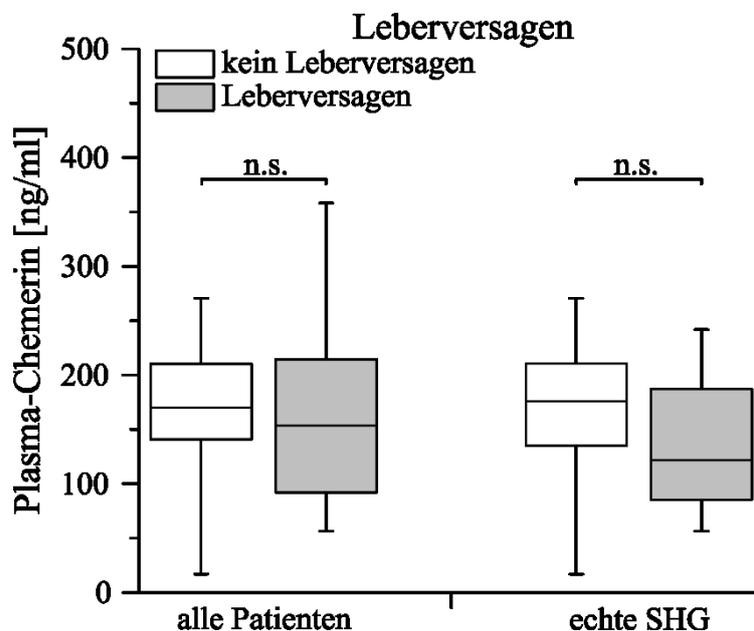


Abbildung 32: Dargestellt der Vergleich der Chemerinspiegel bei Patienten mit und ohne Leberversagen. Sowohl für alle Patienten betrachtet, als auch bei alleiniger Untersuchung der Patienten mit echter SHG, konnte kein signifikant verändertes Chemerin bei Leberversagen nachgewiesen werden ($p=0,651$ und $p=0,536$). n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

Ergebnisse

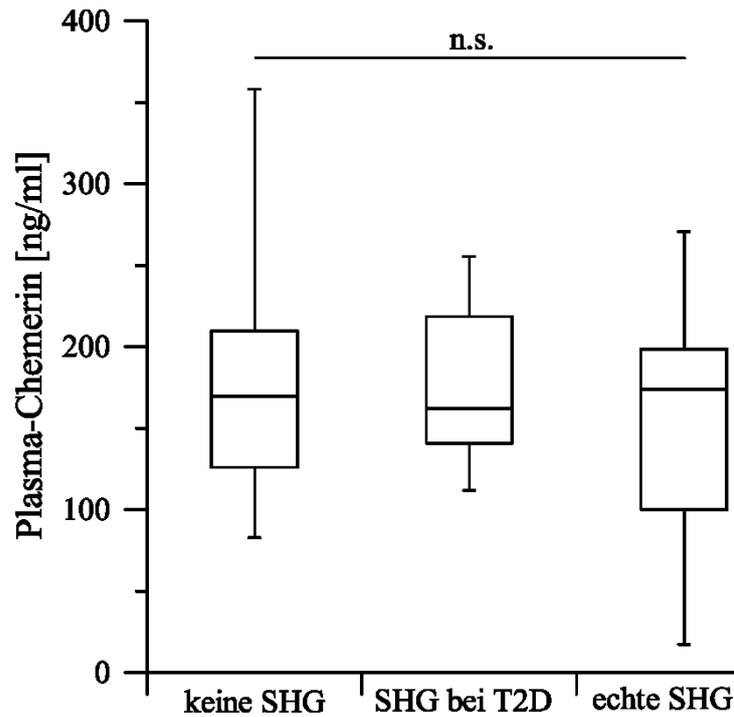


Abbildung 33: Dargestellt sind die Chemerinspiegel in den einzelnen Subgruppen des HMOX-Studienkollektivs. Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied der Chemerinspiegel nachgewiesen werden ($p=0,512$). n.s. = nicht signifikant; Einfaktorielle ANOVA

Tabelle 12: Univariate Korrelationsanalysen zwischen zirkulierendem Chemerin und anthropometrischen, klinischen sowie laborchemischen Patientendaten in der Validierungskohorte.

	r	p
Alter	0,072	0,681
BMI	0,247	0,158
CRP	0,127	0,455
Leukozyten	-0,012	0,945
Thrombozyten	0,056	0,744
Glukose	0,253	0,131
GFR	-0,255	0,133
Harnstoff	0,299	0,073
Bilirubin	-0,080	0,639
Quick	0,021	0,900

Zudem sollte noch überprüft werden, ob sich die positive Assoziation der zirkulierenden Chemerinspiegel mit den Glukosespiegeln in dieser zweiten unabhängigen Studiengruppe reproduzieren lassen. Bei der gemeinsamen Betrachtung aller Sepsispatienten dieser Gruppe war zunächst keine Korrelation erkennbar ($p>0,05$; Tabelle 12). Nach Ausschluss von Patienten mit SHG zeigte sich jedoch eine signifikante starke positive Korrelation mit

Ergebnisse

der Vollblutglukose am Tag 1 ($p < 0,05$; Abbildung 34A), die bei Patienten mit SHG nicht nachweisbar war ($p > 0,05$; Abbildung 34B). Es bestand keine Assoziation der Chemerinkonzentration mit der Vollblutglukosekonzentration am Tag 5 nach Ausschluss von Patienten mit SHG ($p > 0,05$; Abbildung 34C), jedoch eine starke negative Korrelation bei Patienten mit SHG ($p < 0,05$; Abbildung 34D).

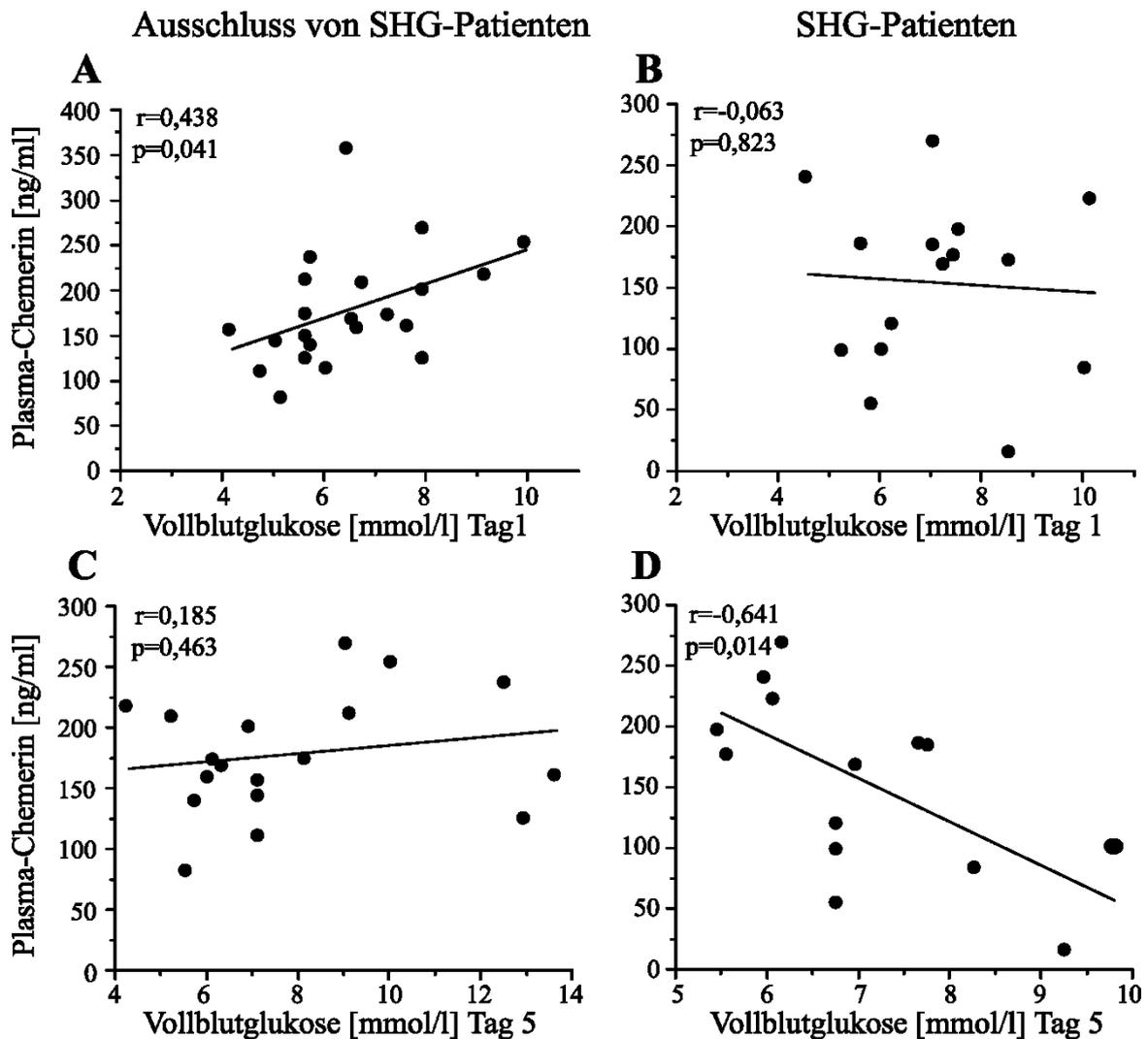


Abbildung 34: Dargestellt ist das Plasma-Chemerin in Abhängigkeit von der Vollblutglukosekonzentration am Tag 1 bei Patienten der HMOX-Studiengruppe nach Ausschluss von Patienten mit SHG (A) und bei Patienten mit SHG (B) und am Tag 5 bei Patienten der HMOX-Studiengruppe nach Ausschluss von Patienten mit SHG (C) und bei Patienten mit SHG (D) (Pearson-Korrelation).

Ergebnisse

Nach Ausschluss der SHG-Patienten ließ sich Chemerin, neben Serum-Harnstoff und Laktat, als signifikante unabhängige Variable in einem multivariaten linearen Regressionsmodell mit der Vollblutglukose als abhängiger Variable identifizieren ($p < 0,05$). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abbildung 34A war wieder ein starker positiver Zusammenhang erkennbar.

Tabelle 13: Multivariate lineare Regressionsanalyse mit der Vollblutglukose als abhängiger Variable

Model Sepsis D Abhängige Variable: Vollblutglukose Tag 1	
β -Koeffizient (p-Wert)	
Unabhängige Variablen	R=0,800; R ² =0.640; adj. R ² =0,431, p=0,043
Geschlecht	-0,023 (0,920)
Alter	0,118 (0,549)
Log BMI	-0,506 (0,096)
Plasma-Chemerin	0,556 (0,013)
Harnstoff	-0,773 (0,004)
Log Bilirubin	0,104 (0,618)
Log Laktat	-0,449 (0,048)

4.12. Prognostischer Wert des Chemerins in Abhängigkeit vom glykämischen Status

Bei der gemeinsamen Betrachtung aller untersuchten HMOX-Studienpatienten war auch kein signifikanter Unterschied der Chemerinspiegel zwischen überlebenden und nicht-überlebenden Patienten nachweisbar ($p > 0,05$) (Abbildung 35). Bei getrennter Betrachtung der Studiengruppen bestand jedoch in zwei Subgruppen ein entsprechender Unterschied. In der Gruppe mit echter SHG wiesen die überlebenden Patienten signifikant höhere Chemerinspiegel auf als die Patienten, die innerhalb der ersten 28 Tage verstorben waren ($p < 0,05$) (Abbildung 36). Für die Patienten, die während des intensivmedizinischen Verlaufes keine Stresshyperglykämie entwickelten, konnte eine inverse, jedoch nicht-signifikante Assoziation, mit niedrigeren Werten bei überlebenden Patienten, nachgewiesen werden ($p = 0,089$) (Abbildung 36). Bei Patienten mit vorbekanntem T2D war solch eine Assoziation nicht sichtbar.

