

Aus der I. Medizinischen Klinik  
der Medizinischen Fakultät Mannheim  
(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Borggrefe)

Diagnostischer Nutzen eines *Oligonucleotide-Enzyme-Capture-Assay*-  
basierten Testverfahrens zur Bestimmung von aktiviertem Protein C im  
septischen Schock

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der  
Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität  
zu  
Heidelberg

vorgelegt von  
Katharina Bosch

aus  
Mannheim  
2021

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd  
Referent: Prof. Dr. med. Ibrahim Akin

Meinen Eltern

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	1
1 EINLEITUNG .....	6
1.1 Die zelluläre Gerinnung .....	8
1.2 Plasmatische Gerinnung und Fibrinolyse .....	10
1.3 Das Protein C/S-System.....	14
1.4 Parameter zur Charakterisierung der Gerinnung.....	16
1.5 Der septische Schock.....	18
1.6 Biomarker im Rahmen des septischen Schocks .....	21
1.7 APC und Sepsis .....	23
1.8 Messmethoden von APC .....	26
1.9 Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	27
2 STUDIENPOPULATION, MATERIAL UND METHODEN .....	28
2.1 Studiendesign und Studienkollektiv .....	28
2.2 Studienablauf .....	29
2.2.1 Basisdaten.....	31
2.2.2 DIC, APACHE II, SAPS II und SOFA Score .....	32
2.3 Bestimmung der Biomarker .....	33
2.3.1 Bestimmung etablierter Gerinnungsparameter .....	33
2.3.2 Bestimmung von aktiviertem Protein C.....	34
2.4 Statistische Analyse .....	36

3	ERGEBNISSE .....	37
3.1	Patientenpopulation und Basisdaten .....	37
3.1.1	Klinische Parameter bei Aufnahme auf die Intensivstation .....	38
3.1.2	Basislabor Parameter .....	41
3.2	Gerinnungsparameter.....	43
3.2.1	Zeitlicher Verlauf der Gerinnungsparameter in der Gesamtpopulation .....	43
3.2.2	Zeitlicher Verlauf der Gerinnungsparameter im Vergleich Überlebende versus Verstorbene .....	50
3.3	Aktiviertes Protein C .....	57
3.3.1	Zeitlicher Verlauf von APC in der Gesamtpopulation.....	58
3.3.2	Zeitlicher Verlauf von APC im Vergleich Überlebende versus Verstorbene .....	59
3.4	Korrelation der Parameter .....	60
3.5	APC und Mortalität .....	61
4	DISKUSSION .....	65
4.1	Diskussion der Testmethode .....	65
4.2	Diskussion der Ergebnisse .....	68
4.2.1	Primärer Endpunkt.....	68
4.2.2	Sekundärer Endpunkt.....	70
4.3	Limitationen .....	72
4.4	Implikationen für die klinische Praxis.....	73
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	74

6 LITERATURVERZEICHNIS.....	75
7 TABELLARISCHER ANHANG.....	83
7.1 Anhang Ethikvotum .....	83
7.2 Anhang DIC Score.....	85
7.3 Anhang SOFA Score .....	87
7.4 Anhang APACHE II Score .....	88
7.5 Anhang SAPS II Score .....	89
7.6 Anhang Glasgow Coma Scale.....	91
8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	92
9 TABELLENVERZEICHNIS .....	94
10 EIGENANTEIL UND EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN.....	95
11 LEBENSLAUF .....	96
12 DANKSAGUNG .....	97

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACCP	<i>American College of Chest Physicians</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
APACHE	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i>
APC	aktiviertes Protein C
AUC	<i>area under the curve</i> Fläche unter der Kurve
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
DIC	<i>disseminated intravascular coagulation</i> disseminierte intravasale Koagulopathie
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> Desoxyribonukleinsäure
ECA	<i>Enzyme Capture Assay</i>
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>

EPCR	endothelialer Protein C-Rezeptor
F 1+2	Prothrombinfragmente 1 und 2
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i> Glasgow-Koma-Skala
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GP	Glykoprotein
IL	Interleukin
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
IQR	<i>interquartil range</i> Interquartilsabstand
ISTH	<i>International Society of Thrombosis and Haemostasis</i>
KI	Konfidenzintervall
LOQ	<i>limit of quantification</i> Bestimmungsgrenze
LOD	<i>limit of detection</i> Nachweisgrenze
MODS	<i>multi organ dysfunction syndrome</i> Multiorganversagen
n	Anzahl
NFkB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>



OECA	<i>Oligonucleotide Enzyme Capture Assay</i>
OR	<i>Odds Ratio</i> Quotenverhältnis
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ1
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i> Pathogen-assoziierte molekulare Muster
pAPC	<i>plasma derived activated protein C</i> aus Plasma gewonnenes aktiviertes Protein C
PAR-1	Protease-aktivierter Rezeptor-1
PC	Protein C
PCI	<i>protein C inhibitor</i> Protein C Inhibitor
PCT	Procalcitonin
PL	Phospholipid
PROWESS	<i>Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis</i>
PS	Protein S
PTT	<i>partial thromboplastin time</i> partielle Thromboplastinzeit

qSOFA	<i>quick Sequential Organ Failure Assessment</i>
rAPC	rekombinantes aktiviertes Protein C
RNA	<i>ribonucleic acid</i> Ribonukleinsäure
ROC	<i>receiver operating characteristics</i> Grenzwertoptimierungskurve
SAPS	<i>Simplified Acute Physiology Score</i>
SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SepNet	Kompetenznetz Sepsis
SIRS	systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
ssDNA	<i>single-stranded deoxyribonucleic acid</i> einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
TAT	Thrombin-Antithrombin-Komplex
TF	<i>tissue factor</i> Gewebethromboplastin
TFPI	<i>tissue factor pathway inhibitor</i> Inhibitor des Gewebethromboplastin Weges
TK	Thrombozytenkonzentrat
TM	Thrombomodulin

TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
t-PA	<i>tissue plasminogen activator</i> gewebespezifischer Plasminogenaktivator
TXA2	Thromboxan A2
vWF	von-Willebrand-Faktor
vWR	von-Willebrand-Rezeptor
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1 EINLEITUNG

Die Sepsis ist eine komplexe systemische Reaktion des Immunsystems auf ein Pathogen. Nach einer im Jahr 2011 initiierten Studie des *Center for Sepsis Control and Care* in Jena wurden die epidemiologischen Daten zur Sepsis in Deutschland ermittelt (Heublein et al., 2013). Die Inzidenz der Sepsis liegt bei 106/100.000 Einwohnern, für die schwere Sepsis bei 84/100.000 Einwohnern, sowie bei 23/100.000 Einwohnern für den *septischen Schock*. Mit zunehmender Schwere der Erkrankung steigt die Krankenhaussterblichkeitsrate und beträgt 10,5% für die Sepsis, 42,8% für die schwere Sepsis und 60,5% für den *septischen Schock*. Die Sepsis stellt mit jährlich ca. 50.000 Todesfällen in Deutschland somit die dritthäufigste Todesursache dar (Heublein et al., 2013).

Ein maßgeblicher Bestandteil der Pathophysiologie des *septischen Schocks* ist die unregulierte Aktivierung der Blutgerinnung. Die disseminierte intravasale Koagulopathie (*disseminated intravascular coagulation*, DIC) ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen einer Sepsis. Diese ist gekennzeichnet durch die systemische, intravasale Aktivierung der Gerinnungskaskade und entwickelt sich bei circa 35% aller Patienten mit *septischem Schock* (Levi and van der Poll, 2017; Okamoto et al., 2016). Hierbei kommt es zur Störung der physiologischen Balance zwischen pro- und antikoagulatorischen Prozessen.

Die Ursache dafür liegt zum einen in einer, durch die Sepsis induzierten, gesteigerten Expression von Gewebethromboplastin (*tissue factor*, TF) in Endothelzellen und Monozyten, zum anderen in der durch Zytokine beeinflussten Interaktion von Inflammation und Koagulation (Mosnier et al., 2007). Hierbei wird zum einen das Gerinnungssystem durch die systemische Inflammation im Rahmen der Sepsis aktiviert, andererseits wird die Aktivität der Inflammation durch die Gerinnung beeinflusst (Levi et al., 2004). Diese Wechselwirkung trägt zu einer unregulierten systemischen Gerinnungsaktivierung und gesteigerten Thrombingenerierung bei. Gleichzeitig versagen im septischen Geschehen die physiologischen antikoagulatorischen Prozesse (u.a. Antithrombin, der Inhibitor des Gewebethromboplastin Weges (*tissue factor pathway inhibitor*, TFPI) und das Protein C/S-System), die eine überschießende Gerinnung verhindern (Levi and van der Poll, 2017). Dies kann in einer diffusen, intravasalen Aktivierung des Gerinnungssystems

mit katastrophalen Folgen für die Mikrozirkulation münden. Hierbei werden durch die Aktivierung des Gerinnungssystems einerseits große Mengen an Gerinnungsfaktoren verbraucht, was zu einer Verbrauchskoagulopathie führen kann, die mit einem erhöhten Blutungsrisiko einhergeht (Hardaway and Vasquez, 2001; Taylor et al., 2001). Andererseits entstehen durch die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren Mikrothromben, die zu Embolien, Gefäßverschlüssen und daraus resultierend zur Gewebehypoxie führen können (Simmons and Pittet, 2015).

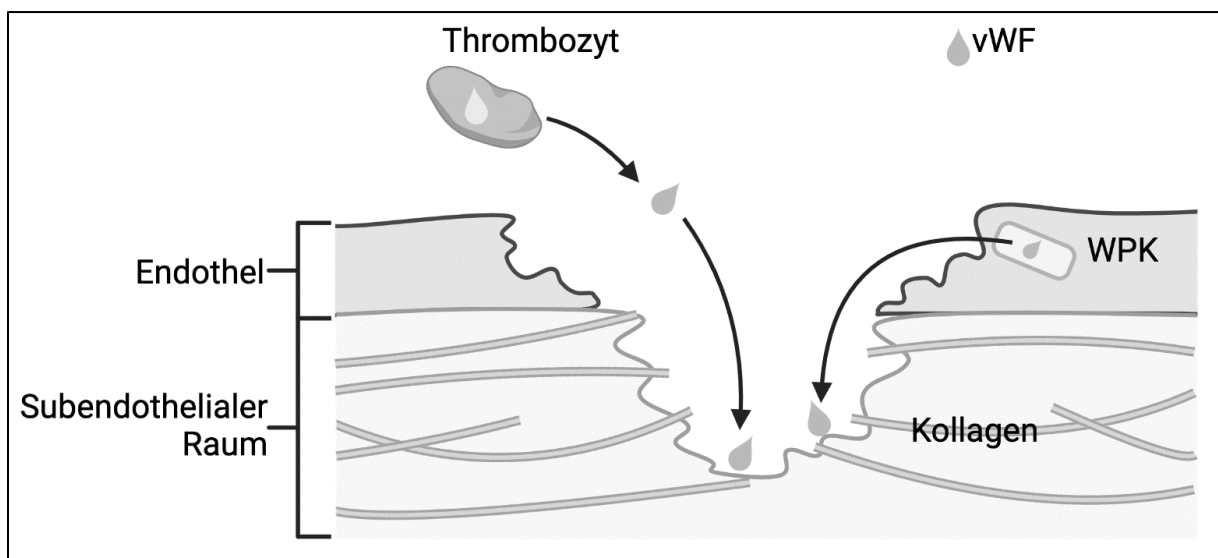
Das Protein C/S-System spielt im Rahmen des Gerinnungssystems eine wichtige, allgemein protektive Rolle. Unter physiologischen Bedingungen hat das Protein C/S-System neben seiner antikoagulatorischen auch anti-inflammatorische und anti-apoptotische Eigenschaften (Mosnier et al., 2007). Protein C (PC) wird durch den Thrombomodulin-Thrombin-Komplex nach Bindung an den endothelialen Protein C-Rezeptor (EPCR) aktiviert (Xu et al., 1999). Die antikoagulatorische Funktion von aktiviertem Protein C (APC) wird mit Hilfe des Cofaktors Protein S (PS) durch die Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa ausgeübt. Hierdurch wird eine überschießende Thrombinbildung verhindert.

Das Protein C/S-System nimmt im Rahmen der Sepsis und des *septischen Schocks* eine wichtige Schnittstelle zwischen Entzündungsreaktion und Gerinnungssystem ein (Levi and van der Poll, 2017). Es wird dabei allgemein angenommen, dass APC im Rahmen der Sepsis vermindert ist (Faust et al., 2001; Yan and Dhainaut, 2001). Als Ursache dafür gilt u.a. eine durch Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) hervorgerufene, reduzierte Thrombomodulin (TM)-Expression auf Endothelzellen (Moore et al., 1987, 1989). Geeignete Messverfahren, die eine Charakterisierung von APC im Verlauf der Sepsis und des *septischen Schocks* ermöglichen, sind aktuell jedoch nur bedingt vorhanden. Dies liegt vor allem an der schnellen Inaktivierung von APC sowie an den hohen Plasma-Konzentrationen des Zymogens PC im Vergleich zu APC.

## 1.1 Die zelluläre Gerinnung

Die Blutgerinnung basiert auf zwei eng miteinander abgestimmten Systemen: der primären, zellulären Hämostase sowie der sekundären, plasmatischen Hämostase. Die primäre, zelluläre (oder auch thrombozytäre) Hämostase ist gekennzeichnet durch mehrere sequenzielle Prozesse, an deren Ende die Entstehung eines weißen, Thrombozyten-reichen Thrombus steht.

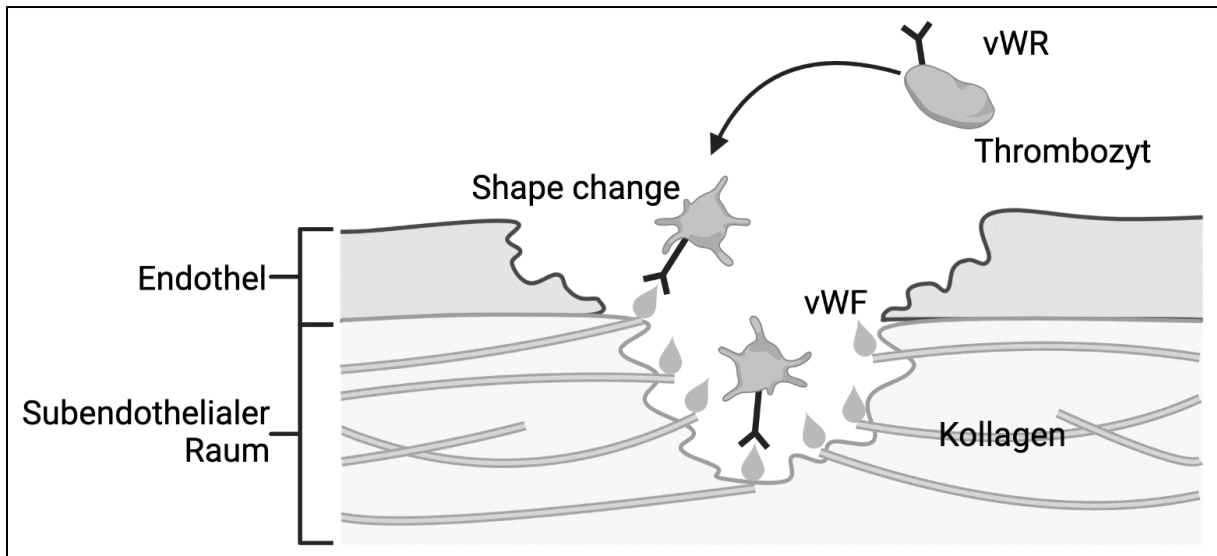
Die **Initiation** der zellulären Gerinnung geht von einer Verletzung der Gefäßwand mit begleitendem Endothelschaden aus. Hierbei kommt es zur Freisetzung von endothelialen Bindegewebsproteinen, v.a. Kollagen (Brass, 2003). In der Folge kommt es zur Freisetzung des von-Willebrand-Faktors (vWF) aus den alpha-Granula der Thrombozyten und den endothelialen Weibel-Palade-Körperchen (Dole et al., 2005). Der im Blut zirkulierende vWF bindet nun an freigelegtes subendotheliales Kollagen (siehe **Abbildung 1**).