Ergebnisse

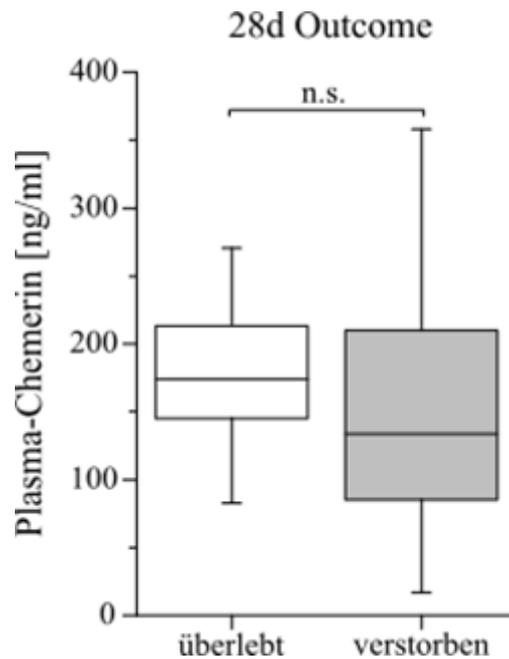


Abbildung 35: Dargestellt ist der Vergleich der Chemerinspiegel zwischen Patienten, die die ersten 28 Tage nach Studieneinschluss überlebt haben (n=27) oder in dieser Zeit verstorben sind (n=10). Es konnte bei Betrachtung aller Patienten kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (p=0,216). n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

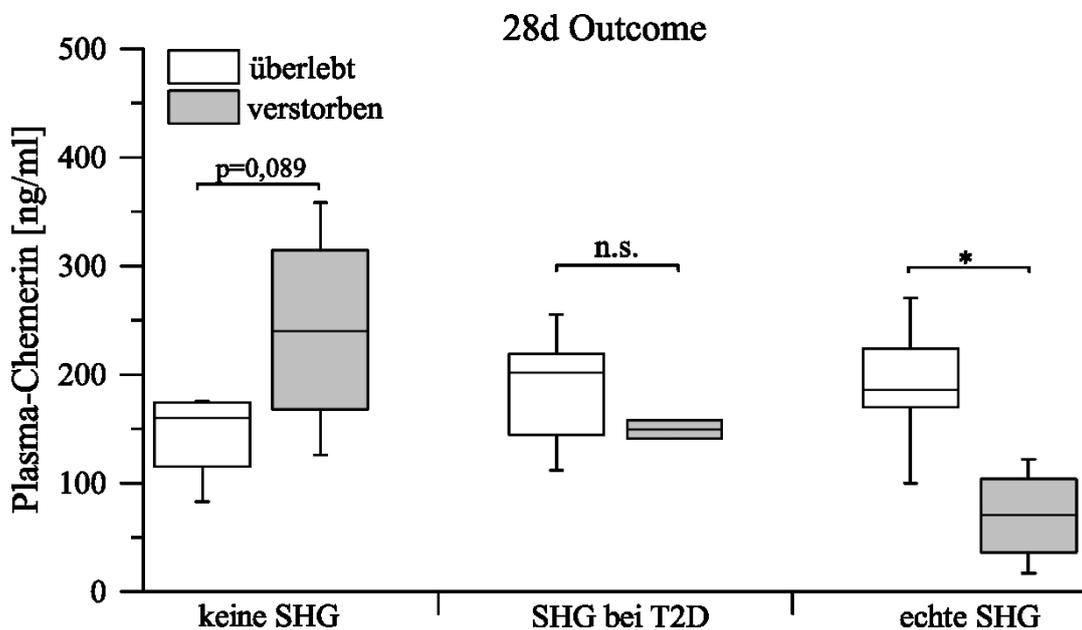


Abbildung 36: Dargestellt ist die Subgruppenanalyse des Vergleichs der Chemerinspiegel bei nach 28 Tagen überlebenden und verstorbenen Patienten. Überlebende Patienten in der Gruppe mit echter SHG wiesen signifikant höhere Chemerinspiegel auf, als die Patienten, die innerhalb von 28 Tagen verstorben waren (p=0,006). Bei den Patienten ohne SHG konnte im Trend eine umgekehrte Assoziation nachgewiesen werden, mit niedrigeren Chemerinspiegeln bei überlebenden Patienten (p=0,089). Für die Patienten mit SHG bei T2D konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (p=0,436). *p<0,05; n.s. = nicht signifikant; Mann-Whitney-U-Test

Ergebnisse

Anhand der vorliegenden Daten wurden anschließend, unter Ausschluss der Patienten mit vorbestehendem T2D, nachträglich zwei Risikogruppen definiert: Zum einen Patienten ohne Stresshyperglykämie mit einem Chemerin > 200 ng/ml und zum anderen Patienten mit echter Stresshyperglykämie und einem Chemerin < 100 ng/ml. Bei Auftragung gegen den 28-Tage-Überlebensstatus ergab sich die in Tabelle 14 dargestellte Kontingenztafel. Die Eingruppierung in eine Risikogruppe hatte für die Vorhersage des Versterbens eine Sensitivität von 75% und eine Spezifität von 89,5%. Der positive prädiktive Wert hierfür erreichte in der untersuchten Population 85,7%, der negative prädiktive Wert 94,4%. Die Patienten in den Risikogruppen wiesen somit eine 8,1-fach erhöhte Inzidenz des Versterbens innerhalb von 28 Tagen auf (95% Konfidenzintervall 2,1 - 31,5; $p < 0,05$).

Tabelle 14: Kontingenztafel für den Überlebensstatus der Studienpatienten bei positiven Risikofaktoren (i.e. Chemerin > 200 ng/ml ohne SHG bzw. echte SHG und Chemerin < 100 ng/ml)
28d-Überlebensstatus

		28d-Überlebensstatus			
		Überlebt	Verstorben	Σ	
Risikofaktoren	Positiv	1	6	7	
	Negativ	17	2	19	
		Σ	18	8	26

5. Diskussion

In dieser retrospektiven Querschnittsstudie konnten erhöhte Spiegel des zirkulierenden Chemerins bei Sepsispatienten nachgewiesen werden, während die Chemerin mRNA-Expression im viszeralen Fettgewebe bei diesen Patienten vermindert war. Zusätzlich bestanden starke unabhängige Assoziationen des Chemerins mit dem Glukosemetabolismus sowie inkonsistente Assoziationen mit Parametern der systemischen Inflammation, Fettgewebsinflammation und der Prognose. Die wesentlichen Ergebnisse der Humanstudien konnten im Mausmodell des Typ 2 Diabetes und der peritonealen Sepsis reproduziert werden.

5.1 Studiendesign

Wichtiges Merkmal dieser Arbeit ist die detaillierte Charakterisierung der Studienpatienten und die Verfügbarkeit von Fettgewebeproben zur Genexpressionsanalyse bei Sepsispatienten in Verbindung mit Untersuchungen am Tiermodell. Um viszerale Fettgewebeproben zu erhalten standen in der ersten Patientenkohorte nur Studienpatienten zur Verfügung, die eine Indikation zur Laparotomie besaßen, wodurch die Anzahl der Patienten in dieser Kohorte begrenzt ist. Die Studienpatienten sind repräsentativ für allgemein- und viszeralchirurgische Patienten, die sich einer offenen Abdominalchirurgie unterziehen, einschließlich einer hohen Prävalenz maligner Erkrankungen. Wie gezeigt, waren die Studiengruppen in dieser Hinsicht vergleichbar, weshalb eine Verallgemeinerbarkeit der Daten dieser Studie auf eine breite Patientengruppe möglich erscheint. Außerdem waren Patienten mit und ohne maligne Grunderkrankung in Bezug auf das Serumchemerin nicht signifikant unterschiedlich, was einen Einfluss der Krebsdiagnose in dieser Studie unwahrscheinlich macht. Während die OP-Indikationen zwischen Kontroll- und T2D-Gruppe vergleichbar waren, unterschieden sich diese naturgemäß gänzlich von den Indikationen in der Sepsisgruppe. Da nur Sepsispatienten mit peritonealer Sepsis untersucht wurden, können sämtliche Ergebnisse nicht ohne weiteres auf andere Entitäten dieser Erkrankung übertragen werden.

Der Einschluss von Diabetespatienten in die Untersuchungen hat es erlaubt Patienten mit akut-hochgradiger Inflammation und akuter Insulinresistenz, also Sepsispatienten, mit solchen zu vergleichen, die eine chronisch-niedriggradige Inflammation und chronische Insulinresistenz aufwiesen, hier Typ 2 Diabetes-Patienten. Dies wurde abgebildet durch ein

hohes CRP, ein niedriges HbA_{1c} und einen hohen HOMA-IR bei den Sepsispatienten und ein niedrigeres CRP, ein hohes HbA_{1c} und einen hohen HOMA-IR bei den Diabetespatienten. Alter und Adipositas stellen Risikofaktoren sowohl für die Entstehung einer Sepsis (Mayr et al. 2014), als auch für die Entstehung eines Typ 2 Diabetes dar (American Diabetes Association 2010). Dies erklärt das höhere Alter und den höheren BMI in diesen beiden Gruppen im Vergleich zu den Kontrollpatienten.

5.2 Erhöhtes zirkulierendes Chemerin bei peritonealer Sepsis

Die Daten zu erhöhtem zirkulierendem Chemerin bei Sepsispatienten ergänzen die Literatur, in der erhöhte Chemerinspiegel bei Erkrankungen mit niedriggradiger oder hochgradiger Inflammation ohne Sepsis beschrieben wurden. Dies ist gezeigt für das metabolische Syndrom (Bozaoglu et al. 2007) und den Typ 2 Diabetes mellitus (Weigert et al. 2010b), chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Weigert et al. 2010a), die chronische Pankreatitis (Adrych et al. 2012) und die rheumatoide Arthritis (Ha et al. 2014). Es handelt sich hier um die erste Studie, die über erhöhte zirkulierende Chemerinspiegel in der Wirtsreaktion bei Sepsis berichtet. Diese Daten werden durch die Ergebnisse aus dem Mausmodell bestätigt. Hier konnten wir einen schrittweisen Anstieg der Chemerinspiegel, zunehmend mit metabolischer Erkrankung, induziert durch HFD, hochgradiger Entzündung, induziert durch PCI und der Kombination beider Zustände beobachten. Da sowohl die diabetische Stoffwechsellage als auch die Inflammation als mit zirkulierenden Chemerinspiegeln assoziiert beschrieben sind (Becker et al. 2010, Bondue et al. 2011a, Bondue et al. 2011b, Ernst et al. 2010, Luangsay et al. 2009, Sell et al. 2009, Takahashi et al. 2008), interpretieren wir die Ergebnisse als eine Art dosisabhängigen Effekt auf die Chemerinspiegel. Die zweite Studiengruppe (HMOX) war nicht für Vergleiche von Sepsispatienten mit Kontrollen vorgesehen, sodass hier eine entsprechende geeignete Kontrollgruppe fehlt und eine Bestätigung der Ergebnisse des erhöhten Chemerin der INSIGHT-Kohorte nicht möglich ist.

Da erhöhte Chemerinspiegel bei Patienten mit T2D in der Literatur beschrieben sind (El-Mesallamy et al. 2011, Tönjes et al. 2010), beabsichtigten wir T2D Patienten als Positivkontrollen einzuschließen. Diese Ergebnisse konnten wir jedoch nicht reproduzieren; die Chemerinspiegel waren vergleichbar zwischen T2D- und Kontrollpatienten. Es wurden bereits wesentlich niedrigere zirkulierende Chemerinspiegel

Diskussion

bei gesunden Probanden beschrieben (Chamberland et al. 2013) als in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurden. Da es sich bei unserer Kontrollgruppe nicht um junge und gesunde Probanden handelte, sondern um allgemein- und viszeralchirurgische Patienten mit entsprechendem Alter und Komorbiditäten, ist der fehlende Unterschied am ehesten hierauf zurückzuführen. Die weiteren Nebenerkrankungen in der Kontrollgruppe kommen durchaus als weitere Einflussfaktoren in Frage, die einen möglichen Unterschied verwischt haben könnten. Außerdem standen viele T2D-Patienten vor Studieneinschluss bereits unter Langzeitbehandlung mit oralen Antidiabetika. Auch wenn diese mindestens 24 Stunden vor Probenentnahme abgesetzt wurden, ist ein Einfluss auf die Studienergebnisse wahrscheinlich. Insbesondere für Biguanide und Thiazolidindione ist ein Chemerin-senkender Effekt beschrieben (Esteghamati et al. 2014)

Die Hersteller der verwendeten Chemerin-ELISA machten keine Aussage über die Spezifität der Antikörper für verschiedene Chemerinisoforamen. Deshalb muss angenommen werden, dass diese nicht zwischen Prochemerin und aktiviertem Chemerin unterscheiden. Eine Aussage darüber, inwieweit diese erhöhten Chemerinspiegel bei Sepsis einer erhöhten Chemerinaktivität entsprechen, kann daher nicht getroffen werden. Chemerin wird durch Serin- und Cysteinproteasen von neutrophilen Granulozyten, der Gerinnungskaskade und des Fibrinolysesystems aktiviert (Mattern et al. 2014). Da es als Teil der Wirtsreaktion in der Sepsis zu einer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (Sriskandan und Altmann 2008) und der Gerinnungskaskade (Semeraro et al. 2012) kommt, ist es wahrscheinlich, dass in einer Nebenreaktion auch Chemerin proteolytisch modifiziert wird..

Für Patienten mit Sepsis sind Geschlechtsunterschiede beschrieben, wobei einige Studien eine erhöhte Krankheitsschwere und Mortalität bei männlichen Patienten zeigen (Angele et al. 2014). Zusätzlich sind Geschlechtsdimorphismen für Chemerin beschrieben (Alfadda et al. 2012, Lee et al. 2013, Takahashi et al. 2013), die aber in den Ergebnissen dieser Studie *prima vista* wohl aufgrund der beschränkten Gruppengröße nicht konsistent sind. Daher könnte der Unterschied der zirkulierenden Chemerinspiegeln zwischen männlichen und weiblichen Sepsispatienten auch in den Unterschieden bezüglich der Krankheitsschwere begründet sein. Dies ist insbesondere zu überlegen, da dieser Unterschied zwischen den Geschlechtern nach Adjustierung für CRP oder Nüchterninsulin nicht mehr nachweisbar war. Die These, dass es sich hierbei nicht um einen echten Geschlechtsunterschied handelt, wird dadurch gestützt, dass im zweiten, größeren Studienkollektiv von Sepsispatienten

ebenfalls kein Geschlechtsunterschied hinsichtlich des zirkulierenden Chemerins nachweisbar war.

5.3 Der Bildungsort von Chemerin in der Sepsis bleibt unbekannt

Die mRNA-Expression von Chemerin wurde in dieser Arbeit im VAT untersucht, da dieses als ein Hauptbildungsort für Chemerin beschrieben ist (Bozaoglu et al. 2007). Überraschenderweise war die Chemerin-mRNA-Expression im VAT bei Sepsis vermindert, wofür verschiedene Erklärungen in Frage kämen: Die Chemerin mRNA wird positiv durch PPAR γ reguliert (Zabel et al. 2014), welches seinerseits durch Inflammation in Adipozyten herunterreguliert wird (Zingarelli und Cook 2005). Gleichermaßen steigert Insulin die Chemerin-mRNA-Expression in Adipozyten (Zabel et al. 2014), wobei bei Sepsis der Insulineffekt infolge Insulinresistenz herabgesetzt oder sogar aufgehoben sein könnte. Zwar impliziert die verminderte Chemerin mRNA Expression im viszeralen Fettgewebe, dass dieses nicht an der Bildung von Chemerin in diesem Kontext beteiligt ist. Jedoch ist die Messung der mRNA Expression allein nicht ausreichend, um auf die Chemerinproduktion zu schließen. Dies wird insbesondere deutlich, wenn Beobachtungen, dass in Zellkulturexperimenten die Chemerinsekretion erhöht sein kann, ohne dass es zu Veränderungen der mRNA Spiegel kommt (Parlee et al. 2010) mit in Betracht gezogen werden. Zudem muss bedacht werden, dass Fettgewebe nicht nur aus Adipozyten besteht, sondern eine Reihe weiterer Zellarten besitzt. Dies beinhaltet insbesondere Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten (Wensveen et al. 2015). Bei Durchführung von RT-qPCR in Gewebehomogenaten, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, könnten daher Veränderungen der mRNA-Expression in einem Zelltyp durch gegensätzliche Veränderungen in einem anderen Zelltyp verschleiert werden. Dies trifft insbesondere für Endothelzellen zu, die in der Lage wären, Chemerin direkt in die Zirkulation zu sezernieren. Eine Steigerung der Chemerin mRNA infolge endothelialer Aktivierung ist beschrieben (Gonzalvo-Feo et al. 2014) und könnte durch verminderte mRNA Expression in anderen Zellen, beispielsweise Adipozyten, verschleiert sein.

Limitationen in der vorliegenden Arbeit sind diesbezüglich, dass nur Patienten und Mäuse mit peritonealer Sepsis untersucht wurden und dass nur Daten für das viszerale Fettgewebe vorliegen. Die peritoneale Infektion könnte die Chemerinexpression im VAT anderweitig beeinflussen als bei einer Mitreaktion des Fettgewebes bei einem anderen Infektfokus.

Diskussion

Zudem ist eine Fettgewebsdepot-spezifische Expression des Chemerins beschrieben, sodass die Untersuchung von subkutanem oder mesenterialem Fettgewebe zu anderen Ergebnissen hätte führen können (Alfadda et al. 2012). Eine wesentliche Beteiligung des viszeralen Fettgewebes liegt jedoch nahe, wenn man die in dieser Arbeit gefundene Assoziation des Serumchemerins mit dem Grad der Makrophageninfiltration in das VAT betrachtet. Ein sicherer Nachweis der Chemerin-Synthese im VAT ist nur möglich durch Blutentnahmen und vergleichende Messung in den efferenten und afferenten versorgenden Blutgefäßen. Dies würde jedoch ein sehr komplexes Studiendesign erforderlich machen und konnte, auch aus ethischen Erwägungen heraus, in dieser Studie nicht durchgeführt werden.

Frühere Arbeiten weisen auf die Leber als einen wesentlichen Bildungsort für Chemerin hin, da dieses in der Leber hoch exprimiert wird (Chamberland et al. 2013, Krautbauer et al. 2013) und im hepatovenösen im Vergleich zum portalvenösen Serum leicht erhöht ist (Weigert et al. 2010b). Die letztgenannte Untersuchung wurde jedoch an Patienten mit Leberzirrhose durchgeführt, sodass man hieraus nur eingeschränkt auf Sepsispatienten oder gesunde Probanden rückschließen kann. Gegen eine wesentliche Beteiligung der Leber an der Erhöhung des zirkulierenden Chemerins in der Sepsis spricht zudem, dass primäre murine Hepatozyten auf die Behandlung mit TNF α *in vitro* nicht mit einer Steigerung der Chemerinsynthese reagieren (Parlee et al. 2010) und die Behandlung mit IL-6 ebenfalls nicht zu einer Steigerung der Chemerinexpression führt (Döcke et al. 2013). In der vorliegenden tierexperimentellen Studie war in der Leber ebenfalls keine erhöhte Chemerinexpression nach Sepsisinduktion nachweisbar und die Chemerinexpression in der Leber war vergleichbar mit der Chemerinexpression im VAT. Im Zellkulturversuch an humanen HepaRG-Zellen konnte jedoch durch Inkubation mit Zytokinmix eine biologisch relevante und statistisch signifikante Steigerung der Chemerinexpression erreicht werden. Dieser Effekt blieb aber bei Stimulation mit humanem septischem Serum aus, was auf weitere Serumfaktoren in der Sepsis rückschließen lässt, die eine Herabregulation der Chemerinexpression bewirken. Dass die Leber in der Sepsis kein Hauptbildungsort für Chemerin ist, wird durch die Daten zum Chemerin bei Patienten mit Leberversagen in der HMOX-Studiengruppe gestützt. Hier waren keine signifikant unterschiedlichen Chemerinspiegel im Vergleich zu Patienten ohne Leberversagen nachzuweisen. Wäre die Leber ein Hauptbildungsort des Chemerins in der Sepsis, so wäre zu erwarten, dass die zirkulierenden Chemerinspiegel infolge des Versagens dieses Organs vermindert sind, wie

Diskussion

es für Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose in der Literatur bereits gezeigt werden konnte (Eisinger et al. 2015).

Des Weiteren ist denkbar, dass die erhöhten Chemerinspiegel nicht durch eine gesteigerte Synthese, sondern durch einen verminderten Abbau oder eine verminderte Ausscheidung zustande gekommen sind, wobei die Mechanismen des Chemerinabbaus bisher weitgehend unverstanden sind. Die untersuchten Sepsis-Patienten wiesen eine deutlich verminderte Nierenfunktion mit erhöhten Kreatininspiegeln auf. Über eine negative Korrelation der Chemerinspiegel mit der glomerulären Filtrationsrate, unabhängig von der Chemerinexpression im Fettgewebe, wurde in der Literatur bereits berichtet (Blaszak et al. 2015), sodass die Niereninsuffizienz der untersuchten Patienten zum beobachteten Effekt beigetragen haben könnte. Allerdings wurden in der Arbeit von Blaszak et al. (2015) nur Expressionsdaten aus dem subkutanen Fettgewebe herangezogen. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten beider Studienkollektive bestand jedoch keine Korrelation des Chemerins mit der GFR.

Zudem sind Veränderungen der Chemerinrezeptorexpression mit dem zirkulierenden Chemerin assoziiert. Bei einem knockout von *Cmklr1* oder *Ccrl2* kommt es *in vivo* in der Maus zu erhöhten Chemerinspiegeln (Gruben et al. 2014, Monnier et al. 2012). Während die Expression von *Cmklr1* im VAT im Mausmodell herabgesetzt war, war dies in der murinen Leber und im humanen VAT nicht der Fall. Somit könnte die veränderte *Cmklr1* Expression, zumindest im Mausmodell, zur Steigerung der Chemerinspiegel beigetragen haben. Die *Ccrl2* mRNA war bei Sepsis in allen untersuchten Geweben, murin wie human, signifikant gesteigert, sodass hieraus eher eine Verminderung des zirkulierenden Chemerins zu erwarten wäre. Obwohl das Rezeptorprotein GPR1 Chemerin internalisiert (Mattern et al. 2014), führt der knockout nicht zu veränderten Chemerinspiegeln (Rourke et al. 2014). In den untersuchten Gewebeproben konnte zudem keine signifikante Regulation von *GPR1* auf mRNA-Ebene beobachtet werden, womit ist Beteiligung des GPR1 an der Entstehung der erhöhten Chemerinspiegel eher unwahrscheinlich ist. Daten zur Proteinmenge der einzelnen Rezeptoren wären jedoch notwendig, um nähere Aussagen treffen zu können.

5.4 Chemerin ist assoziiert mit systemischer Inflammation

Die Wirtsreaktion in der Sepsis ist durch hochgradige Inflammation und einen gestörten Glukosemetabolismus mit Insulinresistenz charakterisiert (Marik und Raghavan 2004), wobei beide in dieser Arbeit mit den zirkulierenden Chemerinspiegeln assoziiert waren. Die Daten zur Assoziation von Chemerin mit Parametern der Inflammation weisen in zwei verschiedene Richtungen. Zum ersten war das zirkulierende Chemerin positiv mit den zirkulierenden Leukozytenzahlen korreliert. Dies könnte durch die leukozytenattrahierende Funktion des Chemerins für antigenpräsentierende Zellen erklärt werden (Wittamer et al. 2003). Jedoch scheint dies vor allem der Attrahierung von Leukozyten in geschädigtes oder entzündetes Gewebe zu dienen, was eher eine Reduktion zirkulierender Leukozyten bedeuten würde. Bisher gibt es keine Studie, die eine Korrelation von Chemerin mit der zirkulierenden Leukozytenzahl untersucht hat. Zusätzlich zur Attrahierung CMKLR1-positiver Zellen reduziert Chemerin die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in zwei verschiedenen murinen Lungeninflammationsmodellen (Bondue et al. 2011b, Luangsay et al. 2009). Ein mögliche Erklärung für die vorliegende Beobachtung könnte daher sein, dass erhöhte Chemerinspiegel in der Wirtsreaktion der Sepsis die Einwanderung aktivierter neutrophiler Granulozyten vermindert und damit diese Zellen im peripheren Blut zurückhält, was schlussendlich eine Erhöhung der Leukozytenzahl zur Folge hätte. Leider sind zu den untersuchten Patienten keine Informationen über das Differentialblutbild verfügbar gewesen, wodurch eine Assoziationsanalyse des Chemerins mit den Leukozytensubpopulationen nicht möglich war. In der HMOX-Studiengruppe war keine Assoziation von Chemerin mit der Leukozytenzahl festzustellen, sodass Ergebnisse weiterer diesbezüglicher Untersuchungen bei Sepsis in der Zukunft abzuwarten sind.