**Abbildung 1:** Die primäre Hämostase: Initiation, modifiziert nach (Jurk and Kehrel, 2005)

*vWF, von-Willebrand-Faktor; WPK, Weibel-Palade-Körperchen*

In einem nächsten Schritt findet die **Adhäsion** der Thrombozyten an subendotheliales Kollagen statt. Mit Hilfe ihres von-Willebrand-Rezeptors (vWR) können diese an den kollagengebundenen vWF binden. Die Bindung des vWF an den vWR führt schließlich zur Bedeckung des Endothelschadens durch die Thrombozyten, sowie zu einer Veränderung ihrer Form (*shape change*) (Jurk and Kehrel, 2005) (siehe **Abbildung 2**).



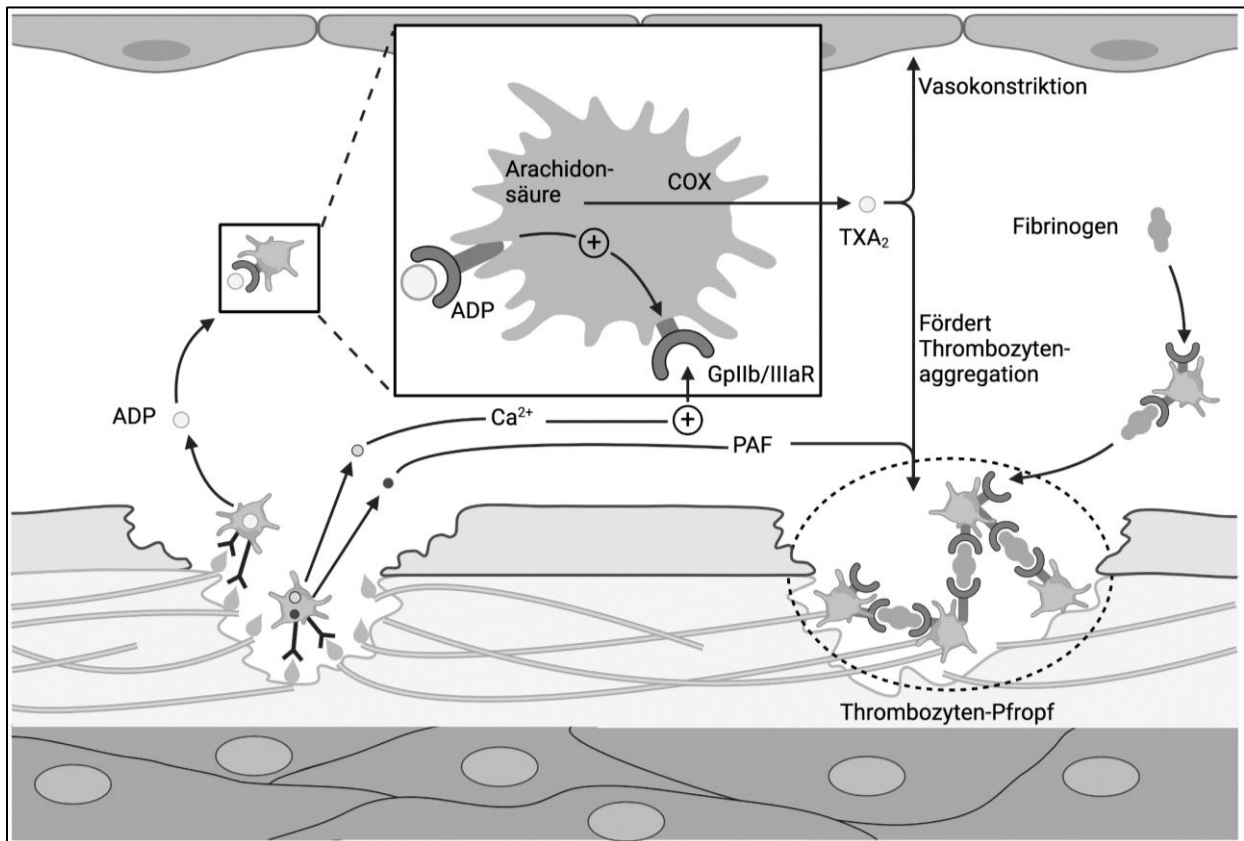
**Abbildung 2:** Die primäre Hämostase: Adhäsion, modifiziert nach (Jurk and Kehrel, 2005)

*vWF, von-Willebrand-Faktor; vWR, von-Willebrand-Rezeptor*

Mit der Formänderung geht gleichzeitig die **Aktivierung** der Thrombozyten einher, wodurch diese Mediatorstoffe aus ihren präformierten Granula freisetzen. Adenosindiphosphat (ADP), Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und Plättchenaktivierender Faktor (PAF) werden sezerniert. Das freigesetzte ADP bindet an ADP-Rezeptoren weiterer Thrombozyten, wodurch es zu deren Aktivierung und zur Ausbildung von Pseudopodien kommt (Li et al., 2010). Ebenso wird Cyclooxygenase (COX) stimuliert, wodurch die Thromboxan-A2 ( $\text{TXA}_2$ )-Synthese ansteigt und es zur Vasokonstriktion kommt (Vanhoutte, 1988). Die aktivierten Thrombozyten verursachen durch die freigesetzten Mediatoren die Aktivierung weiterer Thrombozyten (positiver Feedback-Mechanismus). Thrombozyten haften ausschließlich an geschädigtem Endothel. Damit keine Thrombozytenaktivierung an unbeschädigtem Endothel stattfindet, sezerniert dieses ständig Stickstoffmonoxid, sowie Prostacyclin (Brass, 2003). Ebenso besitzt das intakte Endothel keine thrombozytenbindenden Rezeptoren.

Die **Aggregation** der Thrombozyten wird durch eine Konformationsänderung des Glykoprotein-(GP)-IIb/IIIa-Rezeptors auf der Thrombozytenmembran ermöglicht. Dadurch kann zirkulierendes Fibrinogen aus dem Blutplasma am Rezeptor gebunden werden und es bildet sich ein Netzwerk, in dem Thrombozyten durch Fibrinogen-Brücken verbunden sind (Ruggeri and Mendolicchio, 2007). Dies wird über das bereits sezernierte  $\text{TXA}_2$ , sowie über PAF verstärkt. So entsteht ein dichter Thrombozyten-

Pfropf, der sog. „weiße Thrombus“, welcher noch instabil ist und an der Schließung des Endotheldefektes beteiligt ist (Brass, 2003) (siehe **Abbildung 3**).



**Abbildung 3:** Die primäre Hämostase: Aktivierung und Aggregation, modifiziert nach (Jurk and Kehrel, 2005)

ADP, Adenosindiphosphat; COX, Cyclooxygenase;  $Ca^{2+}$ , Calcium-Ion; GpIIb/IIIaR, Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor; PAF, Plättchenaktivierender Faktor; TXA<sub>2</sub>, Thromboxan A<sub>2</sub>

## 1.2 Plasmatische Gerinnung und Fibrinolyse

Die sekundäre, plasmatische Gerinnung ist gekennzeichnet durch die kaskadenartige Aktivierung von Gerinnungsfaktoren. Dabei werden inaktive Proenzyme in aktive Enzyme umgewandelt, welche in der proteolytischen Spaltung von Prothrombin zu Thrombin und folglich in der Umwandlung von Fibrinogen zu unlöslichem Fibrin enden (Pötzsch and Madlener, 2010). Eine Übersicht der Gerinnungsfaktoren ist in **Tabelle 1** zu finden. Die plasmatische Gerinnung setzt sich aus dem intrinsischen und dem extrinsischen Weg zusammen, welche unterschiedlich aktiviert werden können.



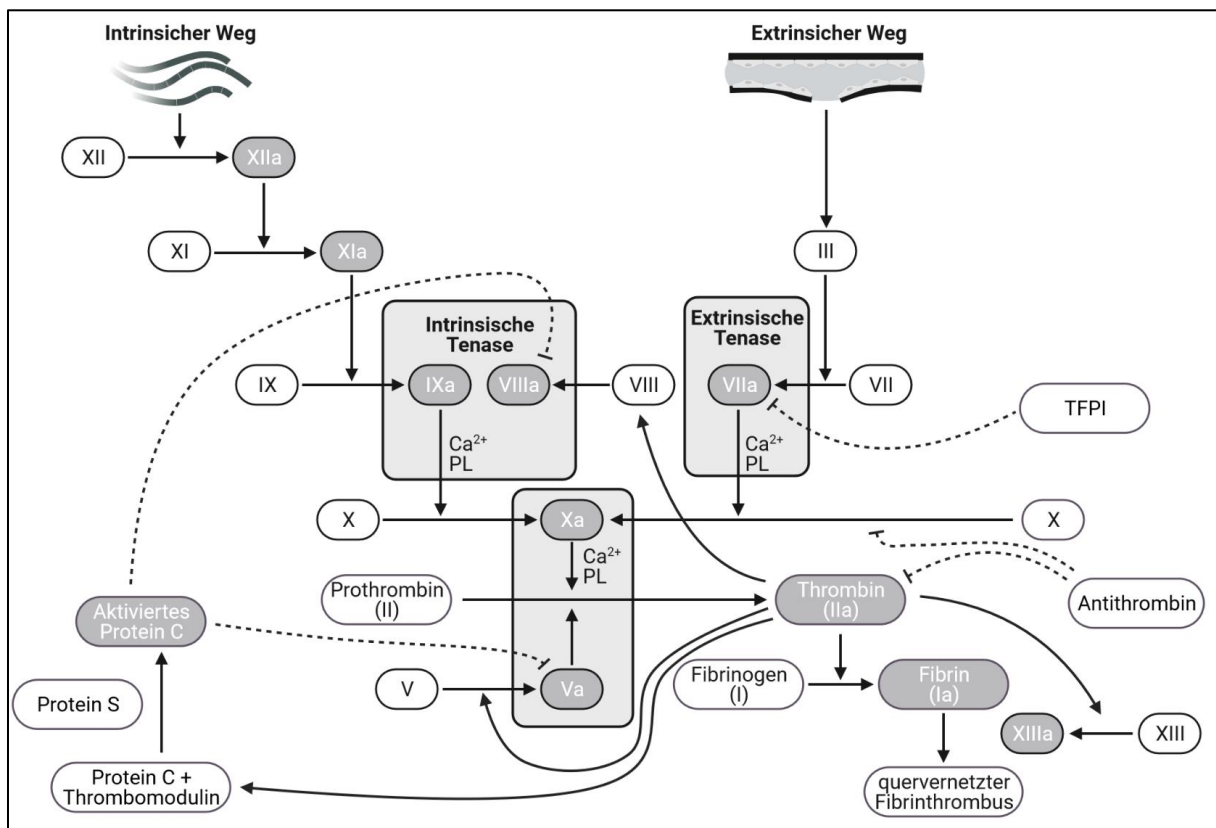
**Tabelle 1: Die Gerinnungsfaktoren** (Pötzsch and Madlener, 2010)*a, aktiviert; Ca<sup>2+</sup>, Calcium-Ion; TF, tissue factor*

Faktor I	Fibrinogen
Faktor Ia	Fibrin
Faktor II	Prothrombin
Faktor IIa	Thrombin
Faktor III	TF
Faktor IV	Ca <sup>2+</sup>
Faktor V	Akzeleratorglobulin
Faktor VII	Prokonvertin
Faktor VIII	Antihämophiles Globulin A
Faktor IX	antihämophiles Globulin B, Christmas-Faktor
Faktor X	Stuart-Prower-Faktor
Faktor XI	Rosenthal-Faktor
Faktor XII	Hageman-Faktor
Faktor XIII	Fibrin-stabilisierender Faktor

Die Aktivierung des **intrinsischen Systems** erfolgt über den Kontakt von Faktor XII mit negativ geladenen Oberflächen, Kollagen und Kallikrein (Schmaier, 2008). Hierbei wird aus Faktor XII der aktivierte Faktor XIIa. Dieser aktiviert zusammen mit Thrombin (Faktor IIa) den Faktor XI zu XIa. Es kommt in der Folge zur weiteren Aktivierung von Faktor IX durch den Faktor XIa. Parallel wird Faktor VIII durch Thrombin zu Faktor VIIIa aktiviert. Als Folge entsteht als Enzym-Komplex die intrinsische Tenase, bestehend aus den Faktoren IXa und VIIIa zusammen mit Phospholipiden (PL) und Ca<sup>2+</sup>. Dieser Enzymkomplex aktiviert im Anschluss den Faktor X (Kalafatis et al., 1997).

Die Aktivierung des **extrinsischen Systems** erfolgt durch, aus einer Gewebeerletzung freigesetzten, TF (Faktor III) (Butenas et al., 2002). Dieser aktiviert gemeinsam mit Ca<sup>2+</sup> den Faktor VII. Aktivierter Faktor VIIa bildet daraufhin zusammen mit Faktor III, PL und Ca<sup>2+</sup> einen Enzym-Komplex, die extrinsische Tenase. Die gemeinsame Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Weges startet durch die Aktivierung von Faktor X durch die intrinsische und extrinsische Tenase (Kalafatis et al., 1997). Zusätzlich kommt es zur Aktivierung von Faktor V durch Thrombin. Die beiden aktivierten Faktoren Xa und Va bilden zusammen mit PL und Ca<sup>2+</sup> den Prothrombinase-Enzymkomplex. Dieser wandelt Prothrombin (Faktor II) in Thrombin (Faktor IIa) um. Es kommt zur Spaltung von Fibrinogen (Faktor I) in Fibrin (Faktor Ia)

durch Thrombin. Parallel aktiviert Thrombin den Faktor XIII zu Faktor XIIIa. Dieser sorgt für Quervernetzungen der Fibrinmonomere, wodurch ein unlöslicher Fibrinthrombus entsteht (Lord, 2011). Dieser festigt sich und es entsteht der rote Thrombus, der einen Endotheldefekt abdecken und so eine Blutung zum Stoppen bringen kann (siehe **Abbildung 4**).



**Abbildung 4:** Die Gerinnungskaskade, modifiziert nach (Bishop and Lawson, 2004)

Die römischen Ziffern I - XIII geben die einzelnen Gerinnungsfaktoren an; Pfeile bezeichnen aktivierende Interaktionen; gestrichelte Pfeile bezeichnen hemmende Interaktionen; a, aktiviert; Ca<sup>2+</sup>, Calcium-Ion; PL, Phospholipid; TFPI, tissue factor pathway inhibitor

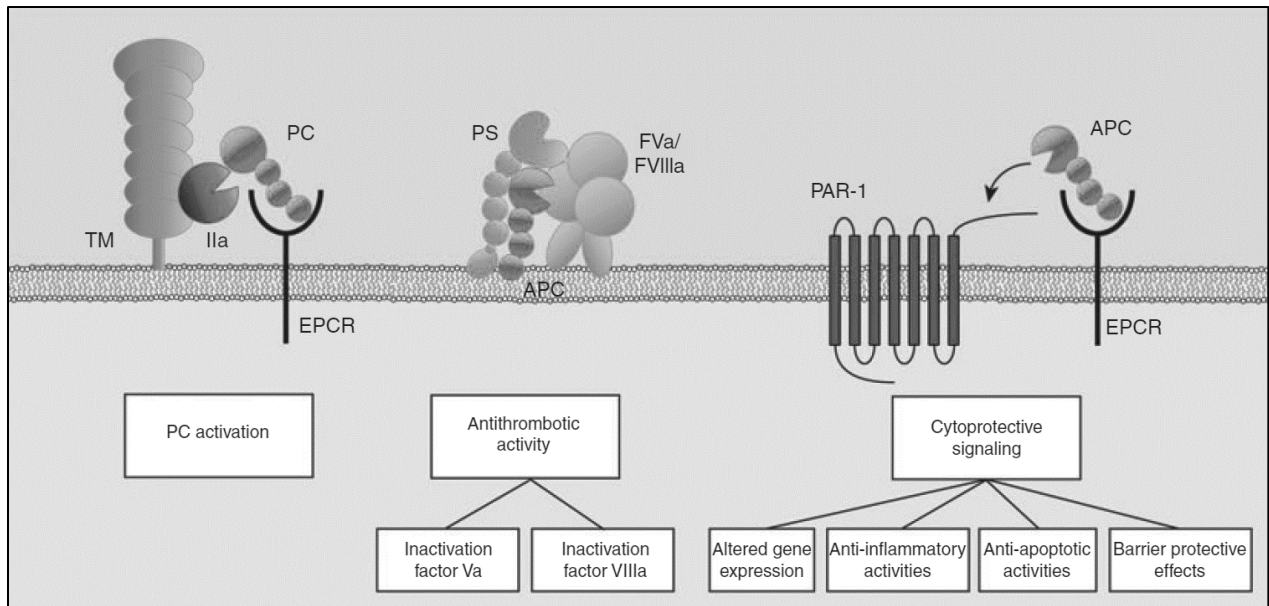
Die Blutgerinnung ist ein Prozess mit mehreren Kopplungsschleifen in einem gegenregulierenden System. Hierbei müssen im physiologischen Zustand Gerinnung und Gerinnungshemmung in Balance sein. Unter physiologischen Bedingungen ist die Aktivierung des Gerinnungssystems durch drei Systeme kontrolliert: Antithrombin, TFPI und das Protein C/S-System (Levi and van der Poll, 2017). Antithrombin spielt dabei die Hauptrolle der physiologischen Gerinnungshemmung (Mammen, 1998). Es hemmt Thrombin und Faktor X und somit die gesamte sekundäre Hämostase. Das TFPI-System hemmt den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade durch Inhibition des TF.