Überraschenderweise war Chemerin bei den Sepsispatienten der INSIGHT-Studiengruppe im Trend negativ mit einem wesentlichen klinischen Parameter der systemischen Inflammation, dem CRP, assoziiert. In der zweiten Studiengruppe war ein solcher Zusammenhang jedoch nicht reproduzierbar, sodass eine tatsächliche Assoziation des Chemerins mit dem CRP bei Sepsis fraglich bleibt. Die meisten veröffentlichten Studien weisen auf eine positive Assoziation mit Inflammation hin. So konnte in *in vitro*-Studien gezeigt werden, dass die Chemerinexpression in verschiedenen Zelllinien durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (Kralisch et al. 2009) oder Tumornekrosefaktor α (TNF α) (Parlee et al. 2010) stimuliert werden kann. Außerdem führt eine Blockade der Signaltransduktion von Interleukin-6 (Makrilakis et al. 2014) oder

TNF α (Herenius et al. 2013) *in vivo* zu reduzierten zirkulierenden Chemerinspiegeln im Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis. Allerdings zeigt der TNF α -Effekt auf die Chemerin-Freisetzung in 3T3-L1-Adipozyten einen Glocken-förmigen Verlauf (Parlee et al. 2010), wobei nicht bekannt ist, ob außerordentlich hohe Zytokinspiegel sogar die Chemerinfreisetzung unter das Ausgangsniveau herabsetzen könnten. Weitere aktuelle Berichte zeigen, dass Chemerin auch über klare antiinflammatorische Eigenschaften verfügt (Bondue et al. 2011b, Cash et al. 2008, Luangsay et al. 2009). Das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Chemerineffekten ist aber bisher noch nicht ausreichend bekannt, insbesondere nicht für das Krankheitsbild Sepsis.

Fügt man die Ergebnisse für die Sepsispatienten zusammen mit der positiven Assoziation des Chemerins mit dem CRP in den T2D Patienten, so scheint die Regulation von Chemerin verschieden zu sein, je nachdem, ob man die niedriggradige oder die hochgradige Inflammation betrachtet. Wodurch dieser Unterschied hervorgerufen wird kann mit den vorliegenden Daten und anhand der Literatur lediglich spekuliert werden. Eine Möglichkeit wäre, dass ein negativer Rückkopplungsmechanismus besteht, wodurch Chemerin seine eigene Synthese bei hoher Konzentration inhibiert. Ein CMKLR1-Knockout führt im Mausmodell jedoch nicht zur Steigerung der Chemerinspiegel (Issa et al. 2012), was diese Erklärung unwahrscheinlich erscheinen lässt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Chemerinproduktion durch den Effekt hochkonzentrierter proinflammatorischer Mediatoren supprimiert wird. Dieser Erklärungsansatz wird, zumindest in Teilen, durch *in vitro* Daten in der Literatur gestützt (Parlee et al. 2010). Weiterhin ist denkbar, dass bei den Sepsis-Patienten mit sehr hohen CRP-Spiegeln auch vermehrt antiinflammatorische Mediatoren vorliegen, im Sinne eines Überwiegens immunsuppressiver Mediatoren beim SIRS (Hotchkiss et al. 2013). Jedoch ist in der Literatur die Auswirkung antiinflammatorischer Mediatoren auf die Chemerin-Synthese und -Freisetzung bisher nicht beschrieben.

5.5 Chemerin ist assoziiert mit dysreguliertem Glukosemetabolismus

Die vorliegenden Daten dieser Arbeit zeigen auf, dass Chemerin bei Patienten mit Sepsis mit Parametern der gestörten Glukosehomöostase und Insulinresistenz assoziiert ist. Aus der Literatur sind Assoziationen mit dem BMI (Bozaoglu et al. 2007), mit Hyperinsulinämie (Tan et al. 2009), Insulinresistenz (Fatima et al. 2013, Lee et al. 2013)

Diskussion

und Dyslipidämie (Bozaoglu et al. 2010) bei Erkrankungen, welche mit dem metabolischen Syndrom assoziiert sind, bekannt. Chemerin induziert Insulinresistenz in quergestreiften Muskelzellen (Becker et al. 2010, Sell et al. 2009) und erhöht die Insulinsensitivität in Adipozyten (Takahashi et al. 2008) *in vitro*. Die systemische Gabe von Chemerin (Ernst et al. 2010) oder die adenovirale Überexpression von Chemerin (Becker et al. 2010) *in vivo* führen im Mausmodell zu Insulinresistenz und Glukoseintoleranz. Daher ist es wahrscheinlich, dass erhöhte Chemerinspiegel in der Wirtsreaktion der Sepsis tatsächlich zur gestörten Glukosehomöostase und Insulinresistenz beitragen. Diese Daten konnten, zumindest bei Sepsispatienten ohne neue Stresshyperglykämie, reproduziert werden und auch im Mausmodell bestand eine Assoziation hoher Chemerinspiegel mit hoher Plasmaglukose. Es scheint sich somit um eine sehr starke und reliable Assoziation des zirkulierenden Chemerins mit der Blutglukose bei Sepsis zu handeln, insbesondere unter Berücksichtigung dessen, dass in beiden klinischen Studienkollektiven eine unabhängige Korrelation in multivariaten Regressionsmodellen bestand. Bei den Patienten der HMOX-Studiengruppe konnten keine unterschiedlichen Chemerinspiegel zwischen den einzelnen Glykämie-Subgruppen gefunden werden, was nur auf den ersten Blick einen Widerspruch darstellt. Die Einteilung in die Glykämie-Subgruppen erfolgte nicht anhand der Blutzuckerspiegel zum Zeitpunkt der Blutentnahme, sondern anhand des Verlaufs des Blutzuckerprofils während des gesamten intensivmedizinischen Aufenthaltes, entsprechend vorgegebener Kriterien (American Diabetes Association 2010, Dungan et al. 2009). Unter Berücksichtigung der starken Assoziation mit der Blutglukose dürften zum Zeitpunkt der hyperglykämischen Entgleisung durchaus Gruppenunterschiede nachzuweisen sein, sodass die Blutentnahme zum Zeitpunkt dieser Entgleisung erfolgen müsste. Da jedoch keine sequentiellen Blutproben zur Untersuchung des Chemerins vorlagen, ließ sich dieser Punkt in der vorliegenden Arbeit nicht bearbeiten. Zieht man außerdem mit in Betracht, dass sich die Assoziation mit dem 28-Tage-Überlebensstatus signifikant unterschied, je nachdem welche dieser Glykämie-Subgruppen betrachtet wurde, ist eine funktionelle Beteiligung des Chemerins an der Regulation der Glukosehomöostase bei Sepsis sehr wahrscheinlich. Dies wird insbesondere deutlich, da bei den Patienten mit neuer SHG eine starke negative Korrelation mit der Blutglukose am Tag 5 nach Studieneinschluss bestand. Dies ist die einzige Gruppe, bei der in dieser Arbeit eine negative Assoziation mit der Blutglukose nachgewiesen werden konnte, sodass eine mögliche differentielle Regulation von Chemerin und Glukose in dieser Gruppe denkbar wäre. Um mögliche Mechanismen dieser

Regulation zu finden, werden künftig Untersuchungen an verschiedenen Inflammationsmodellen in der Zellkultur und im Tierversuch notwendig sein, bei denen in das Chemerin-System eingegriffen wird.

Im Gegensatz zu den Sepsispatienten war bei T2D keine Assoziation mit Insulinresistenz (HOMA-IR) oder Nüchtern glukose nachweisbar. Wie bereits diskutiert, stand ein Großteil der T2D-Patienten im Vorfeld der Studie unter oraler antidiabetischer Therapie, was die Aussagekraft der Daten diesbezüglich deutlich einschränkt (Esteghamati et al. 2014). Allerdings wiesen T2D-Patienten mit einem höheren BMI auch höhere Chemerinspiegel auf. Dieser Zusammenhang mit dem BMI lässt sich auch in der Literatur finden (Bozaoglu et al. 2007, Bozaoglu et al. 2009), wobei beschrieben wird, dass er auch wesentlich durch Inflammation vermittelt sein könnte (Weigert et al. 2010b).

5.6 Chemerin ist assoziiert mit Fettgewebsinflammation

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Chemerinspiegel mit der Makrophagenzahl, als Parameter der Fettgewebsinflammation, bei Sepsispatienten korreliert ist. Diese Assoziation wurde jedoch erst sichtbar, nachdem Patienten mit einem koronaren Makrophagenverteilungsmuster im VAT von der Analyse ausgeschlossen wurden. Als Grund hierfür kommt zum einen infrage, dass der Chemerinspiegel vom Verteilungsmuster der Makrophagen im Fettgewebe als Ausdruck einer unterschiedlichen zugrunde liegenden Pathophysiologie abhängig sein könnte. Koronar verteilte Makrophagen (CLS) weisen beim Adipositaspatienten eher einen proinflammatorischen M1-Phänotyp auf, wobei es sich bei diffus im Gewebe verteilten Makrophagen eher um den M2-Phänotyp handelt, dem eine antiinflammatorische Funktion zugeschrieben wird (Morris et al. 2011). Zum anderen könnte es sich auch um einen Probensammelungsartefakt handeln, sodass der betrachtete histologische Ausschnitt nicht der durchschnittlichen Situation im Gewebe entspricht. Zur Validierung der Ergebnisse im Fettgewebe wäre daher eine weitere Untersuchung an einem größeren Patientenkollektiv nötig. Aufgrund des komplexen Studiendesigns und den ethischen Anforderungen eines solchen Vorhabens wird sich die Generierung größerer Fettgewebs-Probenbanken bei Sepsispatienten jedoch voraussichtlich schwierig gestalten.

Auch für die Sepsis ist bereits eine Makrophageninfiltration in das Fettgewebe beschrieben (Langouche et al. 2010), wobei hier scheinbar vor allem eine antiinflammatorische M2-

Differenzierung vorliegt (Langouche et al. 2011). Diese Daten wurden jedoch im Wesentlichen in der Spätphase der Sepsis erhoben und nicht, wie in dieser Arbeit, in der Akutphase. Dennoch kann angenommen werden, dass die meisten Fettgewebs-Makrophagen in den untersuchten Patienten eine solche Differenzierung aufweisen. Diesen Makrophagen wird in der Literatur eher eine adaptive und protektive Funktion in der Sepsis zugeschrieben (Marques et al. 2013). Denkbar ist auch, dass die Makrophagenzahl bei den untersuchten Sepsispatienten Ausdruck einer vorbestehenden Fettgewebsinflammation ist. Aufgrund des Querschnitts-Charakters der Studie können hierzu jedoch keine validen Aussagen getroffen werden.

5.7 Chemerin ist assoziiert mit Mortalität und Erkrankungsschwere

Die Assoziation der zirkulierenden Chemerinspiegel mit dem APACHE II Score in der klinischen Studie und mit dem CSS im Mausmodell ließ darauf schließen, dass Chemerin als möglicher Prognose- oder Verlaufsparemeter in der Sepsis evaluiert werden sollte. Da hierzu nur Querschnittsdaten vorlagen, kann nicht auf Kausalität geschlossen werden. Dass die genannte Assoziation jedoch nach statistischer Adjustierung für CRP oder das Nüchterninsulin verschwand, weist darauf hin, dass diese durch Mechanismen der systemischen Inflammation und der metabolischen Regulation des Glukosestoffwechsels vermittelt wurde. Beim Erkrankungsbild der rheumatoiden Arthritis wird berichtet, dass hier die Chemerinspiegel mit der Krankheitsaktivität und nicht mit Adipositas assoziiert sind (Ha et al. 2014). Neuere Daten unterstützen das Konzept, dass Chemerin nicht *per se* eine pro- oder antiinflammatorische Funktion zukommt, sondern dass es Infiltration immunomodulatorischer CMKLR1⁺ Zellen initiiert, welche dann, abhängig vom lokalen Milieu, eine pro- oder antiinflammatorische Immunantwort erzeugen (Zabel et al. 2014). Außerdem sind Chemerinpeptide in der Lage, vor Entzündungen der Lunge und vor Zymosan-induzierter Peritonitis CMKLR1-abhängig zu schützen (Bondue et al. 2011b, Cash et al. 2008, Luangsay et al. 2009) und direkte antibakterielle Effekte sind beschrieben (Banas et al. 2013, Kulig et al. 2011). Allerdings ist Chemerin auch mit erhöhten Glukosespiegeln assoziiert (Becker et al. 2010, Ernst et al. 2010), unter anderem auch in der vorliegenden Arbeit, was wieder eine schlechtere prognostische Assoziation implizieren würde. Daher sind sowohl eine adaptive als auch maladaptive Funktion des Chemerins in der Wirtsreaktion bei Sepsis denkbar. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass in der HMOX-Studiengruppe die Assoziation mit der Mortalität

unterschiedlich war, je nachdem welche Subgruppe entsprechend des glykämischen Status betrachtet wurde. Eine unterschiedliche Chemerinfunktion bei verschiedenen Krankheitsverläufen kann daher hypothetisiert werden. Ein möglicher, wiederum hypothetischer, Erklärungsansatz hierfür wäre eine unterschiedliche proteolytische Prozessierung mit resultierenden verschiedenen Chemerinisformen, bei denen aufgrund teilweise entgegengesetzter Wirkung auf die Chemerinrezeptoren (Zabel et al. 2014) eine unterschiedliche prognostische Assoziation denkbar wäre. Jedoch waren die SHG-Patienten deutlich jünger und schlanker als die Patienten der anderen Gruppen, was mögliche weitere zugrunde liegende pathologische Zustände und Krankheiten impliziert, die nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit lagen. Einschränkend muss beachtet werden, dass aus der HMOX-Studiengruppe keine Daten zum HbA_{1c} vorlagen. Daher ist es durchaus möglich, dass Patienten mit einem vorher unentdeckten T2D oder einem metabolischen Syndrom in die Stresshyperglykämie-Gruppe eingestuft wurden. Dies würde auch die ungewöhnlich hohe Prävalenz der Stresshyperglykämie von circa 40 % bei den untersuchten Patienten erklären, verglichen mit üblicherweise in der Literatur berichteten Prävalenzen von 12 bis 17,7 % (Leonidou et al. 2008, Umpierrez et al. 2002). Zusammenfassend gesagt ist Chemerin nicht nur ein interessanter Kandidat als diagnostischer oder prognostischer Parameter, sondern sollte außerdem zukünftig als therapeutische Zielstruktur evaluiert werden. Aus den genannten Gründen sollte der glykämische Status der Sepsis-Patienten immer mit in zukünftige Studiendesigns einbezogen werden. Zur Bestätigung der Assoziation von Chemerin mit der Krankheitsprognose bei Sepsis werden zukünftig prospektive Studien notwendig sein.

5.8 Eignung des Mausmodells zum Studium von Chemerin bei Sepsis

Zum weiteren detaillierten Studium der Funktion von Chemerin und seinen Rezeptoren unter verschiedenen pathologischen Bedingungen müssen reliable Tiermodelle für verschiedene Erkrankungen zur Verfügung stehen. Das reproduzierbare PCI-Modell der Sepsis bildet die Hauptcharakteristiken der Sepsis des Menschen ab (Gonnert et al. 2011, Lambeck et al. 2012). Allerdings handelt es sich um ein Modell der hochakuten Sepsis. Diese Krankheitsphase wird durch die meisten Patienten überstanden, sodass sich Todesfälle in aller Regel erst nach mehreren Tagen Krankheitsverlauf ereignen. Diese Phase ist durch das genutzte Modell nicht abgebildet (Chen et al. 2014b), Langzeitmodelle der PCI sind jedoch möglich und werden in der Arbeitsgruppe durchgeführt (Otto et al.

2015). Problematisch für weitere Untersuchungen ist, dass es in Modellen der abdominellen Sepsis bei der Maus nicht zur Stresshyperglykämie kommt (Drechsler et al. 2015). Die Insulinsensitivität und Glukosetoleranz in der murinen Sepsis ist jedoch herabgesetzt (Matsuda et al. 2009). Die Möglichkeit zum Studium des Einflusses von Chemerin auf die Dysregulation der Glukosehomöostase in der Wirtsreaktion ist mit diesem Modell somit deutlich eingeschränkt. Die Untersuchung des Einflusses auf Insulinsensitivität und Glukosetoleranz sowie auf molekulare Parameter der Insulinresistenz, etwa Phosphorylierung von Insulinrezeptor, IRS-1 oder Akt, ist jedoch trotzdem möglich. Die wesentlichen Ergebnisse aus der klinischen Studie bezüglich zirkulierendem Chemerin und der Fettgewebsexpression konnten im Mausmodell reproduziert werden. Des Weiteren waren die zirkulierenden Chemerinspiegel mit der Krankheitsschwere im Tiermodell assoziiert, was der Assoziation mit dem APACHEII-Score in der humanen Studie entspricht.

In der Literatur wurde jedoch über wichtige Speziesunterschiede zwischen humanem und murinem Chemerin berichtet. In der Maus besteht ein ausgeprägter diurnaler Rhythmus der Höhe der zirkulierenden Chemerinspiegel (Parlee et al. 2010), der beim Menschen nicht bestätigt werden konnte (Chamberland et al. 2013). Außerdem wurden Unterschiede im Chemerin mRNA Expressionsmuster beschrieben, mit hoher Fettgewebsexpression in der Maus (Goralski et al. 2007) und niedriger Fettgewebsexpression im Menschen (Chamberland et al. 2013). Die Arbeitsgruppe Chamberland et al. (2013) legt in ihrer Arbeit aber keine Informationen über die Herkunft der untersuchten Fettgewebeproben vor, sodass unklar bleibt, ob es sich um subkutanen oder viszerales Fettgewebe handelt. In der vorliegenden Arbeit war die Expression im humanen und murinen viszeralen Fettgewebe auch in etwa vergleichbar. Diese Speziesunterschiede werden des Weiteren durch öffentlich einsehbare Micro Array-Daten infrage gestellt, welche im Expressions-Atlas des European Bioinformatics Institute des European Molecular Biology Laboratory einsehbar sind. Diese zeigen, dass Chemerin auch im humanen Fettgewebe moderat bis hoch exprimiert wird (EMBL-EBI 2015, Uhlen et al. 2015). Auch wenn die Übertragung von Ergebnissen aus tierexperimentellen Studien immer mit äußerster Vorsicht erfolgen sollte, erscheint das genutzte Modell der peritonealen Sepsis und des Adipositas-induzierten T2D geeignet zur weiteren funktionellen Untersuchung von Chemerin bei diesen Krankheitsbildern.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von Chemerin in der Wirtsantwort bei Sepsis zu charakterisieren. Hierzu wurde die Hypothese überprüft, dass Chemerin in diese Wirtsantwort involviert und mit der systemischen Inflammationsantwort sowie der gestörten Glukosehomöostase assoziiert ist.

Die erhöhten Chemerinspiegel bei Sepsispatienten konnten zeigen, dass Chemerin in die Wirtsreaktion bei Sepsis involviert ist. Da es zudem auch mit Parametern der systemischen Inflammation und der gestörten Glukosehomöostase assoziiert ist, legt eine funktionelle Beteiligung von Chemerin an diesen Prozessen nahe. Dass sich sowohl positive als auch negative Assoziationen mit Parametern der systemischen Inflammation, namentlich CRP und Leukozytenzahl, nachweisen ließen, weist auf eine mögliche adaptive Funktion von Chemerin hin, die in der Literatur bereits für verschiedene andere Erkrankungen kontrovers diskutiert wird. Unterstrichen wird dies durch die Assoziation mit der Makrophagenzahl im viszeralen Fettgewebe, denen in aktuellen Veröffentlichungen ebenfalls eine adaptive Rolle in der Sepsis zugeschrieben wird sowie durch die verschiedene Assoziation der Chemerinspiegel mit der Mortalität in unterschiedlichen Patientensubgruppen.

Nachdem diese Arbeit aufzeigen konnte, dass Chemerin und seine Rezeptoren an der Wirtsantwort bei Sepsis beteiligt sind, müssen zukünftig die beteiligten Mechanismen näher untersucht und der Kausalitätsnachweis geführt werden. Hierfür werden Untersuchungen in Inflammationsmodellen in der Zellkultur verschiedener Zelllinien sowie tierexperimentelle Studien notwendig sein. Dabei sollte untersucht werden, inwieweit die Gabe von Chemerin, die Hemmung der Chemerinaktivität oder die Modulation des Chemerin-Stoffwechsels einen Einfluss auf die Wirtsantwort und die Mortalität haben. Dies kann beispielsweise im in dieser Arbeit untersuchten PCI-Modell der Sepsis erfolgen, welches sich als prinzipiell hierfür geeignet gezeigt hat. Hierdurch ließe sich auch eine genauere Aussage über mögliche negative oder adaptive Funktionen des Chemerins in der Wirtsantwort bei Sepsis treffen.

Außerdem werden weitere klinische Untersuchungen von Nöten sein, mit dem Ziel, an größeren Patientenkohorten Daten zum Zusammenhang von Chemerin mit Mortalität, Krankheitsschwere und -verlauf sowie Organversagen zu gewinnen. Wichtig ist des Weiteren die Untersuchung der Kinetik der Chemerinkonzentration im Verlauf der Sepsis.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Beachtet werden muss in zukünftigen Studien insbesondere der glykämische Status der Sepsispatienten, da dieser wahrscheinlich einen großen Einfluss auf die Regulation des Chemerinsystems hat. Eine Einbeziehung von Untersuchungen der verschiedenen Chemerin-Isoformen sowie der Chemerinaktivität wird in Zukunft ebenfalls unerlässlich sein, da diese funktionell von außerordentlicher Bedeutung sind.

Die vorliegende Arbeit könnte daher der Ausgangspunkt für die Evaluation von Chemerin als diagnostischer Marker oder sogar als therapeutische Zielstruktur bei Patienten mit Sepsis sein.

7. Literaturverzeichnis

- Adrych K, Stojek M, Smoczynski M, Sledzinski T, Sylwia SW, Swierczynski J. 2012. Increased serum chemerin concentration in patients with chronic pancreatitis. *Dig Liver Dis*, 44 (5):393-397.
- Alfadda AA, Sallam RM, Chishti MA, Moustafa AS, Fatma S, Alomaim WS, Al-Naami MY, Bassas AF, Chrousos GP, Jo H. 2012. Differential patterns of serum concentration and adipose tissue expression of chemerin in obesity: adipose depot specificity and gender dimorphism. *Mol Cells*, 33 (6):591-596.
- American Diabetes Association. 2010. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33 Suppl 1:S62-69.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 64 (15):5245-5250.
- Angele MK, Pratschke S, Hubbard WJ, Chaudry IH. 2014. Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence*, 5 (1):12-19.
- Badawi O, Waite MD, Fuhrman SA, Zuckerman IH. 2012. Association between intensive care unit-acquired dysglycemia and in-hospital mortality. *Crit Care Med*, 40 (12):3180-3188.
- Banas M, Zabieglo K, Kasetty G, Kapinska-Mrowiecka M, Borowczyk J, Drukala J, Murzyn K, Zabel BA, Butcher EC, Schroeder JM, Schmidtchen A, Cichy J. 2013. Chemerin is an antimicrobial agent in human epidermis. *PLoS One*, 8 (3):e58709.
- Barnea G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, Axel R, Lee KJ. 2008. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (1):64-69.
- Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H, Reinhart K. 2006. [Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]. *Anaesthesist*, 55 (8):835-845.
- Becker M, Rabe K, Lebherz C, Zugwurst J, Goke B, Parhofer KG, Lehrke M, Broedl UC. 2010. Expression of human chemerin induces insulin resistance in the skeletal muscle but does not affect weight, lipid levels, and atherosclerosis in LDL receptor knockout mice on high-fat diet. *Diabetes*, 59 (11):2898-2903.
- Blaszak J, Szolkiewicz M, Sucajtys-Szulc E, Konarzewski M, Lizakowski S, Swierczynski J, Rutkowski B. 2015. High serum chemerin level in CKD patients is related to kidney function, but not to its adipose tissue overproduction. *Ren Fail*:1-6.
- Blumberg D, Hochwald S, Burt M, Donner D, Brennan MF. 1995. Tumor necrosis factor alpha stimulates gluconeogenesis from alanine in vivo. *J Surg Oncol*, 59 (4):220-224; discussion 224-225.
- Bondue B, Wittamer V, Parmentier M. 2011a. Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22 (5-6):331-338.
- Bondue B, Vosters O, de Nadai P, Glineur S, De Henau O, Luangsay S, Van Gool F, Communi D, De Vuyst P, Desmecht D, Parmentier M. 2011b. ChemR23 dampens lung inflammation and enhances anti-viral immunity in a mouse model of acute viral pneumonia. *PLoS Pathog*, 7 (11):e1002358.
- Borregaard N. 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33 (5):657-670.
- Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D. 2007. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology*, 148 (10):4687-4694.