Die **Fibrinolyse**, der Abbau des Blutgerinnsels, startet nahezu gleichzeitig mit der Aktivierung der Gerinnungskaskade, um eine überschießende Gerinnung des Blutes zu verhindern und entstandene Blutgerinnsel abzubauen. Dabei werden enzymatische Prozesse in Gang gesetzt, die zum Abbau des Fibrinthrombus führen. Das im Blut zirkulierende Plasminogen wird hierbei durch spezifische Serinproteasen, sog. Plasminogenaktivatoren, wie Faktor XIIa, *tissue plasminogen activator* (t-PA) und Urokinase, in seine aktive Form, das Plasmin umgewandelt. Plasmin spaltet Fibrin wodurch lösliche Fibrinpeptide entstehen und das Blutgerinnsel abgebaut wird (Pötzsch and Madlener, 2010).

### 1.3 Das Protein C/S-System

Ein weiterer zentraler Bestandteil der endogenen Antikoagulation ist das Protein C/S-System. Es ist eines von drei endogenen Systemen (neben Antithrombin und TFPI), welches die Blutgerinnung inhibieren kann und daher eine bedeutende Rolle für die Balance der Hämostase spielt (Levi and van der Poll, 2017). Die physiologische Aktivierung von APC wird dabei durch die Interaktion zwischen Thrombin, TM, PC und EPCR reguliert (Bouwens et al., 2013) (siehe **Abbildung 5**).

Die Aktivierung des Protein C/S-Systems erfolgt durch Thrombin. Nach Bindung von Thrombin an das endothelständige TM kommt es zur Bildung des Thrombin-Thrombomodulin-Komplexes. Dieser bindet an den EPCR und aktiviert das Zymogen PC, woraufhin die Freisetzung von APC resultiert. Das endothelial freigesetzte APC ist für die antikoagulatorische Funktion zuständig. APC hemmt durch proteolytische Spaltung die Faktoren Va und VIIIa und inhibiert somit die weitere Thrombingenerierung. Beschleunigt wird diese proteolytische Spaltung durch den Cofaktor PS. APC wirkt somit im Sinne einer negativen Rückkopplung auf Thrombin. Gleichzeitig wirkt APC pro-fibrinolytisch, indem es den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) hemmt (Bouwens et al., 2013). Während das freigesetzte APC antikoagulatorische Funktionen wahrnimmt, ist das endothelial gebundene APC am EPCR für die zytoprotektiven Eigenschaften von APC verantwortlich. Hier kommt es durch eine Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptors-1 (PAR-1), einem G-Protein gekoppelten Rezeptor, zur Regulation verschiedener intrazellulärer Prozesse. So besitzt APC neben anti-inflammatorischen, auch anti-apoptische Eigenschaften, die Fähigkeit die Barrierefunktion des Endothels zu stabilisieren und die Genexpression zu regulieren (Bouwens et al., 2013). Bei der anti-inflammatorischen Funktion des APC spielt vor allem die Hemmung der TNF- $\alpha$  Synthese eine große Rolle, sowie die Unterdrückung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF $\kappa$ B). Dies bewirkt zum einen eine Hemmung der Zytokin-vermittelten Signalkaskaden und zum anderen eine Hemmung der TNF- $\alpha$ -abhängigen Induktion von Adhäsionsmolekülen. APC reguliert die damit verbundenen anti-apoptischen Genprodukte hoch und unterdrückt die proapoptische p53- und Bax-Expression (Mosnier et al., 2007).



**Abbildung 5:** Das Protein C/S-System, modifiziert nach (Bouwens et al., 2013)

*APC, aktiviertes Protein C; EPCR, endothelialer Protein C-Rezeptor; FVa/FVIIIa, aktivierter Faktor V und VIII; PAR-1, Protease-aktivierter Rezeptor 1; PC, Protein C; PS, Protein S; TM, Thrombomodulin; IIa, Faktor IIa (Thrombin)*

Die Bedeutung des PC-Systems für die Gerinnung lässt sich durch Störungen desselben verdeutlichen. Hierzu zählen der PC-Mangel, sowie die APC-Resistenz, bzw. die Faktor V-Leiden-Mutation.

Beim **PC-Mangel** kommt es aufgrund eines kongenitalen oder erworbenen Mangels an PC zu erhöhter Gerinnungsneigung. Ein homozygoter PC-Mangel führt durch intravaskuläre Thrombosierung der Mikrozirkulation zu ausgeprägter neonataler Purpura fulminans (Branson et al., 1983). Personen mit heterozygotem PC-Mangel haben ein ca. 7-fach höheres Risiko eine Venenthrombose zu entwickeln (Martinelli et al., 1998). Der kongenitale PC-Mangel ist ein selten vorkommender, jedoch starker Risikofaktor für venöse Thromboembolien. Dieser ist bei circa 2-5% der Patienten mit einer Venenthrombose ursächlich zu finden (Mateo et al., 1997). Der erworbene Protein-C-Mangel findet sich bei stark fortgeschrittenen Lebererkrankungen, schweren viralen oder bakteriellen Infektionen, Sepsis, DIC und Vitamin-K-Mangel.

Der **APC-Resistenz**, bzw. der **Faktor V-Leiden Mutation** liegt eine Punktmutation im Faktor-V-Gen zugrunde. Diese führt zu einer Unfähigkeit des Protein C/S-Komplexes den aktivierten Faktor Va zu binden. Hierdurch wird die Gerinnungshemmung inhibiert und es resultiert eine Thrombophilie bei den betroffenen Patienten. Heterozygote Träger weisen einen hyperkoagulativen Zustand auf, welcher mit einem circa 8-fach erhöhten Risiko für venöse Thrombosen verbunden ist. Das Risiko ist für homozygote Träger circa 80-fach erhöht (Koster et al., 1993).

#### 1.4 Parameter zur Charakterisierung der Gerinnung

Zur Charakterisierung der Gerinnung können globale Basisparameter von spezifischen Tests unterschieden werden. Teile der Basisdiagnostik stellen die Thrombozytenzahl sowie die globalen Gerinnungstests Quick-Wert (bzw. *International Normalized Ratio*, INR) und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (PTT) dar (Winter et al., 2017). Sie dienen zur Beurteilung des extrinsischen bzw. intrinsischen Gerinnungssystems und können zur Verlaufskontrolle bei prophylaktischer und therapeutischer Antikoagulation eingesetzt werden. Die Bestimmung der Thrombozytenzahl erlaubt eine orientierende Einteilung in Thrombozytopenie bzw. Thrombozytose, ohne Aussage über die Funktionsfähigkeit dieser treffen zu können. Dafür stehen Thrombozytenfunktionstests zur Verfügung.

Des Weiteren stehen diverse Biomarker, welche vor allem als Spaltprodukte im Rahmen der Gerinnungsaktivierung anfallen, zur Verfügung. Diese werden in der klinischen Routine seltener eingesetzt und dienen vor allem bei speziellen hämostaseologischen Fragestellungen als wertvolle Parameter. Die D-Dimere seien hier als wichtiger Parameter in der klinischen Routine bei vermuteten thromboembolischen Ereignissen genannt (Bates, 2012). Eine Übersicht der Parameter der Blutgerinnung liefert **Tabelle 2**.

**Tabelle 2: Parameter der Blutgerinnung (Pötzsch and Madlener, 2010)**

*F 1+2, Prothrombinfragmente 1 und 2; INR, International Normalized Ratio; PC-Aktivität, Protein C-Aktivität; PTT, partial thromboplastin time; TAT-Komplex, Thrombin-Antithrombin-Komplex*

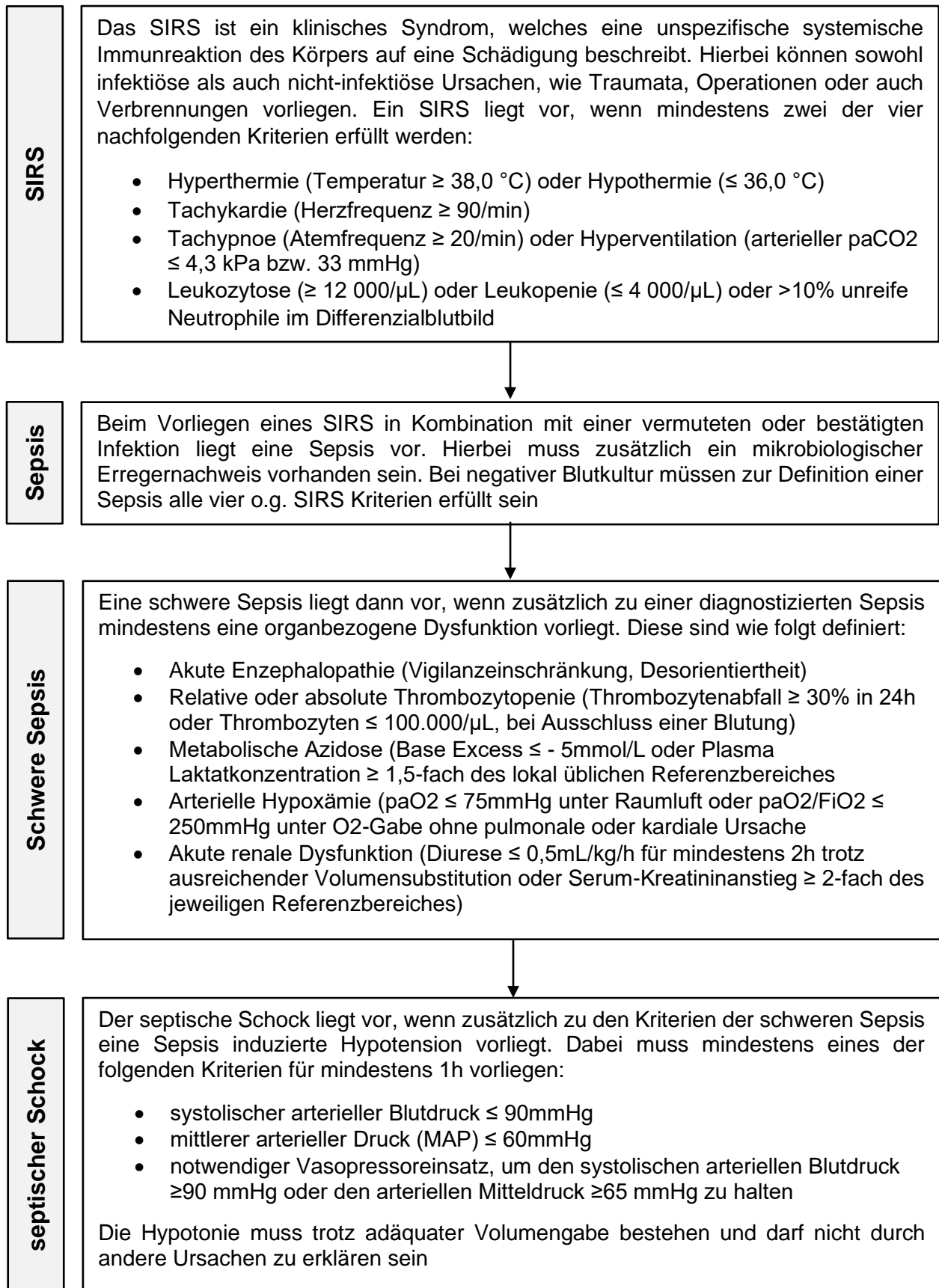
Parameter	Definition	Diagnostischer Nutzen	Referenzwert
<b>Quick-Wert</b>	= Thromboplastinzeit/ Prothrombinzeit (PTT)	Störungen des extrinsischen Signalweges	
	Dauer von Aktivierung des extrinsischen Systems bis Bildung eines Fibringerinnsels	Überwachung einer Therapie mit Vitamin K-Antagonisten	70-130 %
	Erfasst die Aktivität der Faktoren VII, X, V, II	Vitamin-K Mangel, schwere Lebererkrankungen	
<b>INR</b>	laborübergreifende Normierung des Quick Wertes	s. Quick	0,85-1,15
	INR von 1 = Quick-Wert 100%		
<b>PTT</b>	= partielle Thromboplastinzeit	Störungen des intrinsischen Signalweges	
	Dauer von Aktivierung des intrinsischen Systems bis Bildung eines Fibringerinnsels	Überwachung einer Therapie mit unfractioniertem Heparin	26,1-36,1 sec.
	Erfasst die Aktivität der Faktoren XII, XI, IX, VIII, X, V		
<b>Thrombozyten</b>	Kernlose Blutplättchen, welche die Hauptrolle in der zellulären Hämostase spielen	Orientierende Basisdiagnostik: Thrombophilie/ Thrombotyopenie	150- 400x10 <sup>9</sup> /l
	initialer Verschluss von Blutungsquellen, Thrombusbildung		
<b>TAT-Komplex</b>	= Thrombin-Antithrombin-Komplex	indirektes Maß der	< 3,9 ng/ml
	Entstehen bei der Inaktivierung von Thrombin durch Antithrombin	Thrombinbildung	
<b>F 1+2</b>	= Prothrombinfragment 1+2	direktes Maß der	< 0,34 nmol/l
	Entstehen bei der Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin	Thrombingenerierung	
<b>D-Dimere</b>	Fibrinspaltprodukte, die bei der Fibrinolyse entstehen	hoch sensitiv für Thromboembolien	< 0,5 mg/l
<b>PC-Aktivität</b>	= Protein C-Aktivität	PC-Mangel birgt erhöhtes	79-150 %
	Zymogen von APC	Thromboserisiko	
	Nach Aktivierung wichtiges endogenes Antikoagulanzen, durch Hemmung der Faktoren Va, VIIIa		

## 1.5 Der septische Schock

Die im Rahmen einer deutschlandweiten prospektiven Multicenter-Studie vom Kompetenznetzwerk Sepsis (SepNet) erhobene Prävalenz auf Intensivstationen betrug im Jahr 2003 12,4% für Sepsis und 11,0% für schwere Sepsis bzw. *septischen Schock* (Engel et al., 2007). Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten und der ständigen Weiterentwicklung bestehender Therapiekonzepte entwickeln weiterhin circa 25% der Patienten mit schwerer Sepsis im weiteren Verlauf einen *septischen Schock* (Whiles et al., 2017). Dieser geht mit einer Mortalität von bis zu 60,5% einher (Heublein et al., 2013).