- Bozaoglu K, Segal D, Shields KA, Cummings N, Curran JE, Comuzzie AG, Mahaney MC, Rainwater DL, VandeBerg JL, MacCluer JW, Collier G, Blangero J, Walder K, Jowett JB. 2009. Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a Mexican-American population. *J Clin Endocrinol Metab*, 94 (8):3085-3088.
- Bozaoglu K, Curran JE, Stocker CJ, Zaibi MS, Segal D, Konstantopoulos N, Morrison S, Carless M, Dyer TD, Cole SA, Goring HH, Moses EK, Walder K, Cawthorne MA, Blangero J, Jowett JB. 2010. Chemerin, a novel adipokine in the regulation of angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 95 (5):2476-2485.
- Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, Moerer O, Gruendling M, Oppert M, Grond S, Olthoff D, Jaschinski U, John S, Rossaint R, Welte T, Schaefer M, Kern P, Kuhnt E, Kiehntopf M, Hartog C, Natanson C, Loeffler M, Reinhart K, German Competence Network S. 2008. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med*, 358 (2):125-139.
- Brunt EM, Tiniakos DG. 2005. Pathological features of NASH. *Front Biosci*, 10:1475-1484.
- Buechler C. 2014. Chemerin, a novel player in inflammatory bowel disease. *Cell Mol Immunol*.
- Capurso C, Capurso A. 2012. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul Pharmacol*, 57 (2-4):91-97.
- Cash JL, Hart R, Russ A, Dixon JP, Colledge WH, Doran J, Hendrick AG, Carlton MB, Greaves DR. 2008. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. *J Exp Med*, 205 (4):767-775.
- Chamberland JP, Berman RL, Aronis KN, Mantzoros CS. 2013. Chemerin is expressed mainly in pancreas and liver, is regulated by energy deprivation, and lacks day/night variation in humans. *Eur J Endocrinol*, 169 (4):453-462.
- Chen M, Wang B, Xu Y, Deng Z, Xue H, Wang L, He L. 2014a. Diagnostic value of serum leptin and a promising novel diagnostic model for sepsis. *Exp Ther Med*, 7 (4):881-886.
- Chen P, Stanojic M, Jeschke MG. 2014b. Differences between murine and human sepsis. *Surg Clin North Am*, 94 (6):1135-1149.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*, 46 (11):2347-2355.
- Conde J, Scotece M, Gomez R, Lopez V, Gomez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O. 2011. Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. *Biofactors*, 37 (6):413-420.
- Deutschman CS, Tracey KJ. 2014. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity*, 40 (4):463-475.
- Di Guglielmo GM, Drake PG, Baass PC, Authier F, Posner BI, Bergeron JJ. 1998. Insulin receptor internalization and signalling. *Mol Cell Biochem*, 182 (1-2):59-63.
- Döcke S, Lock JF, Birkenfeld AL, Hoppe S, Lieske S, Rieger A, Raschzok N, Sauer IM, Florian S, Osterhoff MA, Heller R, Herrmann K, Lindenmuller S, Horn P, Bauer M, Weickert MO, Neuhaus P, Stockmann M, Mohlig M, Pfeiffer AF, von Loeffelholz C. 2013. Elevated hepatic chemerin mRNA expression in human non-alcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol*, 169 (5):547-557.
- Drechsler S, Weixelbaumer KM, Weidinger A, Raeven P, Khadem A, Redl H, van Griensven M, Bahrami S, Remick D, Kozlov A, Osuchowski MF. 2015. Why do

- they die? Comparison of selected aspects of organ injury and dysfunction in mice surviving and dying in acute abdominal sepsis. *Intensive Care Med Exp*, 3 (1):48.
- Du XY, Zabel BA, Myles T, Allen SJ, Handel TM, Lee PP, Butcher EC, Leung LL. 2009. Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase N, carboxypeptidase B (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), and platelets. *J Biol Chem*, 284 (2):751-758.
- Dungan KM, Braithwaite SS, Preiser JC. 2009. Stress hyperglycaemia. *Lancet*, 373 (9677):1798-1807.
- Eisinger K, Krautbauer S, Wiest R, Weiss TS, Buechler C. 2015. Reduced serum chemerin in patients with more severe liver cirrhosis. *Exp Mol Pathol*, 98 (2):208-213.
- El-Mesallamy HO, El-Derany MO, Hamdy NM. 2011. Serum omentin-1 and chemerin levels are interrelated in patients with Type 2 diabetes mellitus with or without ischaemic heart disease. *Diabet Med*, 28 (10):1194-1200.
- EMBL-EBI. 2015. RNA-seq of coding RNA from tissue samples of 122 human individuals representing 32 different tissues. https://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments/E-MTAB-2836?specific=on&queryFactorType=ORGANISM_PART&queryFactorValues=&geneQuery=RARRES2&exactMatch=true. [abgerufen am 30.03.2015].
- Ernst MC, Sinal CJ. 2010. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends Endocrinol Metab*, 21 (11):660-667.
- Ernst MC, Issa M, Goralski KB, Sinal CJ. 2010. Chemerin exacerbates glucose intolerance in mouse models of obesity and diabetes. *Endocrinology*, 151 (5):1998-2007.
- Esteghamati A, Ghasemiesfe M, Mousavizadeh M, Noshad S, Nakhjavani M. 2014. Pioglitazone and metformin are equally effective in reduction of chemerin in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Investig*, 5 (3):327-332.
- Fatima SS, Bozaoglu K, Rehman R, Alam F, Memon AS. 2013. Elevated chemerin levels in Pakistani men: an interrelation with metabolic syndrome phenotypes. *PLoS One*, 8 (2):e57113.
- Finfer S. 2014. Clinical controversies in the management of critically ill patients with severe sepsis: resuscitation fluids and glucose control. *Virulence*, 5 (1):200-205.
- Fujiwara T, Cherrington AD, Neal DN, McGuinness OP. 1996. Role of cortisol in the metabolic response to stress hormone infusion in the conscious dog. *Metabolism*, 45 (5):571-578.
- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Losche W, Claus RA, Bauer M. 2011. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res*, 170 (1):e123-134.
- Gonzalvo-Feo S, Del Prete A, Pruenster M, Salvi V, Wang L, Sironi M, Bierschenk S, Sperandio M, Vecchi A, Sozzani S. 2014. Endothelial cell-derived chemerin promotes dendritic cell transmigration. *J Immunol*, 192 (5):2366-2373.
- Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ. 2007. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem*, 282 (38):28175-28188.
- Gruben N, Aparicio Vergara M, Kloosterhuis NJ, van der Molen H, Stoelwinder S, Youssef S, de Bruin A, Delsing DJ, Kuivenhoven JA, van de Sluis B, Hofker MH, Koonen DP. 2014. Chemokine-like receptor 1 deficiency does not affect the development of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One*, 9 (4):e96345.
- Guillabert A, Wittamer V, Bondue B, Godot V, Imbault V, Parmentier M, Communi D. 2008. Role of neutrophil proteinase 3 and mast cell chymase in chemerin proteolytic regulation. *J Leukoc Biol*, 84 (6):1530-1538.

- Ha YJ, Kang EJ, Song JS, Park YB, Lee SK, Choi ST. 2014. Plasma chemerin levels in rheumatoid arthritis are correlated with disease activity rather than obesity. *Joint Bone Spine*, 81 (2):189-190.
- Herenius MM, Oliveira AS, Wijbrandts CA, Gerlag DM, Tak PP, Lebre MC. 2013. Anti-TNF therapy reduces serum levels of chemerin in rheumatoid arthritis: a new mechanism by which anti-TNF might reduce inflammation. *PLoS One*, 8 (2):e57802.
- Hillenbrand A, Weiss M, Knippschild U, Wolf AM, Huber-Lang M. 2012. Sepsis-Induced Adipokine Change with regard to Insulin Resistance. *Int J Inflam*, 2012:972368.
- Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348 (2):138-150.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 13 (12):862-874.
- Huang K, Du G, Li L, Liang H, Zhang B. 2012. Association of chemerin levels in synovial fluid with the severity of knee osteoarthritis. *Biomarkers*, 17 (1):16-20.
- Issa ME, Muruganandan S, Ernst MC, Parlee SD, Zabel BA, Butcher EC, Sinal CJ, Goralski KB. 2012. Chemokine-like receptor 1 regulates skeletal muscle cell myogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302 (11):C1621-1631.
- Jeevanandam M, Young DH, Schiller WR. 1990. Glucose turnover, oxidation, and indices of recycling in severely traumatized patients. *J Trauma*, 30 (5):582-589.
- Jiao J, Gao M, Zhang H, Wang N, Xiao Z, Liu K, Yang M, Wang K, Xiao X. 2014. Identification of potential biomarkers by serum proteomics analysis in rats with sepsis. *Shock*, 42 (1):75-81.
- Kanebratt KP, Andersson TB. 2008. Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos*, 36 (7):1444-1452.
- Kim SH, Lee SH, Ahn KY, Lee DH, Suh YJ, Cho SG, Choi YJ, Lee DH, Lee SY, Hong SB, Kim YS, Jeon JY, Nam M. 2014. Effect of lifestyle modification on serum chemerin concentration and its association with insulin sensitivity in overweight and obese adults with type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 80 (6):825-833.
- Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. 1985. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*, 13 (10):818-829.
- Kralisch S, Weise S, Sommer G, Lipfert J, Lossner U, Bluher M, Stumvoll M, Fasshauer M. 2009. Interleukin-1beta induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro. *Regul Pept*, 154 (1-3):102-106.
- Krautbauer S, Wanninger J, Eisinger K, Hader Y, Beck M, Kopp A, Schmid A, Weiss TS, Dorn C, Buechler C. 2013. Chemerin is highly expressed in hepatocytes and is induced in non-alcoholic steatohepatitis liver. *Exp Mol Pathol*, 95 (2):199-205.
- Kulig P, Kantyka T, Zabel BA, Banas M, Chyra A, Stefanska A, Tu H, Allen SJ, Handel TM, Kozik A, Potempa J, Butcher EC, Cichy J. 2011. Regulation of chemerin chemoattractant and antibacterial activity by human cysteine cathepsins. *J Immunol*, 187 (3):1403-1410.
- Lambeck S, Weber M, Gonnert FA, Mrowka R, Bauer M. 2012. Comparison of sepsis-induced transcriptomic changes in a murine model to clinical blood samples identifies common response patterns. *Front Microbiol*, 3:284.
- Lang CH, Dobrescu C, Meszaros K. 1990. Insulin-mediated glucose uptake by individual tissues during sepsis. *Metabolism*, 39 (10):1096-1107.
- Lang CH, Bagby GJ, Blakesley HL, Spitzer JJ. 1989. Importance of hyperglucagonemia in eliciting the sepsis-induced increase in glucose production. *Circ Shock*, 29 (3):181-191.

- Langouche L, Marques MB, Ingels C, Gunst J, Derde S, Vander Perre S, D'Hoore A, Van den Berghe G. 2011. Critical illness induces alternative activation of M2 macrophages in adipose tissue. *Crit Care*, 15 (5):R245.
- Langouche L, Perre SV, Thiessen S, Gunst J, Hermans G, D'Hoore A, Kola B, Korbonits M, Van den Berghe G. 2010. Alterations in adipose tissue during critical illness: An adaptive and protective response? *Am J Respir Crit Care Med*, 182 (4):507-516.
- Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. 1993. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*, 270 (24):2957-2963.
- Lee MK, Chu SH, Lee DC, An KY, Park JH, Kim DI, Kim J, Hong S, Im JA, Lee JW, Jeon JY. 2013. The association between chemerin and homeostasis assessment of insulin resistance at baseline and after weight reduction via lifestyle modifications in young obese adults. *Clin Chim Acta*, 421:109-115.
- Leonidou L, Michalaki M, Leonardou A, Polyzogopoulou E, Fouka K, Gerolymos M, Leonardos P, Psirogiannis A, Kyriazopoulou V, Gogos CA. 2008. Stress-induced hyperglycemia in patients with severe sepsis: a compromising factor for survival. *Am J Med Sci*, 336 (6):467-471.
- Levi M, van der Poll T. 2010. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med*, 38 (2 Suppl):S26-34.
- Losser MR, Damoiseil C, Payen D. 2010. Bench-to-bedside review: Glucose and stress conditions in the intensive care unit. *Crit Care*, 14 (4):231.
- Luangsay S, Wittamer V, Bondue B, De Henau O, Rouger L, Brait M, Franssen JD, de Nadai P, Huaux F, Parmentier M. 2009. Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model. *J Immunol*, 183 (10):6489-6499.
- Makrilakis K, Fragiadaki K, Smith J, Sfrikakis PP, Kitis GD. 2014. Interrelated reduction of chemerin and plasminogen activator inhibitor-1 serum levels in rheumatoid arthritis after interleukin-6 receptor blockade. *Clin Rheumatol*.
- Marik PE, Raghavan M. 2004. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. *Intensive Care Med*, 30 (5):748-756.
- Marik PE, Bellomo R. 2013. Stress hyperglycemia: an essential survival response! *Crit Care*, 17 (2):305.
- Marques M, Perre S, Aertgeerts A, Derde S, Guiza F, Casaer MP, Hermans G, Van den Berghe G, Langouche L. 2013. Critical illness induces nutrient-independent adipogenesis and accumulation of alternatively activated tissue macrophages. *Crit Care*, 17 (5):R193.
- Matsuda N, Yamamoto S, Yokoo H, Tobe K, Hattori Y. 2009. Nuclear factor-kappaB decoy oligodeoxynucleotides ameliorate impaired glucose tolerance and insulin resistance in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Crit Care Med*, 37 (10):2791-2799.
- Matsuzawa Y. 2008. The role of fat topology in the risk of disease. *Int J Obes (Lond)*, 32 Suppl 7:S83-92.
- Mattern A, Zellmann T, Beck-Sickinger AG. 2014. Processing, signaling, and physiological function of chemerin. *IUBMB Life*, 66 (1):19-26.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28 (7):412-419.

- Maury E, Brichard SM. 2010. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 314 (1):1-16.
- Mayr FB, Yende S, Angus DC. 2014. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 5 (1):4-11.
- McGuinness OP, Shau V, Benson EM, Lewis M, Snowden RT, Greene JE, Neal DW, Cherrington AD. 1997. Role of epinephrine and norepinephrine in the metabolic response to stress hormone infusion in the conscious dog. *Am J Physiol*, 273 (4 Pt 1):E674-681.
- Monnier J, Lewen S, O'Hara E, Huang K, Tu H, Butcher EC, Zabel BA. 2012. Expression, regulation, and function of atypical chemerin receptor CCRL2 on endothelial cells. *J Immunol*, 189 (2):956-967.
- Morris DL, Singer K, Lumeng CN. 2011. Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 14 (4):341-346.
- Nagpal S, Patel S, Jacobe H, DiSepio D, Ghosn C, Malhotra M, Teng M, Duvic M, Chandraratna RA. 1997. Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. *J Invest Dermatol*, 109 (1):91-95.
- NCEP-ATPIII. 2002. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 106 (25):3143-3421.
- Nowotny K, Jung T, Hohn A, Weber D, Grune T. 2015. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules*, 5 (1):194-222.
- Olefsky JM, Glass CK. 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*, 72:219-246.
- Otero K, Vecchi A, Hirsch E, Kearley J, Vermi W, Del Prete A, Gonzalvo-Feo S, Garlanda C, Azzolino O, Salogni L, Lloyd CM, Facchetti F, Mantovani A, Sozzani S. 2010. Nonredundant role of CCRL2 in lung dendritic cell trafficking. *Blood*, 116 (16):2942-2949.
- Otto GP, Grunwald B, Geis C, Kothe S, Hurtado-Oliveros J, Chung HY, Ekaney M, Bockmeyer CL, Sossdorf M, Busch M, Claus RA. 2015. Impact of antibiotic treatment intensity on long-term sepsis-associated kidney injury in a polymicrobial peritoneal contamination and infection model. *Nephron*, 129 (2):137-142.
- Parlee SD, Ernst MC, Muruganandan S, Sinal CJ, Goralski KB. 2010. Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and tumor necrosis factor- α . *Endocrinology*, 151 (6):2590-2602.
- Parolini S, Santoro A, Marcenaro E, Luini W, Massardi L, Facchetti F, Communi D, Parmentier M, Majorana A, Sironi M, Tabellini G, Moretta A, Sozzani S. 2007. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood*, 109 (9):3625-3632.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9):e45.
- Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Grundling M, John S, Kern W, Kreymann G, Kruger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stuber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T, German Sepsis S, German Interdisciplinary Association of Intensive C, Emergency M. 2010. Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis

Literaturverzeichnis

- Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). *Ger Med Sci*, 8:Doc14.
- Ress C, Tschoner A, Engl J, Klaus A, Tilg H, Ebenbichler CF, Patsch JR, Kaser S. 2010. Effect of bariatric surgery on circulating chemerin levels. *Eur J Clin Invest*, 40 (3):277-280.
- Rourke JL, Muruganandan S, Dranse HJ, McMullen NM, Sinal CJ. 2014. Gpr1 is an active chemerin receptor influencing glucose homeostasis in obese mice. *J Endocrinol*, 222 (2):201-215.
- Schultz S, Saalbach A, Heiker JT, Meier R, Zellmann T, Simon JC, Beck-Sickingher AG. 2013. Proteolytic activation of prochemerin by kallikrein 7 breaks an ionic linkage and results in C-terminal rearrangement. *Biochem J*, 452 (2):271-280.
- Scotece M, Conde J, Gomez R, Lopez V, Lago F, Gomez-Reino JJ, Gualillo O. 2011. Beyond fat mass: exploring the role of adipokines in rheumatic diseases. *ScientificWorldJournal*, 11:1932-1947.
- Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ. 2012. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303 (5):L355-363.
- Sell H, Laurencikiene J, Taube A, Eckardt K, Cramer A, Horrigs A, Arner P, Eckel J. 2009. Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes*, 58 (12):2731-2740.
- Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M. 2012. Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. *Thromb Res*, 129 (3):290-295.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, 116 (7):1793-1801.
- Sriskandan S, Altmann DM. 2008. The immunology of sepsis. *J Pathol*, 214 (2):211-223.
- Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. 1988. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 37 (9):1163-1167.
- Takahashi M, Inomata S, Okimura Y, Iguchi G, Fukuoka H, Miyake K, Koga D, Akamatsu S, Kasuga M, Takahashi Y. 2013. Decreased serum chemerin levels in male Japanese patients with type 2 diabetes: sex dimorphism. *Endocr J*, 60 (1):37-44.
- Takahashi M, Takahashi Y, Takahashi K, Zolotaryov FN, Hong KS, Kitazawa R, Iida K, Okimura Y, Kaji H, Kitazawa S, Kasuga M, Chihara K. 2008. Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett*, 582 (5):573-578.
- Tan BK, Chen J, Farhatullah S, Adya R, Kaur J, Heutling D, Lewandowski KC, O'Hare JP, Lehnert H, Randeve HS. 2009. Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin. *Diabetes*, 58 (9):1971-1977.
- Tönjes A, Fasshauer M, Kratzsch J, Stumvoll M, Blüher M. 2010. Adipokine pattern in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance in comparison to normal glucose tolerance and diabetes. *PLoS One*, 5 (11):e13911.
- Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szgyarto CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Ponten F. 2015. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347 (6220):1260419.

- Umpierrez GE, Isaacs SD, Bazargan N, You X, Thaler LM, Kitabchi AE. 2002. Hyperglycemia: an independent marker of in-hospital mortality in patients with undiagnosed diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 87 (3):978-982.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3 (7):RESEARCH0034.
- Vassiliadi DA, Tzanela M, Kotanidou A, Orfanos SE, Nikitas N, Armaganidis A, Koutsilieris M, Roussos C, Tsagarakis S, Dimopoulou I. 2012. Serial changes in adiponectin and resistin in critically ill patients with sepsis: associations with sepsis phase, severity, and circulating cytokine levels. *J Crit Care*, 27 (4):400-409.
- Vermi W, Riboldi E, Wittamer V, Gentili F, Luini W, Marrelli S, Vecchi A, Franssen JD, Communi D, Massardi L, Sironi M, Mantovani A, Parmentier M, Facchetti F, Sozzani S. 2005. Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J Exp Med*, 201 (4):509-515.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. 1996. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*, 22 (7):707-710.
- Weigert J, Obermeier F, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, Aslanidis C, Rogler G, Ott C, Schaffler A, Scholmerich J, Buechler C. 2010a. Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 16 (4):630-637.
- Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, Wiest R, Farkas S, Scherer MN, Schaffler A, Aslanidis C, Scholmerich J, Buechler C. 2010b. Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 72 (3):342-348.
- Wensveen FM, Valentic S, Sestan M, Turk Wensveen T, Polic B. 2015. The "Big Bang" in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. *Eur J Immunol*, 45 (9):2446-2456.
- Whitcomb BW, Pradhan EK, Pittas AG, Roghmann MC, Perencevich EN. 2005. Impact of admission hyperglycemia on hospital mortality in various intensive care unit populations. *Crit Care Med*, 33 (12):2772-2777.
- Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. 2014. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*, 5 (1):36-44.
- Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, Brezillon S, Tyldesley R, Blanpain C, Detheux M, Mantovani A, Sozzani S, Vassart G, Parmentier M, Communi D. 2003. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med*, 198 (7):977-985.
- Wollenberger A, Ristau O, Schoffa G. 1960. Eine Einfache Technik Der Extrem Schnellen Abkuhlung Grosserer Gewebestucke. *Pflugers Archiv Fur Die Gesamte Physiologie Des Menschen Und Der Tiere*, 270 (4):399-412.
- Yamaguchi Y, Du XY, Zhao L, Morser J, Leung LL. 2011. Proteolytic cleavage of chemerin protein is necessary for activation to the active form, Chem157S, which functions as a signaling molecule in glioblastoma. *J Biol Chem*, 286 (45):39510-39519.

Literaturverzeichnis

- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13:134.
- Zabel BA, Kwitniewski M, Banas M, Zabieglo K, Murzyn K, Cichy J. 2014. Chemerin regulation and role in host defense. *Am J Clin Exp Immunol*, 3 (1):1-19.
- Zabel BA, Allen SJ, Kulig P, Allen JA, Cichy J, Handel TM, Butcher EC. 2005. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *J Biol Chem*, 280 (41):34661-34666.
- Zabel BA, Nakae S, Zuniga L, Kim JY, Ohyama T, Alt C, Pan J, Suto H, Soler D, Allen SJ, Handel TM, Song CH, Galli SJ, Butcher EC. 2008. Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *J Exp Med*, 205 (10):2207-2220.
- Zhao L, Yamaguchi Y, Sharif S, Du XY, Song JJ, Lee DM, Recht LD, Robinson WH, Morser J, Leung LL. 2011. Chemerin158K protein is the dominant chemerin isoform in synovial and cerebrospinal fluids but not in plasma. *J Biol Chem*, 286 (45):39520-39527.
- Zingarelli B, Cook JA. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock*, 23 (5):393-399.