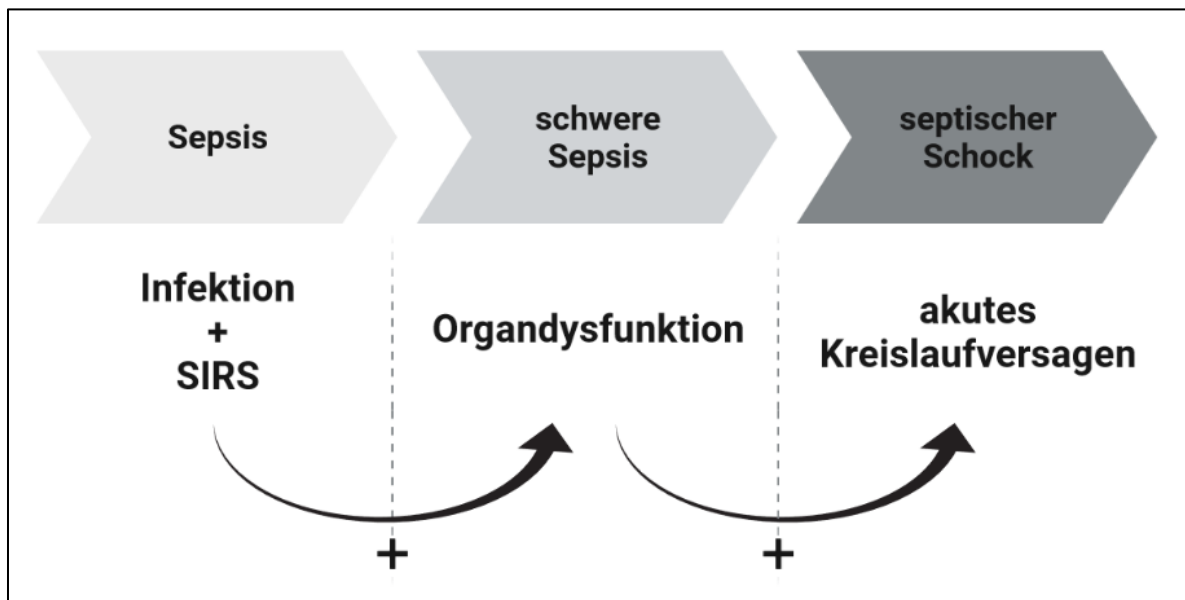
Die Sepsis ist Folge einer dysregulierten Immunantwort als Antwort auf eine Infektion (Singer et al., 2016). Als Auslöser kommen meist Bakterien, aber auch Viren, Pilze oder Parasiten in Betracht. Dabei entsteht aus einer dysregulierten Immunreaktion eine systemische Entzündungsreaktion, welche zu systemischen Schäden auch an fokussfernen Organen führen kann (Bauer u.a. 2006). Verantwortlich für die systemische Reaktion sind sog. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), welche Bestandteile des Erregers darstellen und eine Immunreaktion auslösen. Durch Aktivierung des Immunsystems kommt es zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1) und TNF- $\alpha$  (Schlegel u.a. 2014). Kaskadenartig werden dadurch weitere Zytokine wie IL-6 ausgeschüttet und das Komplementsystem aktiviert. Diese massive Aktivierung proinflammatorischer Prozesse führt zur systemischen Ausbreitung der initialen Infektion und kann zu Schäden an fokussfernen Organen führen. Der *septische Schock* stellt, wie auch das Multiorganversagen (*multi organ dysfunction syndrome*, MODS), eine schwerwiegende Komplikation bei Patienten mit Sepsis dar. Die Einteilung der Sepsis-Stadien angefangen vom Systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS)-Syndrom, Sepsis, schwere Sepsis bis zum *septischen Schock* wird in **Abbildung 6** und **Abbildung 7** dargestellt.





**Abbildung 6:** Das Sepsis Kontinuum nach S2-Leitlinie, modifiziert nach (Levy et al., 2003)

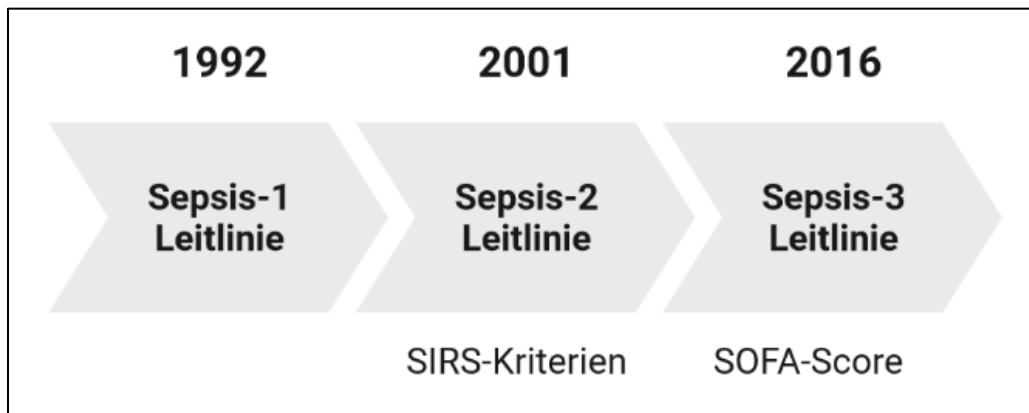
Im Jahr 1992 wurde von einer Expertenkommission erstmals eine einheitliche Definition der Sepsis (Sepsis-1) auf einer Konferenz des *American College of Chest Physicians* (ACCP) und der *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) vorgeschlagen (Bone et al., 1992). Diese wurde im Jahre 2001 auf der *International Sepsis Definitions Conference* in Washington D.C. überarbeitet (Levy et al., 2003). Hierbei entstand die Sepsis-2-Leitlinie. Die Definition und Einteilung der Sepsis in ihre Schweregrade erfolgt in dieser Arbeit nach der Sepsis-2-Leitlinie von 2001 (Levy et al., 2003). Dabei wird die Erkrankung in ihre Unterkategorien SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und *septischer Schock* eingeteilt, welche kontinuierlich ineinander übergehen können (siehe **Abbildung 6** und **Abbildung 7**).



**Abbildung 7:** Die Stadien der Sepsis, modifiziert nach (Jawad et al., 2012)

Im Jahr 2016 wurde eine neue Sepsis Leitlinie (Sepsis-3) veröffentlicht (Singer et al., 2016). Die Sepsis wird aktuell als „lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer fehlregulierten Körperantwort auf eine Infektion“ definiert. Hierbei rückt die Organdysfunktion mehr in den Fokus. Entscheidend ist nun nicht mehr die Erfüllung der SIRS-Kriterien, aufgrund ihrer geringen Spezifität, sondern die Erfüllung der *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA)-Score Kriterien. Eine Sepsis liegt nun vor, wenn sich der SOFA-Score akut um mindestens zwei Punkte verschlechtert. Als Screening Methode wurde hierzu der *quick SOFA-Score* (qSOFA) eingeführt, um eine

schnelle Diagnostik im klinischen Alltag zu ermöglichen. Eine Übersicht über die historische Entwicklung der Sepsis Leitlinien bietet **Abbildung 8**.



**Abbildung 8:** Die zeitliche Entwicklung der Sepsis Leitlinien, eigene Abbildung

### 1.6 Biomarker im Rahmen des septischen Schocks

Aktuell gibt es keinen spezifischen Biomarker, der das Vorliegen einer Sepsis bestätigt (Honore et al., 2014; Scheer et al., 2016). Eine Reihe an Biomarkern kann jedoch auf ein septisches Geschehen hinweisen und einen Hinweis auf die Schwere der Erkrankung geben. Hierzu zählen das C-reaktive Protein (CRP) als genereller Infektionsparameter. Ebenso gilt das Procalcitonin (PCT) als Infektionsparameter v. a. bei bakteriellen Infektionen, welcher zusätzlich einen Hinweis auf die Schwere der Erkrankung liefern kann (Huang et al., 2019). Weitere Biomarker, welche im Rahmen des *septischen Schocks* verändert sein können, sind in **Tabelle 3** dargestellt.

**Tabelle 3: Biomarker im Rahmen des septischen Schocks** (Huang et al., 2019)

*CRP, C-reaktives Protein; IL-6, Interleukin-6; PCT, Procalcitonin*

<b>Biomarker</b>	<b>Definition</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Referenzwert</b>
<b>CRP</b>	= C-reaktives Protein	akute Infektionen bakterieller oder viraler Genese	< 0,5 mg/dl
	hoch sensitiv	wichtigster unspezifischer akuter	
	Teil der unspezifischen Immunreaktion Akut-Phase-Protein	Entzündungsparameter	
<b>PCT</b>	= Procalcitonin	hochspezifisch für systemische	< 0,5 µg/l
	Vorstufe des Schilddrüsen Hormons Calcitonin	bakterielle Infektionen	
	Synthese hauptsächlich in Leber, Niere und Muskelzellen		
<b>IL-6</b>	= Interleukin-6	Aktivierung der Gerinnungskaskade, sowie des Immunsystems	1 pg/ml
	Aktivierung der Lymphozyten und der Synthese von Akute-Phase-Proteinen	Frühmarker für neonatale Sepsis	
	Induktion von Fieber im Hypothalamus		
<b>Leukozyten</b>	= Weiße Blutzellen	eine Infektion kann eine Leukozytose (>10.000/µL), oder eine Leukozytopenie (<4.000/µL) verursachen	4.000-10.000/µl
	Lymphozyten als Teil des spezifischen Immunsystems		
	Granulozyten, Natürliche Killerzellen und Mastzellen als Zellen des unspezifischen Immunsystems		

## 1.7 APC und Sepsis

Als dritthäufigste Todesursache auf deutschen Intensivstationen ist die Sepsis eine aktuelle Herausforderung für Klinik und Forschung zugleich. Sie ist gekennzeichnet durch eine unkontrollierbare Aktivierung des Immunsystems mit massiver Zytokinausschüttung wie IL-6 und TNF- $\alpha$ , sowie durch die Aktivierung des Komplementsystems und einer unmittelbaren Aktivierung des Gerinnungssystems. Die Zytokinausschüttung stellt hier die Schnittstelle zwischen Inflammation und Koagulation dar.

Als Komplikation einer Sepsis kann es dabei zur Entwicklung eines MODS, sowie bei circa 35% zu einer DIC kommen (Okamoto et al., 2016). Beinahe alle Patienten mit Sepsis zeigen Veränderungen in der Gerinnung, welche von einer geringen Gerinnungsaktivierung, über eine Veränderung der Thrombozytenzahl bis hin zur manifesten DIC reichen können (Levi and van der Poll, 2017). Für die DIC ist dabei eine Aktivierung der intravasalen Gerinnung durch die inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , sowie IL-6 charakteristisch. Gleichzeitig hemmen diese ebenso die Fibrinolyse (van der Poll et al., 1990, 1994). Resultierend entsteht dabei eine Imbalance zwischen Fibrinbildung und dessen Abbau. Die überschießende Fibrinbildung führt einerseits zu mikrovaskulären Thromben in der Mikrozirkulation. Andererseits entstehen massive Blutungen durch den andauernden Verbrauch von Gerinnungsfaktoren bei anhaltender Aktivierung des Gerinnungssystems (Hardaway and Vasquez, 2001). Die Prävention der DIC ist daher ein wichtiges therapeutisches Ziel im Rahmen einer Sepsis-Therapie, um den Tod durch ein MODS zu verhindern (Simmons and Pittet, 2015).

APC wirkt als potentes körpereigenes Antikoagulanzen und hat ebenso anti-inflammatorische Eigenschaften. Das Protein C/S-System ist als eines der wichtigsten körpereigenen, gerinnungshemmenden Systeme während einer Sepsis in der Funktion gestört (Levi and Poll, 2015). Als Ursache gilt hier die drastisch reduzierte TM-Expression durch inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 (Faust et al., 2001). Ebenso ist das Protein C/S-System durch die Herabregulation des EPCR deutlich beeinträchtigt (Taylor et al., 2000). So wurden bei circa 90% der Patienten mit Sepsis niedrige Werte von PC gefunden (Bernard et al., 2001a). Des Weiteren wurde in zahlreichen Studien mit Sepsis Patienten ein Zusammenhang zwischen erniedrigten PC-Werten und erhöhter Mortalität festgestellt (Alcaraz et al., 1995; Fijnvandraat et al., 1995; Fourrier et al., 1992; Hazelzet et al., 1994; Hesselvik et al., 1991; Leclerc et al.,

1992; Lin et al., 2008; Lorente et al., 1993; Marlar et al., 1985; Orwoll et al., 2015; Powars et al., 1987, 1993; Román et al., 1992; Sapru et al., 2015).

Ein zunächst erfolgsversprechendes Konzept stellte daher die Gabe von rekombinatem APC (rAPC; Drotrecogin, Handelsname Xigris®) dar. So führte die Gabe von rAPC im Pavianmodell mit *Escherichia coli*-induzierter Sepsis zu einem verbesserten Überleben im Tiermodell (Taylor et al., 1987). Ebenso konnte in einem Tiermodell, mit Meningokokken-induziertem Endotoxinschock bei Hasen, durch APC ein verbessertes Überleben gezeigt werden (Roback et al., 1998).

Im Jahre 2001 wurde rAPC im Rahmen der PROWESS-Studie (*Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis*) als 96 Stunden lange, niedrig dosierte Infusion bei Patienten im *septischen Schock* eingesetzt (Bernard et al., 2001a). Die Dysregulation der physiologischen Gerinnungshemmung durch Einsatz von rAPC zu korrigieren, sowie die unkontrollierte Thrombingenerierung mit folgender mikrovaskulärer Thromben zu verhindern, stellten hierbei therapeutische Optionen dar, positiv in das Fortschreiten der Sepsis einzugreifen (Levi and van der Poll, 2007). Hierbei konnte die 28-Tage-Mortalität durch Anwendung von rAPC bei Erwachsenen mit schwerer Sepsis signifikant gesenkt werden (Bernard et al., 2001b). 10 Jahre später konnten die vorteilhaften Ergebnisse im Rahmen der PROWESS-SHOCK-Studie jedoch nicht reproduziert werden (Ranieri et al., 2012). Gleichzeitig wurden mit der Gabe von rAPC vermehrt Blutungsereignisse mit letalem Ausgang in Zusammenhang gebracht (Carlotta Rossi et al., 2013). Dies resultierte in einer Infragestellung der Sicherheit und Effektivität von rAPC (Xigris®) und das Medikament wurde infolgedessen 2011 vom Markt genommen.

Neben der therapeutischen Gabe von APC ließen sich aus der Messung von zirkulierendem APC bei Patienten im *septischen Schock* eventuell auch für den Krankheitsverlauf bedeutende Informationen ableiten.

Bisherige diagnostische Studien mit dem Ziel der Quantifizierung von APC bei Sepsis und *septischem Schock* erbrachten jedoch kontroverse Ergebnisse. Mittels eines monoklonalen Antikörper-basierten *Enzyme Capture Assays* (ECA) konnten in einer Studie bei Patienten mit schwerer Sepsis erhöhte APC-Werte bei 20 von 32 Patienten festgestellt werden (Liaw et al., 2004). Ebenso konnten in der Gruppe der überlebenden Patienten signifikant höhere APC-Werte im Vergleich zur Gruppe der verstorbenen Patienten gemessen werden. Diese Aussage wird von einer weiteren Studie über Sepsis bei Kindern unterstützt (de Kleijn et al., 2003). Hier konnten erhöhte

APC-Werte bei 27 von 28 Kindern mit Meningokokken-Sepsis und Purpura fulminans nach Gabe von PC mittels eines modifizierten Antikörper-basierten ECA-Verfahrens nach Gruber et al. identifiziert werden (Gruber and Griffin, 1992; de Kleijn et al., 2003). In einer anderen Studie hingegen, mit 14 Kindern mit Meningokokken-Sepsis, wurden niedrige oder nicht messbare APC-Werte bei allen untersuchten Kindern gemessen (Faust et al., 2001). Zur Messung von APC wurde hier ebenso das ECA-Verfahren von Gruber et al. verwendet. Eine weitere Studie untersuchte 26 Patienten mit Chemotherapie-induzierter Neutropenie und infolgedessen schwerer Sepsis und *septischem Schock* (Mesters et al., 2000). Hier wurde APC ebenso mittels ECA-Verfahren nach Gruber und Griffin gemessen. Als Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) wurde ein Wert von 2,26 ng/ml ermittelt. Es zeigte sich bei allen Patienten ein normwertiges APC. Nach 12 Stunden konnten in der Gruppe mit 13 Patienten im *septischen Schock* erhöhte APC-Werte gemessen werden. Hier zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zu den anderen 13 Patienten mit schwerer Sepsis. Alle 13 Patienten mit *septischem Schock* verstarben.

Die heterogenen Ergebnisse verdeutlichen die Schwierigkeiten bei der Messung von APC. Unterschiedliche LODs der verwendeten Messverfahren, sowie die heterogenen Studienpopulationen, welche nicht zwischen schwerer Sepsis und *septischem Schock* differenzieren, erschweren zum einen die Aussage per se und machen eine Vergleichbarkeit der Studienergebnisse nur bedingt möglich.

## 1.8 Messmethoden von APC

Obwohl zahlreiche Studien die bedeutende Rolle von APC im Rahmen der Sepsis-induzierten Gerinnungsstörung zeigen konnten, fehlt es an einer etablierten Messmethoden zur Bestimmung von APC im klinischen Alltag.

Bereits 1992 beschrieben Gruber und Griffin eine Messmethode zur Bestimmung von APC mittels ECA (Gruber and Griffin, 1992). Als Catcher wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, welcher nicht zwischen APC und PC unterscheiden konnte. Zur Quantifizierung des Substrates war dafür eine aufwendige, wochenlange Inkubation notwendig. Die LOD dieses Verfahrens lag bei 0,25 ng/ml. Orthner konnte im darauffolgenden Jahr durch Verwendung von Agaroseperlen die Inkubationszeit des Substrates auf 16-18 Stunden reduzieren (Orthner et al., 1993). Im Jahr 2003 beschrieben Liaw et al. die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers mit einer erhöhten Bindungsneigung an APC verglichen mit PC (Liaw et al., 2003). Auch hier war eine Inkubationszeit von bis zu 19 Stunden notwendig. Die LOD in diesem Verfahren lag bei 0,25 ng/ml. Ein weiterer Ansatz eine Messmethode für APC zu etablieren, lag darin, die Konzentration von Komplexen, bestehend aus APC und Protein C-Inhibitor (PCI) zu detektieren (Espana et al., 1996). Espana et al. entwickelten hierfür bereits 1996 einen Ansatz. Dazu musste die entnommene Plasmaprobe in zwei separate Röhrchen aufgeteilt werden, wobei das eine Röhrchen Heparin enthielt, um die APC-PCI-Komplexbildung zu verstärken. Das andere Röhrchen enthielt Benzamidin, um die Komplexbildung zu hemmen. Die APC-Konzentration wurden dann aus der Differenz der Konzentrationen an APC-PCI-Komplexen der beiden Proben bestimmt (Espana et al., 1996; España et al., 2001). Unklar bleibt hier jedoch der genaue Einfluss von Heparin, sowie der Einfluss des Plasmalevels von PCI. Die LOD lag bei diesem Verfahren bei 0,1 ng/ml. Zur Durchführung der Messung wurden 4 Stunden angegeben.



## 1.9 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist die Analyse der diagnostischen und prognostischen Aussagekraft von APC bei Patienten im *septischen Schock*. Hierzu werden auf Aptameren basierte *Oligonucleotide-Enzyme-Capture-Assays* (OECA) genutzt, um das für die plasmatische Gerinnung bedeutsame Enzym APC zu bestimmen (Müller et al., 2011, 2012). APC hat eine nur sehr kurze Halbwertszeit von ca. 20 Minuten, wodurch eine Messung im klinischen Alltag deutlich erschwert wird. Bei Vorbehandlung der Abnehmeröhrchen mit reversiblen Serin-Inhibitoren ist es möglich, die irreversible Inaktivierung von APC zu verhindern (Müller et al., 2012). Das OECA-Verfahren ermöglicht durch die Verwendung von hochsensitiven Aptameren zudem eine höhere Sensitivität als bisher verwendete Nachweisverfahren (Müller et al., 2009). Die Messung von APC ist mittels OECA innerhalb von 7 Stunden von der Blutabnahme bis zum Endergebnis deutlich schneller, als dies bisherige Methoden ermöglichen.

Die Hypothese der hier vorliegenden Arbeit adressiert hierbei, dass APC mit etablierten Gerinnungsmarkern korreliert und darüber hinaus mit diagnostischen und prognostischen Informationen bezüglich des Gesamtüberlebens von Patienten im *septischen Schock* einhergeht. Neben der Charakterisierung des Verlaufes dieses Gerinnungsmarkers im *septischen Schock* könnten damit auch prognostische Aussagen anhand der indirekten Bestimmung der endothelialen Funktion, mittels APC als Surrogatparameter, möglich sein.

Als primärer Endpunkt der Studie wurde die Assoziation von APC mit der 28-Tage-Mortalität untersucht. Als sekundäre Endpunkte wurden die Korrelation von APC mit etablierten Markern der plasmatischen Gerinnung sowie DIC, die diagnostische Wertigkeit von APC und der prädiktive Nutzen von APC hinsichtlich der 28-Tage-Mortalität analysiert.

## 2 STUDIENPOPULATION, MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Studiendesign und Studienkollektiv

Die hier vorliegende Studie ist eine prospektive, monozentrische Beobachtungsstudie und wurde auf Grundlage der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Vor Studienbeginn erfolgte die Prüfung und Genehmigung durch die Ethikkommission II der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg (Ethikvotum 2015-526N-MA, siehe **Anhang Ethikvotum**). Alle eingeschlossenen Patienten, bzw. deren gesetzlichen Vertreter stimmten der Teilnahme an der Studie nach ausführlicher Aufklärung zu.

Eingeschlossen wurden 48 Patienten mit der Diagnose *septischer Schock*, die im Zeitraum von Mai 2015 bis Oktober 2016 auf der Intensivstation der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim behandelt wurden. Um die Beurteilung des zeitlichen Verlaufes von APC und etablierter Gerinnungsparameter beim *septischen Schock* zu ermöglichen, wurden ausschließlich Patienten in die Studie aufgenommen, bei denen innerhalb von 24 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome eines *septischen Schocks* die Vorstellung im Krankenhaus erfolgte. Aufgrund des explorativen Charakters der Studie erfolgte keine vorherige Power-Analyse.

Die Diagnose *septischer Schock* wurde auf Grundlage der, zum Zeitpunkt der Studiendurchführung aktuellen, Sepsis-II-Leitlinie gestellt und durch zwei erfahrene Intensivmediziner bestätigt (Levy et al., 2003).

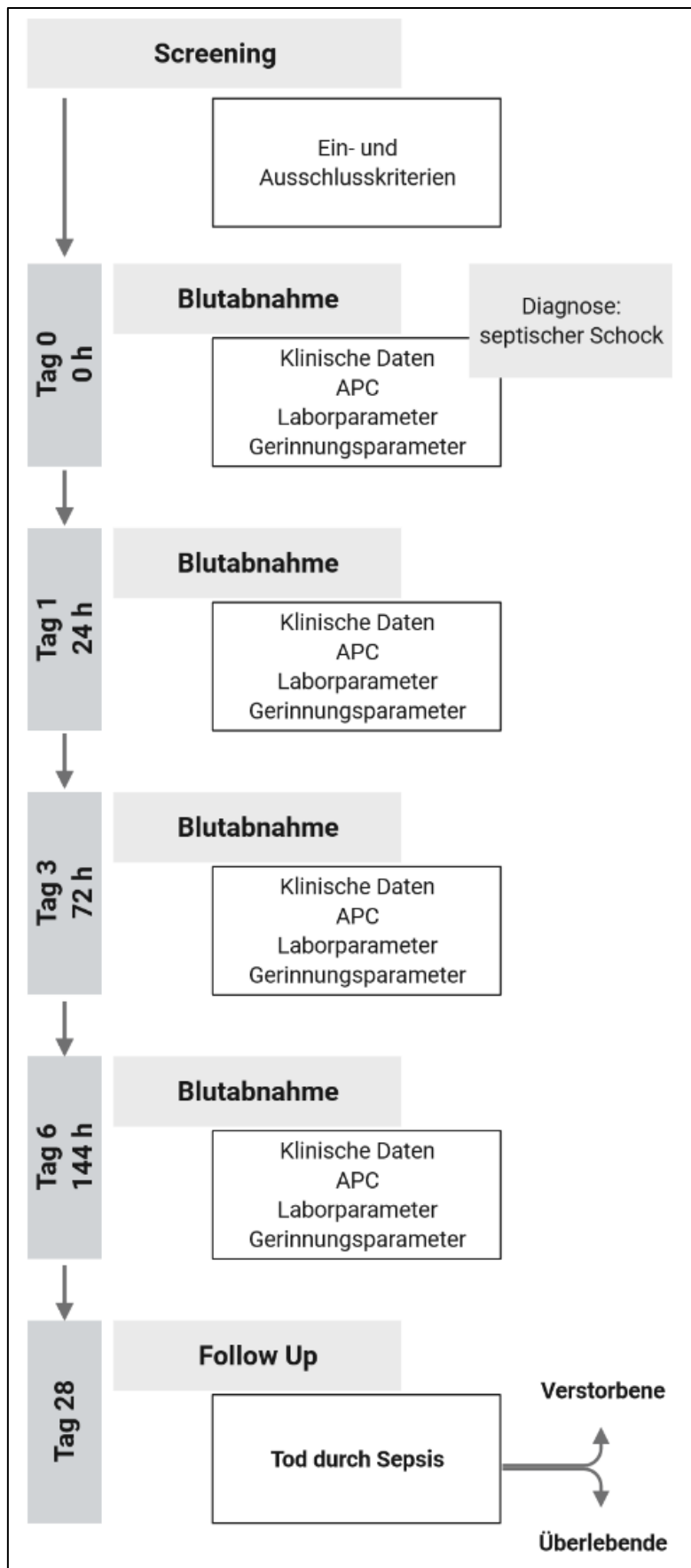
Eingeschlossen wurden alle Patienten im o.g. Zeitraum, die die Einschlusskriterien erfüllten und mindestens ein Kriterium der schweren Sepsis und eines *septischen Schocks* erfüllten. Ausschlusskriterien stellten alle therapeutischen und diagnostischen Maßnahmen dar, welche die Blutgerinnung oder die laborchemische Untersuchung der Gerinnungsparameter beeinflussten (siehe **Tabelle 4**).

**Tabelle 4: Ein- und Ausschlusskriterien**

<b>Einschlusskriterien</b>	<b>schwere Sepsis</b> (mindestens 1 Kriterium)	septische Enzephalopathie
		relative/ absolute Thrombozytopenie
<b>Einschlusskriterien</b>	<b>septischer Schock</b> (mindestens 1 Kriterium)	arterielle Hypoxämie
		metabolische Azidose
<b>Einschlusskriterien</b>	<b>septischer Schock</b> (mindestens 1 Kriterium)	septisches Nierenversagen mit einer Diurese < 0,5ml/kg/h
		Blutdruck systolisch < 90 mmHg
<b>Einschlusskriterien</b>	<b>septischer Schock</b> (mindestens 1 Kriterium)	mittlerer arterieller Blutdruck > 65 mmHg unter Volumentherapie
		<u>oder</u> Vasopressortherapie zur Aufrechterhaltung eines adäquaten Blutdruckes
<b>Ausschlusskriterien</b>	<b>Erkrankung des Hämostasesystems</b>	therapeutische Antikoagulation
		Verbrennung
<b>Ausschlusskriterien</b>	<b>Erkrankung des Hämostasesystems</b>	Polytrauma
		Fibrinolyse
<b>Ausschlusskriterien</b>	<b>Erkrankung des Hämostasesystems</b>	Operation
		Aktive Blutung
<b>Ausschlusskriterien</b>	<b>Erkrankung des Hämostasesystems</b>	Hämophilie
		Faktor V-Leiden
<b>Ausschlusskriterien</b>	<b>Erkrankung des Hämostasesystems</b>	Protein C/S-Mangel
		Prothrombinmutation

## 2.2 Studienablauf

Nach Studieneinschluss wurden zur Bestimmung von APC an vier definierten Zeitpunkten Blutabnahmen durchgeführt. Die erste Abnahme (Tag 0) erfolgte direkt nach der Diagnose *septischer Schock*. Weitere Blutabnahmen fanden nach 24 Stunden (Tag 1), nach 72 Stunden (Tag 3) und nach 144 Stunden (Tag 6) statt. Alle Blutabnahmen wurden im Rahmen der laborchemischen Routineuntersuchung durch Punktion einer peripheren Vene durchgeführt. Der Studienablauf ist in **Abbildung 9** dargestellt.



**Abbildung 9:** Der Studienablauf

APC, aktiviertes Protein C

Nach Blutabnahme wurden die Proben unverzüglich bei 2500xg bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Das hierbei separierte Plasma wurde bei -80° Celsius gelagert. Die Bestimmung der Konzentration von APC wurde mittels OECA durchgeführt.

### 2.2.1 Basisdaten

Zur Dokumentation der Patientendaten (siehe **Tabelle 5**) wurde eine digitale Datenbank angelegt. Dokumentiert wurden die medizinische Anamnese des Patienten sowie klinische Parameter zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation (siehe **Tabelle 6**). Ergänzend wurden intensivmedizinische Scores erhoben, sowie die im Laufe des intensivmedizinischen Aufenthaltes entstandenen Organdysfunktionen, durchgeführte Interventionen und die Laborparameter dokumentiert (siehe **Tabelle 7**). Ebenso wurde die Dauer auf Intensivstation, der Grund der Entlassung und die 28-Tages Mortalität in der Datenbank festgehalten. Bei fehlenden Daten wurde Akteneinsicht in die entsprechende Patientenakte beantragt und retrospektiv in der Datenbank ergänzt.

**Tabelle 5: Übersicht der dokumentierten Patientendaten**

*EK, Erythrozytenkonzentrat; TK, Thrombozytenkonzentrat*

	Medikamentenanamnese
<b>Medizinische Anamnese</b>	Vorerkrankungen: Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, Dialysepflichtigkeit, Immunsuppression, maligne Erkrankung
	Hämatologisches Versagen
<b>Organversagen im Verlauf</b>	Leberversagen
	Enzephalopathie
	Anzahl der Transfusionen von EK und TK
	Chirurgisches Fokussanierung
<b>Interventionen</b>	Anzahl der abgenommenen Blutkulturen
	Anzahl positiver Blutkulturen
	Erreger der Blutkulturen

**Tabelle 6: Übersicht der klinischen Parameter zu Studienbeginn***EK, Erythrozytenkonzentrat; TK, Thrombozytenkonzentrat*

<b>Fokus</b>	Septischer Fokus
<b>Kreislaufparameter</b>	Herzfrequenz
	Systolischer Blutdruck
	Mittlerer arterieller Druck
	Temperatur
	Katecholaminbedarf
<b>Blutgasanalyse</b>	paCO <sub>2</sub>
	paO <sub>2</sub>
	Lactat
	<i>Base Excess</i>
<b>Atmung</b>	Atemfrequenz
	Horovitz Quotient Q < 250 mmHg
	Intubation
<b>Organfunktion</b>	Dialysepflicht
	Transfusion EK
	Transfusion TK
	<i>Glasgow Coma Scale</i>

### 2.2.2 DIC, APACHE II, SAPS II und SOFA Score

Die Diagnose einer DIC wurde in der hier vorliegenden Dissertation anhand des DIC Scores der *International Society of Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) definiert (Taylor et al., 2001). Der genaue Algorithmus ist im **Anhang DIC Score** zu finden.

Zur objektiven Einschätzung des Gesundheitszustandes der eingeschlossenen Patienten wurden etablierte intensivmedizinische Scores verwendet.

Der *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE) II Score ist ein intensivmedizinischer Aufnahmescore und dient der Risikostratifizierung hinsichtlich Mortalität. Er besteht aus 3 Teilen: dem *acute physiology score*, den sog. *age points* und den *chronic health points*. Jedem Punktsammenwert kann eine prognostische Mortalität zugeordnet werden (Knaus et al., 1985). Ein Erhebungsbogen mit allen Parametern, sowie die entsprechende Auswertungstabelle findet sich im **Anhang APACHE II Score**.

Der *Simplified Acute Physiology Score* (SAPS) II ist ein etablierter intensivmedizinischer Score zur Abschätzung der Prognose und Letalität (Le Gall, 1993). Er wird einmalig bei Aufnahme auf die Intensivstation erhoben. Er umfasst

insgesamt 17 Parameter. Jedem Scorewert ist ein Mortalitätsrisiko zugeordnet (Le Gall, 1993). Ein detaillierter SAPS II Erhebungsbogen mit Auswertung findet sich im **Anhang SAPS II Score**.

Der SOFA Score ist ein Score zur Abschätzung der Organdysfunktion und Mortalität (Vincent et al., 1996; Minne et al., 2009). Hierbei werden sechs Organsysteme (Lunge, zentrales Nervensystem (ZNS), Herz-Kreislauf, Leber, Gerinnung und Nieren) beurteilt. Ein per se hoher SOFA Score geht bereits mit erhöhter Mortalität einher (Ferreira, 2001). Ein Erhebungsbogen mit Auswertung ist im **Anhang SOFA Score**.

## 2.3 Bestimmung der Biomarker

### 2.3.1 Bestimmung etablierter Gerinnungsparameter

Die etablierten Gerinnungsparameter PC-Aktivität, D-Dimere, Thrombin-Antithrombin (TAT)-Komplex und Prothrombinfragmente 1+2 (F 1+2) wurden ebenso wie das APC an den definierten Zeitpunkten (Tag 0, Tag 1, Tag 3, Tag 6) gemessen.

Die PC-Aktivität und D-Dimere wurden mittels eines BCS XP-Gerinnungsanalyzers unter Verwendung des Berichrom® PC (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Deutschland) bzw. des INNOVANCE® D-Dimers (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Deutschland) analysiert. Die Prothrombinfragmente 1 und 2 (F 1+2), sowie die Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT) wurden unter Verwendung des Enzygnost® TAT micro bzw. Enzygnost® F 1+2 micro (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Deutschland) mittels *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA)-Verfahren bestimmt. Die jeweiligen Referenzbereiche (95%-Konfidenzintervalle, KI) wurden durch Analyse von Plasmaproben von gesunden Blutspendern bestimmt und wie folgt festgelegt (Becher et al., 2018):

PC-Aktivität:	79–150%
D-Dimer:	0–0,5 mg/l
TAT-Komplexe:	0–3,9 ng/ml
F 1+2:	0–0,34 nmol/l

Neben den etablierten Gerinnungsparameter wurde ein kleines Blutbild, die Infektparameter sowie weitere in **Tabelle 7** aufgelistete Parameter an den definierten Zeitpunkten analysiert.

**Tabelle 7: Laborparameter an Tag 0, 1, 3 und 6**

APC, aktiviertes Protein C; CRP, C-reaktives Protein; F 1+2, Prothrombinfragment 1 und 2; GFR, glomeruläre Filtrationsrate; INR, International Normalized Ratio; PC-Aktivität, Protein C-Aktivität; PCT, Procalcitonin; PTT, partial thromboplastin time; TAT, Thrombin-Antithrombin-Komplex

<b>Blutbild</b>	Leukozyten
	Hämoglobin
	Thrombozyten
<b>Gerinnungsparameter</b>	INR
	PTT
	D-Dimere
	PC-Aktivität
	F 1+2
	TAT-Komplexe
	APC
<b>Niere</b>	Harnstoff
	Kreatinin
	GFR
<b>Infektparameter</b>	CRP
	PCT
<b>Ischämie-Marker</b>	Laktat

### 2.3.2 Bestimmung von aktiviertem Protein C

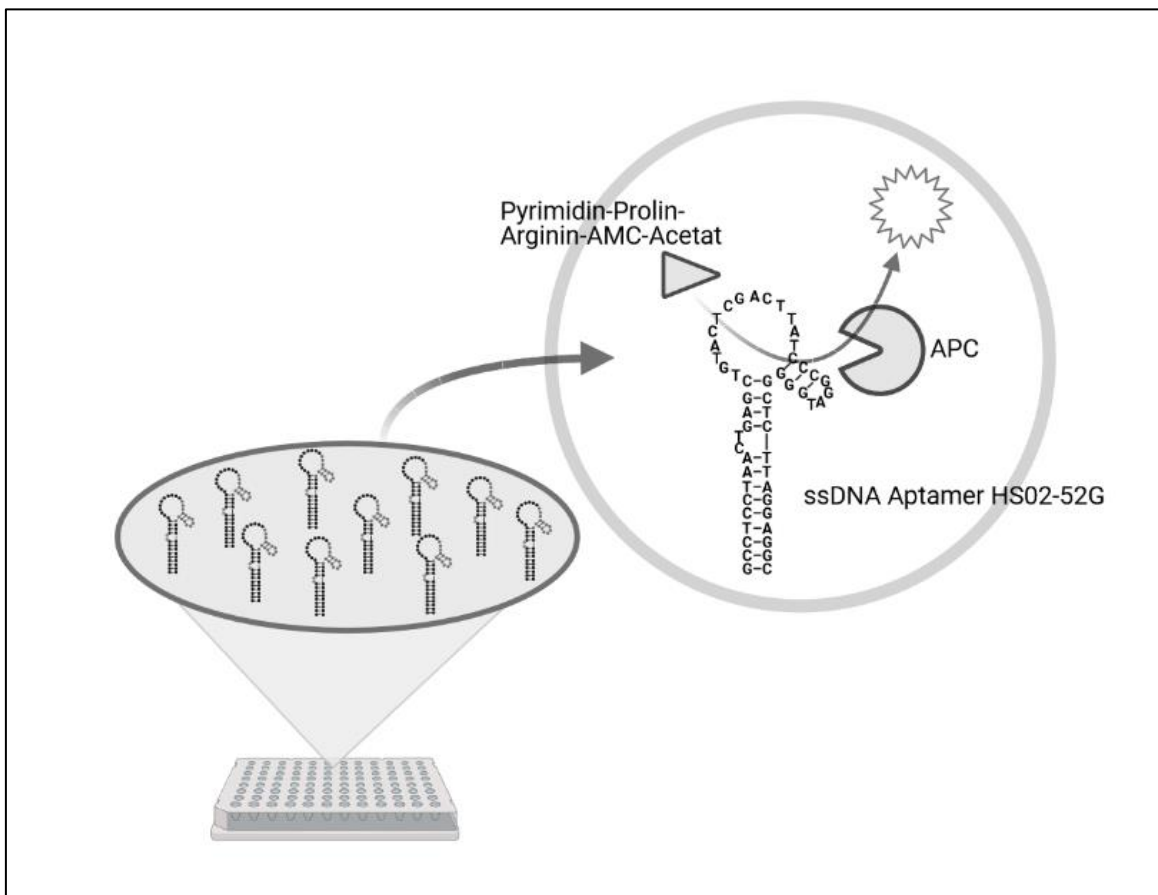
Die Bestimmung von APC erfolgte mittels eines *Oligonucleotide-Enzyme-Capture-Assay*-basierten Testverfahrens.

Vor der Blutabnahme zur Bestimmung von APC wurden den Standard Citrat Monovetten® (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) Bivalirudin (Angiox®, The Medicines Company, Oxfordshire, Vereinigtes Königreich Großbritannien) und Aprotinin (Applichem, Darmstadt, Germany) hinzugefügt, um eine endgültige Konzentration von 250 µg/ml (115 µM) und 500 KIU/ml zu erhalten.

Das OECA Verfahren ist eine Form des ELISA. Es stellt eine besondere Form des indirekten ELISA-Verfahrens dar (sog. *Sandwich-ELISA*). Hierbei erfolgt zuerst das Auftragen eines *Catcher*-Moleküls, welches an die Mikrotitrationsplatte bindet. Dieser *Catcher* bindet hochspezifisch den Analyten. Die Rolle des *Catcher*-Moleküls wird in dem verwendeten Verfahren von einem für APC hochspezifischen Aptamer, *single-stranded deoxyribonucleic acid* (einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure, ssDNA) Aptamer HS02-52G, übernommen (Müller et al., 2012). Es folgt das Auftragen des Analyten und somit eine hochaffine Bindung des Analyten an den *Catcher*.



Überschüssiges Analysat wird durch einen Waschvorgang entfernt. Da der Analyt selbst ein Enzym ist, erfolgt der Nachweis desselben durch die direkte Substratumsetzung mittels eines fluorogenen Substrates. Als Peptidsubstrat wurde Pefafleur Pca (Pefa-5791) (Pentapharm, Basel, Schweiz), bestehend aus einer Aminosäurekette und dem Farbstoff 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC), verwendet: Pyrimidin-Prolin-Arginin-AMC-Acetat. Durch die proteolytische Spaltung des Substrates mittels APC wird ein Indikator freigesetzt, der fluorometrisch gemessen werden kann. Die Fluoreszenzemission pro Zeiteinheit ist dabei proportional zur vorhandenen Menge an Enzym, also an APC. Ein genauer Ablauf des OECA-Verfahrens ist in **Abbildung 10** dargestellt.



**Abbildung 10:** Oligonucleotide-Enzyme-Capture-Assay, eigene Abbildung

*Aufragen des Catcher-Moleküls (ssDNA Aptamer HS02-52G) an den Boden der Mikrotiterplatte. Zugabe des Analyten (APC) und Bindung des Analyten an den Catcher (ssDNA Aptamer HS02-52G). Zugabe eines zum Enzym passenden Substrats: Pyrimidin-Prolin-Arginin-AMC-Acetat, das zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird. Messung der Fluoreszenzemission: Die Menge des umgesetzten Substrates ist proportional zur Menge des Analyten. AMC, 7-Amino-4-Methylcoumarin; APC, aktiviertes Protein C; ssDNA, single-stranded deoxyribonucleic acid*

Als LOD für APC wurde im Rahmen des APC-OECA-Verfahrens 0,022 ng/ml (0,39 pmol/l), als Bestimmungsgrenze (*limit of quantification*, LOQ) wurde 0,116 ng/ml

(2,06 pmol/l) ermittelt (Müller et al., 2012). Bei gesunden Probanden war APC durch diese Methode nicht nachweisbar (Müller et al., 2012). Im Rahmen dieser Studie wurden nur APC Werte oberhalb des LOQ-Limits verwendet. Mit Hilfe des OECA-basierten Verfahrens ist eine Bestimmung von APC in ca. 7 Stunden von der Blutentnahme bis zum Testergebnis möglich.

## 2.4 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm *IBM SPSS Statistics* (*Statistics* 27.0, IBM 2020, Vereinigte Staaten von Amerika) verwendet.

Normalverteilte Variablen wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Nicht normalverteilte Variablen wurden als Median mit Interquartilsabstand (*Interquartil Range*, IQR) angegeben. Diskrete Variablen wurde als Häufigkeiten in Prozentzahlen (%) angegeben. Zum Vergleich kontinuierlicher Variablen wurde der zweiseitige t-Test verwendet. Der Chi Quadrat-Test bzw. Fisher Exakt Test wurde zum Vergleich diskreter Variablen verwendet. Korrelationen zwischen Gerinnungsparametern wurden mittels Spearman Korrelationskoeffizienten geprüft. Die Berechnung der geeigneten *Cutoff*-Werte einzelner Gerinnungswerte für die Vorhersage des primären Endpunktes wurde mittels *Youden*-Index durchgeführt. Die diagnostische Wertigkeit einzelner Gerinnungswerte wurde durch Grenzwertoptimierungskurven (*receiver operating characteristics*, ROC) und der zugehörigen Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) ermittelt. Zur Bewertung wurden folgende Kategorien gewählt (Safari et al., 2016): 90-100 exzellent, 80-90 gut, 70-80 ausreichend, 60-70 unzureichend. Zur Berechnung der Effektstärke wurde Cramer's V berechnet. Dabei gilt nach Kraska-Miller: Werte  $<0,3$  – kleiner Effekt;  $0,3 < \text{Wert} < 0,7$  – mittlerer Effekt; Werte  $> 0,7$  – großer Effekt (Kraska-Miller, 2014).

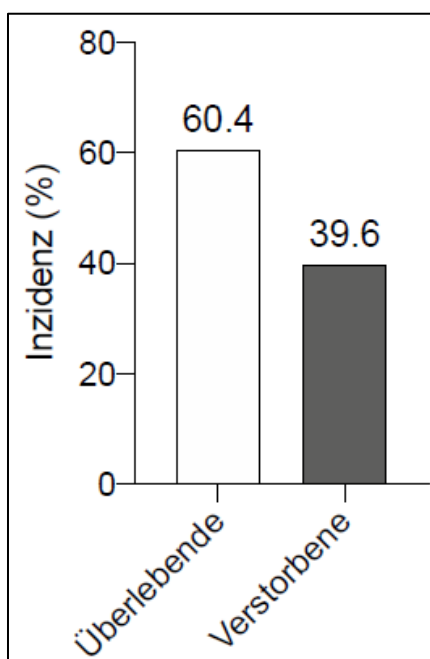
Zur Analyse unabhängiger Einflussgrößen auf die abhängige Variable Tod durch Sepsis wurde zunächst eine univariate und im Anschluss eine multivariate logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Hierfür wurde als Ergebnis das Quotenverhältnis (*Odds Ratio*, OR) sowie deren KI mit 95%-Konfidenzniveau angeben. Zur Untersuchung der Güte des Modells wurde Nagelkerkes R-Quadrat berechnet (Nagelkerke, 1991). Ab einem Wert von 0,5 kann von einem sehr guten Modell ausgegangen werden (Backhaus et al., 2016). Bei allen genannten statistischen Tests wurde zweiseitig getestet sowie  $p=0,05$  als Signifikanzniveau festgelegt (Eckey and Türck, 2006).

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Patientenpopulation und Basisdaten

In die Studie wurden 48 Patienten eingeschlossen. 38 (79,2%) davon waren männlich und 10 (20,8%) weiblich. Das mediane Lebensalter lag bei 63,0 (IQR 51,5-71,0) Jahren. Die am häufigsten vorkommende Vorerkrankung des Gesamtkollektives war die arterielle Hypertonie (43,8%), gefolgt von Diabetes mellitus Typ II (29,2%) und malignen Erkrankungen (25,0%).

Von allen 48 in die Studie eingeschlossenen Patienten verstarben 19 (39,6%) innerhalb von 28 Tagen nach Diagnose, während 29 (60,4%) der Studienteilnehmer überlebten (siehe **Abbildung 11**). In beiden Gruppen lag das mediane Alter bei 63,0 Jahren, hier zeigten sich keine statistisch signifikante Unterscheidung im Vergleich beider Gruppen (Überlebende 63,0 Jahre vs. Nicht-Überlebende 63,0 Jahre;  $p=1,00$ ). Innerhalb der männlichen Subgruppe zeigte sich ebenso kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf das Überleben (männliche Überlebende 79,3% vs. männliche Verstorbenen 79,0%;  $p=0,59$ ).



**Abbildung 11:** Inzidenz (%) der 28-Tage Mortalität des Studienkollektivs

Hinsichtlich der bei Einschluss in die Studie vorliegenden Vorerkrankungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich beider Subgruppen. Einzig in der Prävalenz einer bestehenden Immunsuppression (Überlebende 6,9% vs. Nicht-Überlebende 26,3%;  $p=0,07$ ) als auch eines Diabetes mellitus Typ II (Überlebende 37,9% vs. Nicht-Überlebende 15,8%;  $p=0,09$ ) gab es Unterschiede zwischen den Subgruppen, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichten (siehe **Tabelle 8**).

**Tabelle 8: Basisdaten und Anamnese der gesamten Studienpopulation, Vergleich Überlebende und Verstorbene**

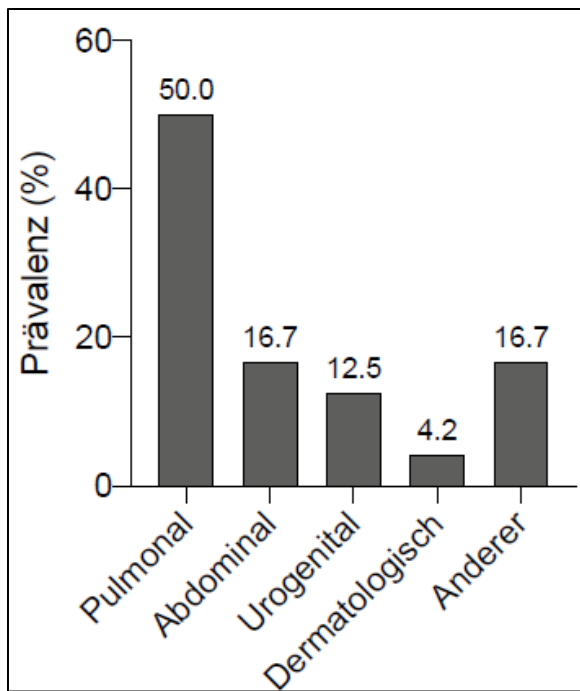
*IQR, interquartil range (25. bzw. 75. Perzentile); n, Anzahl*

	<b>Gesamt (n= 48)</b>	<b>Überlebende (n = 29)</b>	<b>Verstorbene (n = 19)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Alter, Median (IQR)</b>	63,0 (51,5-71,0)	63,0 (51,0-73,0)	63,0 (57,0-68,0)	1,00
<b>Männlich, n (%)</b>	38 (79,2)	23 (79,3)	15 (79,0)	0,59
<b>Anamnese, n (%)</b>				
<b>Diabetes mellitus</b>	14 (29,2)	11 (37,9)	3 (15,8)	0,09
<b>Arterielle Hypertonie</b>	21 (43,8)	15 (51,7)	6 (31,6)	0,17
<b>Dialysepflichtiges Nierenversagen</b>	5 (10,4)	2 (6,9)	3 (15,8)	0,35
<b>Immunsuppression</b>	7 (14,6)	2 (6,9)	5 (26,3)	0,07
<b>Maligne Erkrankung</b>	12 (25,0)	6 (20,7)	6 (31,6)	0,44

### 3.1.1 Klinische Parameter bei Aufnahme auf die Intensivstation

Im Gesamtkollektiv lag bei 24 (50,0%) Patienten eine Pneumonie als Fokus der Sepsis vor, gefolgt von abdominellen (16,7%), urogenitalen (12,5%) und dermatologischen (4,2%) Ursachen. Andere Fokuse (u.a. Peritonsillarabszesse und Spondylodiszitis mit paravertebralem Abszess) waren in 16,7% der Fälle ursächlich für die Entwicklung der Sepsis (siehe **Abbildung 12**).

Im Vergleich der Subgruppen bezüglich des Fokus zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Verstorbenen und Überlebenden. In beiden Gruppen war der septische Fokus am häufigsten die Pneumonie (Überlebende 51,7% vs. Nicht-Überlebende 47,4%;  $p=0,77$ ), gefolgt von einem abdominellen Fokus (Überlebende 20,7% vs. Nicht-Überlebende 10,5%;  $p=0,36$ ) sowie anderen Ursachen, wie z.B. Peritonsillarabszess oder Spondylodiszitis, welche jeweils nur einmalig auftraten.



**Abbildung 12:** Prävalenz (%) der septischen Fokusse in der Studienpopulation

Zur objektiven Einschätzung des Gesundheitszustandes der eingeschlossenen Patienten wurden direkt bei Aufnahme auf die Intensivstation (Tag 0) intensivmedizinisch etablierte Scores erhoben. Der SAPSII Score hatte im Patientenkollektiv einen medianen Wert von 57,0 (IQR 49,0-68,5). Der SOFA Score lag bei 12,0 (IQR 11,0-14,0) und der APACHEII Score hatte einen medianen Wert von 27,5 (IQR 23,0-32,0). Alle Scores zeigten erhöhte Werte, welche mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko einhergehen. Es zeigte sich jedoch keine signifikante Differenz ( $p > 0,05$ ) zwischen den Überlebenden und den Nicht-Überlebenden zu Studienbeginn. Der DIC Score zeigte in beiden Gruppen eine gleiche Verteilung. Sowohl in der Gruppe der Verstorbenen als auch in der Gruppe der Überlebenden lag der DIC Score bei 3 (IQR 3-4) Punkten. Entsprechend der Score Interpretation kann hier nicht von einer manifesten DIC ausgegangen werden.

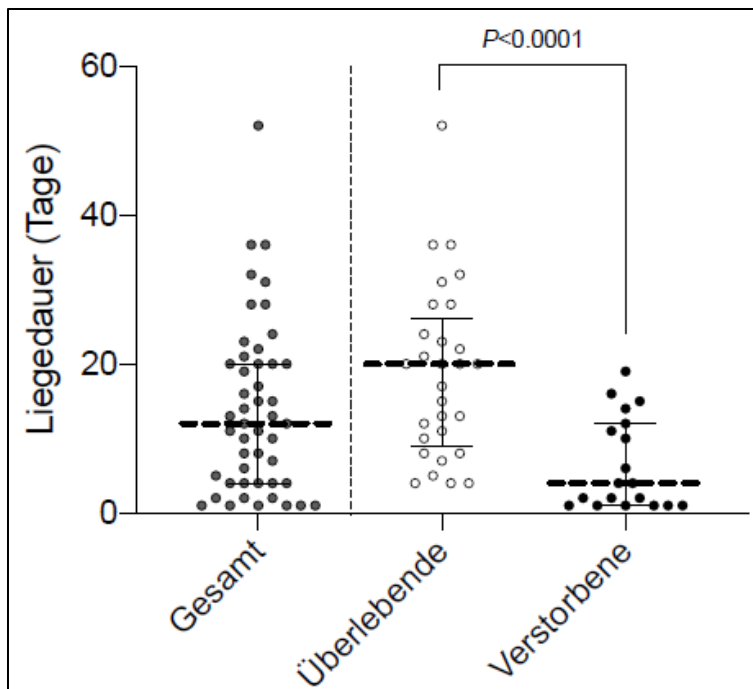
30 (62,5%) Patienten litten an einem Nierenversagen, darunter 17 (35,4%) mit Dialysepflichtigkeit. Eine invasive Beatmung war an Tag 0 bereits bei 34 (70,8%) Patienten notwendig. Auch hier zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den überlebenden und den verstorbenen Patienten ( $p > 0,05$ ). Eine Übersicht der klinischen Parameter zu Studienbeginn (Tag 0) ist in **Tabelle 9** aufgeführt.

**Tabelle 9: Klinische Parameter der gesamten Studienpopulation, Vergleich Überlebende und Verstorbene**

*APACHE, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; DIC, disseminated intravascular coagulation; IQR, interquartile range (25. bzw. 75. Perzentile); n, Anzahl; SAPS, Simplified Acute Physiology Score; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment*

	<b>Gesamt (n= 48)</b>	<b>Überlebende (n = 29)</b>	<b>Verstorbene (n = 19)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Beatmung, n (%)</b>	34 (70,8)	20 (69,0)	14 (73,7)	0,73
<b>Nierenversagen, n (%)</b>	30 (62,5)	16 (55,2)	14 (73,7)	0,20
<b>Dialyse, n (%)</b>	17 (35,4)	9 (31,0)	8 (42,1)	0,44
<b>Septischer Fokus, n (%)</b>				
<b>Pneumonie</b>	24 (50,0)	15 (51,7)	9 (47,4)	0,77
<b>Haut</b>	2 (4,2)	1 (3,5)	1 (5,3)	0,76
<b>Abdominal</b>	8 (16,7)	6 (20,7)	2 (10,5)	0,36
<b>Urogenital</b>	6 (12,5)	3 (10,3)	3 (15,8)	0,58
<b>Andere</b>	8 (16,7)	4 (13,8)	4 (21,1)	0,51
<b>Scores, Median (IQR)</b>				
<b>SOFA Score</b>	12,0 (11,0-14,0)	12 (10,0-14,0)	12 (11,0-14,0)	0,21
<b>SAPS II Score</b>	57,0 (49,0-68,5)	56 (42,0-66,0)	57,5 (51,75-69,75)	0,31
<b>APACHE II Score</b>	27,5 (23,0-32,0)	27,0 (23,0-31,0)	30,0 (24,0-37,0)	0,15
<b>DIC Score</b>	3 (3-4)	3 (3-4)	3 (3-4)	1,00

Die Gesamtliegedauer auf der Intensivstation im untersuchten Patientenkollektiv betrug im Median 12,0 (IQR 4,0 Tage - 20,0 Tage) Tage. Die kürzeste Liegedauer lag bei einem Tag, die längste bei 52 Tagen. Im Vergleich der Subgruppen lässt sich ein signifikanter Unterschied der Liegedauer auf der Intensivstation feststellen. Die überlebenden Patienten hatten eine signifikant längere Liegedauer auf Intensivstation als die verstorbenen Patienten (20,0 Tage vs. 4,0 Tage;  $p=0,0001$ ) (siehe **Abbildung 13**).



**Abbildung 13:** Liegedauer auf Intensivstation (Tage): Gesamtpopulation, Vergleich Überlebende und Verstorbene

Jeder Punkt stellt einen Patienten dar. Der Balken steht für den Median, die Whiskers stellen die 25. bzw. 75. Perzentile dar

### 3.1.2 Basislabor Parameter

Bei allen eingeschlossenen Patienten wurde ein Basislabor abgenommen. In allen Patientenproben zeigten sich erhöhte Infektionsparameter: PCT lag im Median bei 26,1  $\mu\text{g/l}$  (IQR 1,6-48,6). Das CRP war mit einem medianen Wert von 208,0 mg/l (IQR 121,0-302,0) deutlich über dem Referenzwert (<5 mg/l). Ebenso waren die Leukozyten mit  $11,7 \times 10^{12}/\text{l}$  (IQR 5,6-20,9) deutlich erhöht. Kreatinin als organspezifischer Biomarker der Nieren war mit 1,83 mg/dl (IQR 0,92-3,58) erhöht (Referenzwert: Männer 0,8-1,2 mg/dl; Frauen 0,7-1,1 mg/dl). Der Laktatwert war mit 3,1 mmol/l (IQR 1,5-5,5 mmol/l) im gesamten Patientenkollektiv erhöht (Referenzwert: <2mmol/l). Einzig die Lactatwerte an Tag 0 waren in der Gruppe der Nicht-Überlebenden signifikant höher als in der Gruppe der Überlebenden (5,0 vs. 2,6 mmol/l;  $p=0,04$ ). Ansonsten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Laborwerte zwischen den Subgruppen. Eine Übersicht der Laborparameter der Gesamtpopulation, sowie eine Gegenüberstellung der Überlebenden und Verstorbenen, an Tag 0 ist in **Tabelle 10** dargestellt.

**Tabelle 10: Laborparameter an Tag 0 in der Gesamtpopulation, Vergleich Überlebende und Verstorbene**

Angaben in Median (IQR); CRP, C-reaktives Protein; GFR, glomeruläre Filtrationsrate; IQR, interquartil range (gibt die 25. bzw. 75. Perzentile an); n, Anzahl; PCT, Procalcitonin

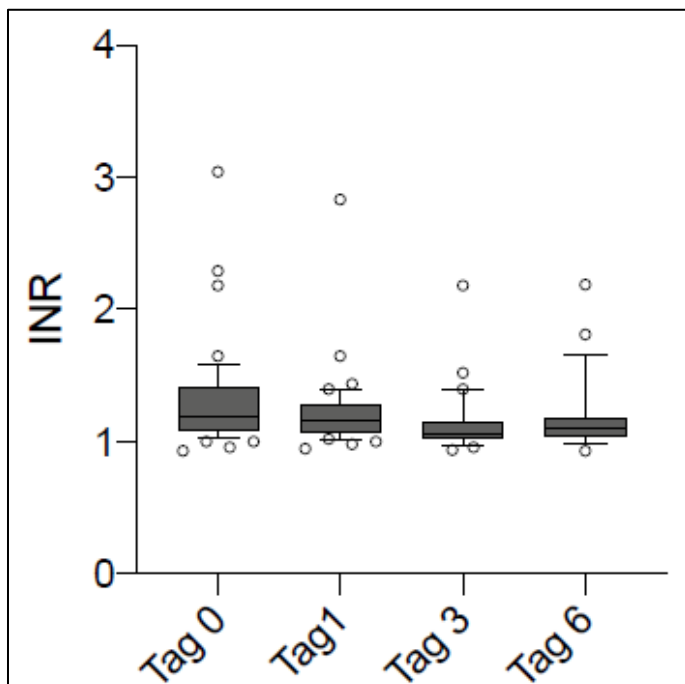
	<b>Gesamt (n = 48)</b>	<b>Überlebende (n = 29)</b>	<b>Verstorbene (n = 19)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>PCT (µg/l)</b>	26,1 (1,6-48,6)	36,9 (4,3-54,2)	3,7 (1,2-26,1)	0,12
<b>CRP (mg/l)</b>	208,0 (121,0-302,0)	221,5 (129,5-286,0)	206,0 (46,6-306,0)	0,60
<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	1,8 (0,9-3,5)	1,4 (0,9-2,7)	2,1 (0,8-5,1)	0,33
<b>GFR (ml)</b>	37,6 (20,6-76,0)	47,0 (20,5-93,5)	32,9 (25,5-68,0)	0,21
<b>Lactat (mmol/l)</b>	3,1 (1,5-5,5)	2,6 (1,5-3,8)	5,0 (1,8-8,4)	0,04
<b>Hämoglobin (g/dl)</b>	11,5 (9,6-13,9)	12,7 (9,5-14,7)	11,7 (8,4-14,1)	0,25
<b>Leukozyten (10<sup>12</sup>/l)</b>	11,7 (5,6-20,9)	10,8 (5,8-18,9)	18,3 (3,7-22,4)	0,47
<b>Harnstoff (mg/dl)</b>	72,9 (39,4-103,7)	77,9 (42,2-114,0)	53,3 (27,7-75,7)	0,13



## 3.2 Gerinnungsparameter

### 3.2.1 Zeitlicher Verlauf der Gerinnungsparameter in der Gesamtpopulation

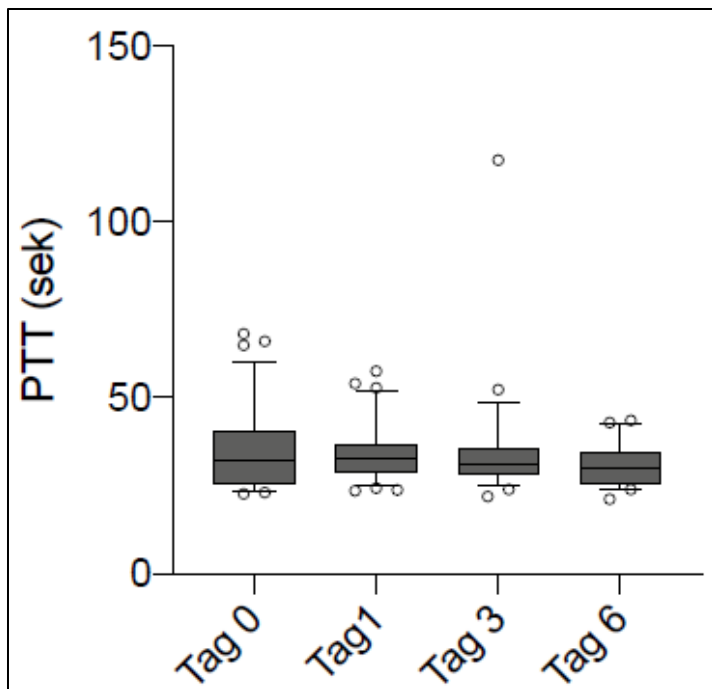
Zur Gesamtbeurteilung der Gerinnung wurden folgende globale Gerinnungsparameter zu Studienbeginn (Tag 0), nach 24 Stunden (Tag 1), an Tag 3 und Tag 6 gemessen: INR bzw. Quick-Wert, PTT und Thrombozyten. Zudem wurden die Gerinnungsparameter TAT, F 1+2, D-Dimere und PC-Aktivität zur Beurteilung der Aktivität der plasmatischen Gerinnung bestimmt.



**Abbildung 14:** Boxplots der INR-Werte in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar; INR, International Normalized Ratio*

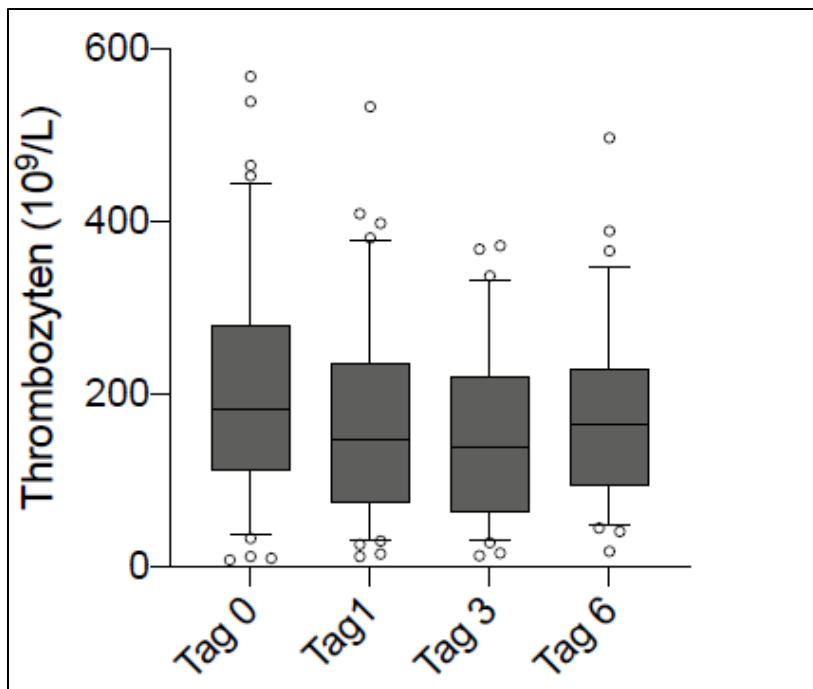
An Tag 0 lag der INR in der Gesamtpopulation im Median bei 1,20 (IQR 1,09-1,40) und lag somit leicht über dem Referenzbereich. An den darauffolgenden Untersuchungen an Tag 1 (1,16; IQR 1,06-1,27), Tag 3 (1,06; IQR 1,02-1,15) und Tag 6 (1,10; IQR 1,05-1,18) lagen die INR-Werte der Gesamtpopulation im Referenzbereich. Maximalwerte wurden an Tag 0 (3,04) und Tag 1 (2,83) gemessen (siehe **Abbildung 14**).



**Abbildung 15:** Boxplots der PTT-Werte (sek) in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar; PTT, partial thromboplastin time*

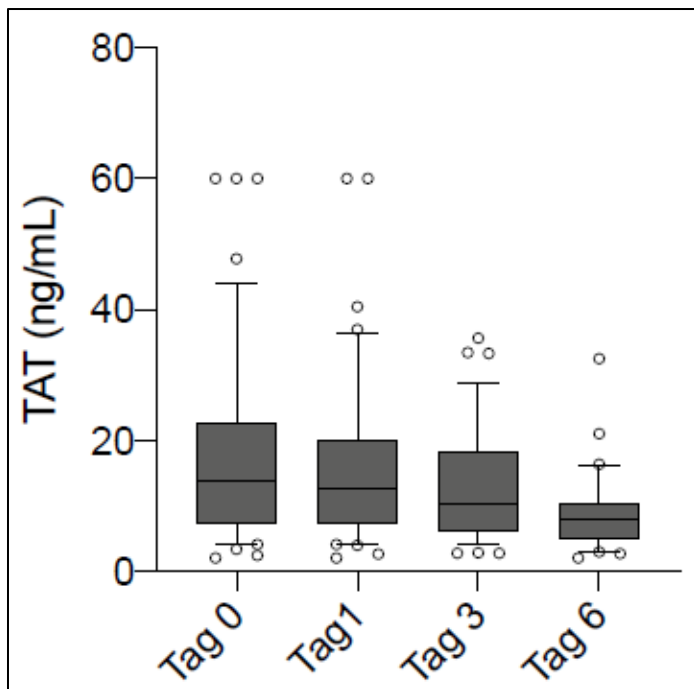
Die PTT-Werte zeigten sich initial in der Gesamtpopulation normwertig (32 sek; IQR 26-40). Auch in den darauffolgenden Messungen an Tag 1 (33 sek; IQR 28-36), Tag 3 (31 sek; IQR 29-35) und Tag 6 (30 sek; IQR 25-34) blieben die Werte im Referenzbereich. Die höchsten Werte (68 sek) wurden an Tag 0, sowie an Tag 3 (118 sek) gemessen (siehe **Abbildung 15**).



**Abbildung 16:** Boxplots der Thrombozyten-Werte ( $10^9/l$ ) in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar*

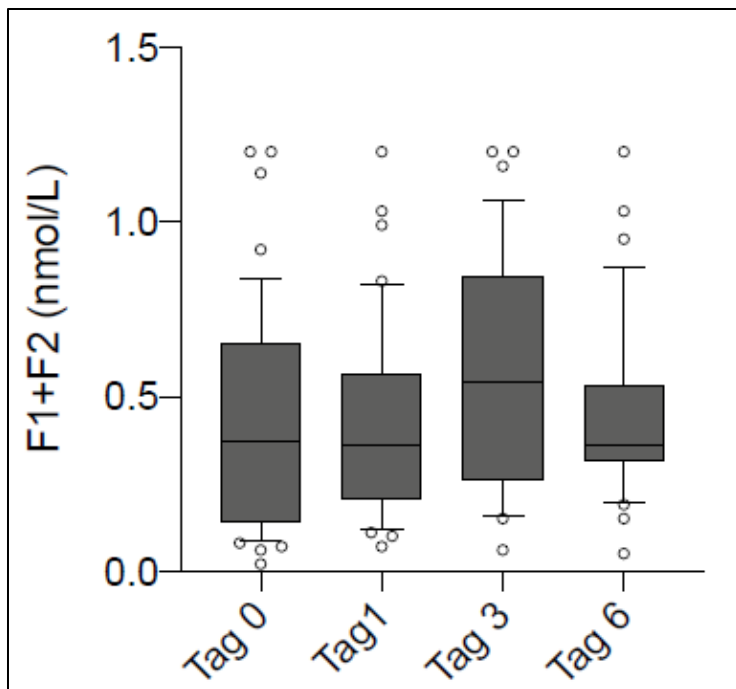
Die Thrombozyten waren zu Beginn der Studie in der Gesamtpopulation normwertig ( $182 \times 10^9/l$ ; IQR 119-275). An Tag 1 ( $147 \times 10^9/l$ ; IQR 77-232) und Tag 3 ( $137 \times 10^9/l$ ; IQR 65-212) nahmen die Werte im Vergleich zu Tag 0 ab und sanken unter den Referenzbereich. An Tag 6 ( $165 \times 10^9/l$ ; IQR 94-222) war ein leichter Anstieg, innerhalb des Referenzbereiches, zu messen. Die Maximalwerte wurden zu Beginn der Studie (Tag 0) mit  $567 \times 10^9/l$  gemessen (siehe **Abbildung 16**).



**Abbildung 17:** Boxplots der TAT-Werte (ng/ml) in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar; TAT, Thrombin-Antithrombin-Komplex*

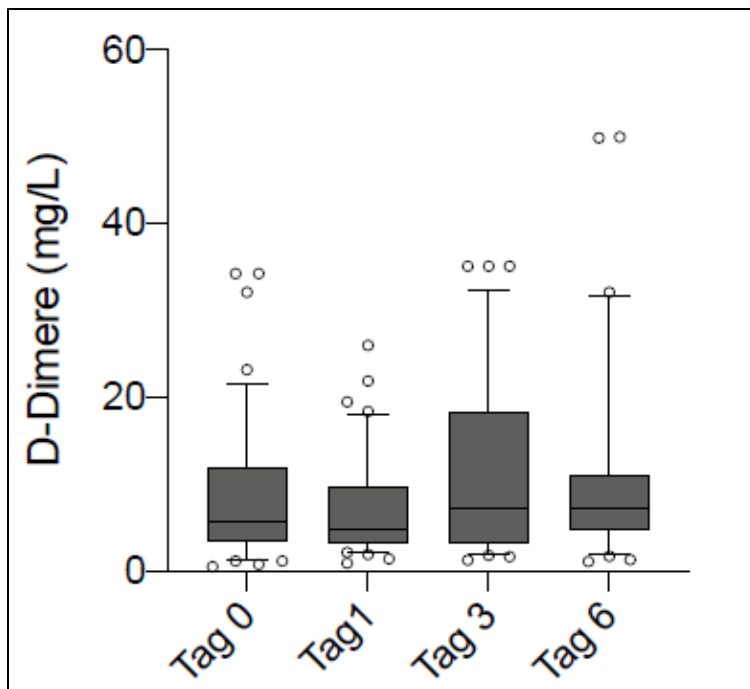
Die TAT-Werte (13,8 ng/ml; IQR 7,5-21,2) in der Gesamtpopulation waren an Tag 0 erheblich erhöht. Im Verlauf der Studie zeigten die TAT-Werte in der gesamten Studienpopulation eine kontinuierliche Abnahme. Die Werte waren im Median stets oberhalb des Referenzbereichs (<4,1 ng/ml). Die Maximalwerte wurden innerhalb der ersten 24 Stunden (Tag 0 und Tag 1) mit 60,0 ng/ml gemessen (siehe **Abbildung 17**).



**Abbildung 18:** Boxplots der F 1+2-Werte (nmol/l) in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar; F 1+2, Prothrombinfragmente 1 und 2*

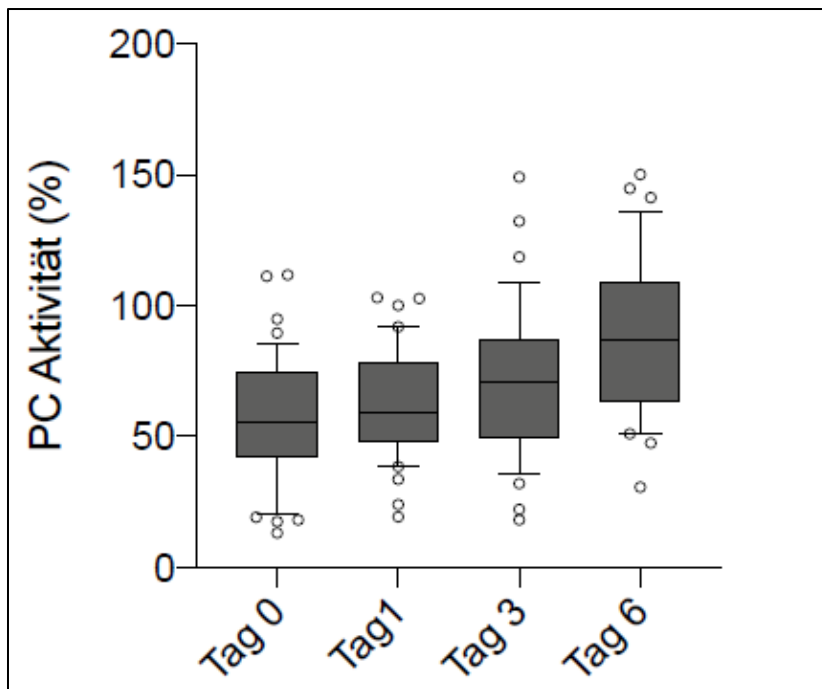
Die F 1+2 Werte waren initial normwertig (0,37 nmol/l; IQR 0,14-0,65) und erreichten ihr Maximum (0,54 nmol/l; IQR 0,27-0,82) an Tag 3. Maximalwerte wurden bei allen Messungen mit 1,20 nmol/l gemessen (siehe **Abbildung 18**).



**Abbildung 19:** Boxplots der D-Dimere (mg/l) in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar*

Alle eingeschlossenen Patienten zeigten erhöhte D-Dimere an Tag 0 (5,57 mg/l; IQR 3,55-11,71). Diese stiegen im Verlauf des *septischen Schocks* stetig an (Tag 1: 4,79 mg/l; IQR 3,19-8,64; Tag 3: 7,27 mg/l; IQR 3,23-16,04). Ihr Maximum erreichten sie an Tag 3 mit 7,27 mg/l (IQR 3,23-16,04). Maximalwerte wurden an Tag 6 mit 49,90 mg/l gemessen (siehe **Abbildung 19**).



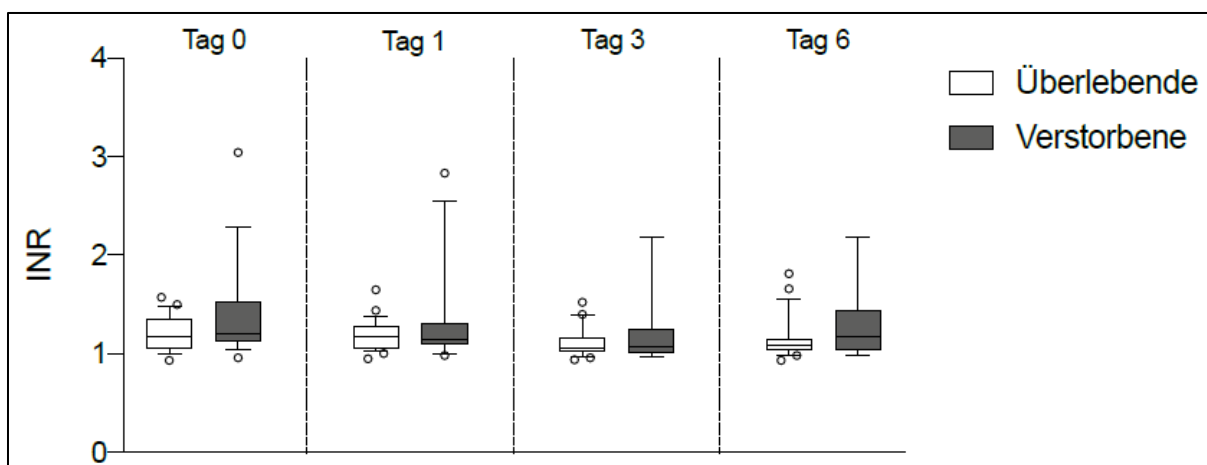
**Abbildung 20:** Boxplots der PC-Aktivität (%) in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar; PC-Aktivität, Protein C-Aktivität*

Die PC-Aktivität war reduziert unter 70,0% bei 33 (68,8%) Patienten zum Zeitpunkt des Studienbeginns (Tag 0). Eine PC-Aktivität oberhalb 70,0% wurde bei 22 (45,8%) Patienten gemessen am Tag 6. Im Verlauf zeigten die Werte der PC-Aktivität eine kontinuierliche Zunahme von 55,8% (IQR 43,85-74,60) an Tag 0 auf 87,2% (IQR 63,25-107,68) an Tag 6 in der Gesamtpopulation. Maximalwerte wurden an Tag 3 (149,0%) und Tag 6 (150,0%) gemessen (siehe **Abbildung 20**).

### 3.2.2 Zeitlicher Verlauf der Gerinnungsparameter im Vergleich Überlebende versus Verstorbene

Zur Gesamtbeurteilung der Gerinnung wurden folgende globale Gerinnungsparameter zu Studienbeginn (Tag 0), nach 24 Stunden (Tag 1), an Tag 3 und Tag 6 gemessen: INR bzw. Quick-Wert, PTT und Thrombozyten. Zudem wurden die Gerinnungsparameter TAT, F 1+2, D-Dimere und PC-Aktivität zur Beurteilung der Aktivität der plasmatischen Gerinnung bestimmt. Im folgenden Kapitel werden nun die Gerinnungsparameter der Überlebenden den Verstorbenen gegenübergestellt.

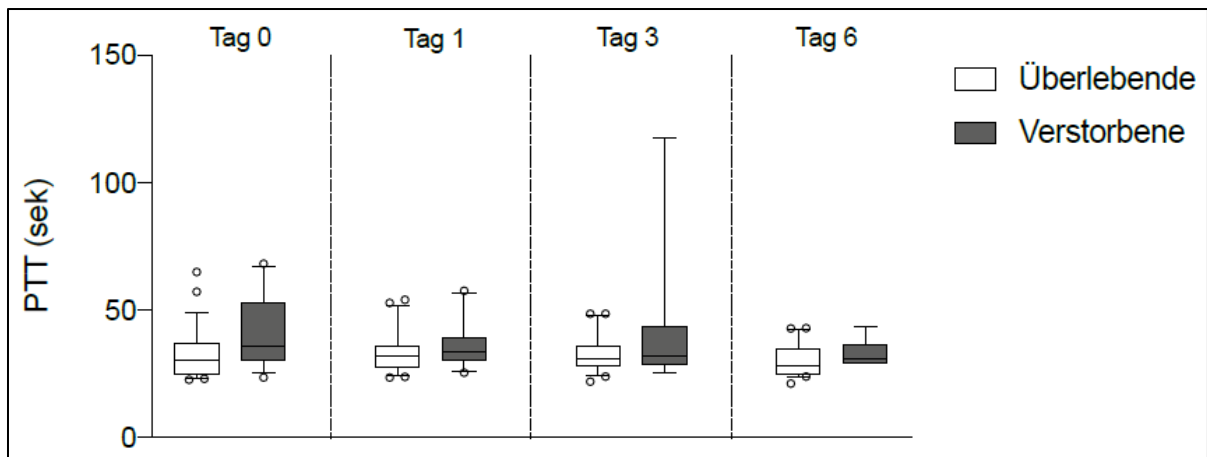


**Abbildung 21:** Boxplots der INR-Werte an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar; INR, International Normalized Ratio*

Die INR-Werte waren zu Studienbeginn und zum Ende der Studie hin in der Gruppe der Verstorbenen leicht höher als in der Gruppe der Überlebenden (Tag 0: Überlebende 1,18 vs. Nicht-Überlebende 1,21;  $p=0,15$ ; Tag 6: Überlebende 1,09 vs. Nicht-Überlebende 1,17;  $p=0,37$ ). Es konnte jedoch weder zu Beginn der Studie noch im weiteren Verlauf ein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenden und den Verstorbenen festgestellt werden ( $p>0,05$ ) (siehe **Abbildung 21**).