8. Anhang

8.1 Diagnosekriterien Sepsis

I. Nachweis der Infektion

Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien

II. Systemic inflammatory host response (SIRS) (mind. 2 Kriterien)

- Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$) bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder -vesikale Messung
- Tachykardie: Herzfrequenz ≥ 90 /min
- Tachypnoe (Frequenz ≥ 20 /min) o. Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4.3$ kPa/ ≤ 33 mmHg)
- Leukozytose ($\geq 12000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild

III. Akute Organdysfunktion (mind. 1 Kriterium)

- Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium
- Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30% innerhalb von 24 Stunden oder Thrombozytenzahl $\leq 100.000/\text{mm}^3$. Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein
- Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10$ kPa (≤ 75 mmHg) unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von ≤ 33 kPa (≤ 250 mmHg) unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.
- Renale Dysfunktion: Eine Diurese von ≤ 0.5 ml/kg/h für wenigstens 2 Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins $> 2\times$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.
- Metabolische Azidose: Base Excess ≤ -5 mmol/l oder eine Laktatkonzentration $> 1,5\times$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.

Sepsis: Kriterien I und II,

Schwere Sepsis: Kriterien I, II und III

Septischer Schock: Kriterien I und II sowie für wenigstens 1 Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck ≤ 90 mmHg bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck ≤ 65 mmHg oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck ≥ 90 mmHg oder den arteriellen Mitteldruck ≥ 65 mmHg zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.

Quelle: Reinhart et al. (2010)

8.2 Anamnesebogen

Anamnesebogen INSIGHT-Studie

<u>Prüfung von Ein- und Ausschlusskriterien</u>	
<u>Einschlusskriterien:</u>	
<input type="checkbox"/>	Schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme
<input type="checkbox"/>	OP-Indikation für eine offene Laparotomie
<input type="checkbox"/>	Alter \geq 18 Jahre
<u>Ausschlusskriterien:</u>	
<input type="checkbox"/>	Typ 1 Diabetes mellitus
<input type="checkbox"/>	Einnahme von Immunsuppressiva >3 Monate
<input type="checkbox"/>	Chemotherapie innerhalb der letzten 2 Monate
<input type="checkbox"/>	Aktive chron. rheumatoid-entzündliche Erkrankung
<input type="checkbox"/>	Aktueller Drogenabusus
<input type="checkbox"/>	Leberzirrhose
<input type="checkbox"/>	vorbestehende chronische dialysepflichtige Niereninsuffizienz
Diabetesgruppe:	<input type="checkbox"/> Sepsis/septisches Schockgeschehen
Kontrollgruppe:	<input type="checkbox"/> Sepsis/septisches Schockgeschehen
	<input type="checkbox"/> T2DM/MeSy

Anamnesebogen INSIGHT-Studie

Datum:	Pseudonymisierung: xxx_x_x
Gruppe:	x1=erster Buchstabe des Vornamens x2= zweiter Buchstabe des Familiennamens x3= zweite Ziffer des Geburtstages x4= zweite Ziffer des Geburtsmonats x5=Patientengruppe (K=Kontrolle, D=DM/MeSy, S=Sepsis)
Allgemeine Patientendaten	
Alter: _____	Körpergröße [m]: _____
Geschlecht: _____	Gewicht [kg]: _____
<input type="checkbox"/> bekannter Diabetes mellitus Typ II	
Operationsindikation:	
<input type="checkbox"/> Erhalt von Blutprodukten in den letzten 6 Monaten	
Kreislaufparameter	
HF [1/min]: _____	RR _{sys} [mmHg]: _____
	RR _{diast} [mmHg]: _____
Medikamenten und Krankheitsanamnese	
aktuelle Medikamenteneinnahmen	
1.	11.
2.	12.
3.	13.
4.	14.
5.	15.
6.	16.
7.	17.
8.	18.
9.	19.
10.	20.

Anamnesebogen INSIGHT-Studie

Pseudonym: _____	
aktuelle Erkrankungen 1. _____ 2. _____ 3. _____ 4. _____ 5. _____ 6. _____ 7. _____ 8. _____ 9. _____ 10. _____	vorherige Erkrankungen 1. _____ 2. _____ 3. _____ 4. _____ 5. _____ 6. _____ 7. _____ 8. _____ 9. _____ 10. _____
<u>Alkoholkonsum</u> Anzahl der konsumierten Drinks in der Woche: _____ Ein Drink entspricht einer Flasche Bier, einem Glas Wein oder einem Glas Schnaps (2cl)	
<u>Tallenumfang(cm):</u> _____	
<u>Hautfaltenmessung</u> Trizeps: 1. _____ 2. _____ 3. _____ M _____ Rücken: 1. _____ 2. _____ 3. _____ M _____ Hüfte: 1. _____ 2. _____ 3. _____ M _____	

Anamnesebogen INSIGHT-Studie

<u>Zusatzblatt für Sepsispatienten</u>	
	<u>Pseudonym:</u>
Scores	
APACHE II	_____
SAPS II	_____
SOFA	respiratorisch: _____
	Nervensystem: _____
	Kardiovaskulär: _____
	Leber: _____
	Gerinnung: _____
	Niere: _____
	Σ = _____
Infektionsfokus:	
<input type="checkbox"/> Lunge	<input type="checkbox"/> Abdomen
<input type="checkbox"/> Knochen oder Weichgewebe	<input type="checkbox"/> Operationswunde
<input type="checkbox"/> Urogenitaltrakt	<input type="checkbox"/> Primäre Bakteriämie
<input type="checkbox"/> Andere	
Spezielle Therapieverfahren:	
<input type="checkbox"/> Insulintherapie	
Hämodynamik	
Herzfrequenz [1/min]: _____	MAP [mmHg]: _____
ZVD [mmHg]: _____	zentralvenöse O ₂ Sättigung [%]: _____
Laborparameter:	
Plasmaglukose: _____	HbA1c [%Hb]: _____
CRP: _____	Serumkreatinin: _____
Laktat: _____	

8.3 Vergleich der OP-Indikationen

Tabelle 15: Vergleich der OP-Indikationen zwischen den Studiengruppen der INSIGHT-Kohorte

	Kontrolle	T2D	Sepsis	p-Wert
Leberresektion				
Benigne Lebererkrankung	4	1	-	
Primäres hepatisches oder biliäres Malignom	1	6	-	
Sekundäres hepatisches Malignom	6	5	-	0,432*
Gastrointestinale (GI) Chirurgie				
Benigne GI-Erkrankung	2	3	-	
GI-Malignom	3	3	-	
Pankreaschirurgie				
Pankreaskarzinom	1	2	-	
Septische Operationen				
GI-Anastomoseninsuffizienz	-	-	2	
GI-Perforation	-	-	3	
GI-Ischämie	-	-	1	
Pankreasanastomoseninsuffizienz	-	-	3	-
Nekrotisierende Pankreatitis	-	-	1	
Abszess	-	-	1	
Fistel	-	-	1	

* χ^2 -Test

8.4 Geschlechtsunterschied Sepsispatienten

Tabelle 16: Demographische und klinische Charakteristika der INSIGHT-Studiengruppe, getrennt nach Geschlecht

	Männer	Frauen	p-Wert
N	8	6	-
Alter [a]	64±3	75±4	0,051 ^a
BMI [kg/m ²]	28,1±1,4	29,9±2,0	0,793 ^a
CRP [mg/dL]	233,8±32,1	180,9±43,0	0,213 ^a
Kreatinin [μmol/L]	247,6±49,4	173,0±37,7	0,268 ^a
Leukozyten [x10 ³ /μL]	20.1±2,5	13.3±1,5	0,071 ^a
HbA1c [%]	5.9±0,4	6±0,6	0,679 ^a
Nüchtern-Glukose [mmol/l]	6,5±0,4	5,3±1,0	0,311 ^a
HOMA IR [AU]	5,4±2,2	3,6±1,6	0,654 ^a
APACHEII [AU]	22,5 [7,5-29,25]	18,5 [15,75-21,75]	0,606 ^b

^a ungepaarter zweiseitiger t-test; ^b Mann-Whitney-U-Test

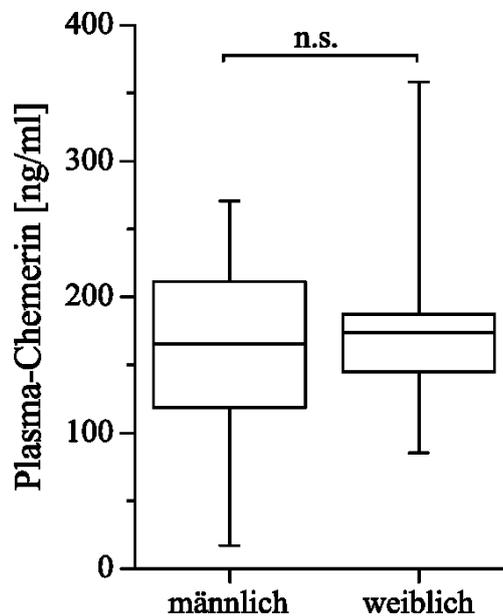


Abbildung 37: Dargestellt ist der Vergleich der Plasma-Chemerinspiegel zwischen männlichen (n=24) und weiblichen (n=13) Sepsispatienten der HMOX-Studiengruppe. Es konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (p=0,394). n.s. = nicht signifikant; ungepaarter zweiseitiger t-Test

8.5 Grenzwerte Perzentilenanalysen

Tabelle 17: Grenzwerte für die Perzentilenanalysen unter 4.5 und 4.7

	Kontrolle	T2D	Sepsis
CRP [mg/l]	2,0	2,0	229,5
Nüchtern glukose [mmol/l]	5,15	7,95	5,65
BMI [kg/m ²]	23,0	28,9	30,1
HOMA-IR [AU]	1,35	3,00	2,86

8.6 Assoziation mit SAPS und SOFA

Tabelle 18: Nicht-parametrische Korrelation von SOFA und SAPS II mit dem zirkulierenden Chemerin in der ersten Studienkohorte (Spearman

	R	p
SOFA	0,253	0,453
SAPS II	0,305	0,361

9. Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die durch praktische Hilfe, gegenseitigen Austausch oder auch durch Gelingen eines angenehmen Arbeitsklimas beteiligt waren, herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Christian von Loeffelholz für die Initiierung der INSIGHT-Studie und die Mitentwicklung des Promotionsthemas. Als Ansprechpartner war er immer verfügbar und hat mich bei allen meinen Anstrengungen stets bestens unterstützt.

Prof. Dr. Ralf A. Claus möchte ich meinen herzlichen Dank für die Betreuung meiner Promotion aussprechen. Immer mit einem offenen Ohr, hat er durch konstruktive Kritik und methodische Hilfestellungen entscheidend zum Gelingen des Projektes beigetragen.

Für die ausführliche Beratung, ohne die die histologische Auswertung in dieser Form nicht zustande gekommen wäre, möchte ich mich bei PD Dr. Bernd Romeike bedanken. Mein großer Dank gilt auch den MTAs des Labors Immunpathologie für die Anfertigung der immunhistochemischen Präparate.

Außerdem danke ich Frau Barbara Schaller für die Fortführung der Probensammlung und Herrn Ricardo Steidl für die Hilfe bei den tierexperimentellen Untersuchungen. Dr. Christoph Sponholz möchte ich für die Bereitstellung der HMOX-Studiendaten und -Proben danken. Prof. Andreas Birkenfeld gilt mein Dank für die Bereitstellung der humanen Chemerin-ELISAs.

Frau Katrin Ludewig und Herrn PD Dr. Falk Rauchfuß danke ich für die Hilfe bei der praktischen Umsetzung der Studie. Ebenso möchte ich allen weiteren Mitarbeitern der AVGC, der KAI und des Zentral-OP des Universitätsklinikums Jena für die Unterstützung bei der Probensammlung danken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG MMOF/Experimentelle Anästhesie für das sehr nette und freundliche Arbeitsklima, die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit sowie für die vielen Erklärungen und das Zeigen unterschiedlicher Arbeitstechniken bedanken. Ein besonderer Dank gilt hier Frau Brigitte Specht für die stets kompetente Unterstützung bei den histologischen Arbeiten sowie Frau Esther Fröhlich und Frau Elisa Jentho für die Hilfe in der Zellkultur und die Bereitstellung von Probenmaterial.

Bedanken möchte ich mich nicht zuletzt auch beim Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), das mir durch die Gewährung eines Promotionsstipendiums erst die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

10. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Prof Dr. rer. nat. med. habil. Ralf Alexander Claus
- Dr. med. Dipl. troph. Christian von Loeffelholz

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers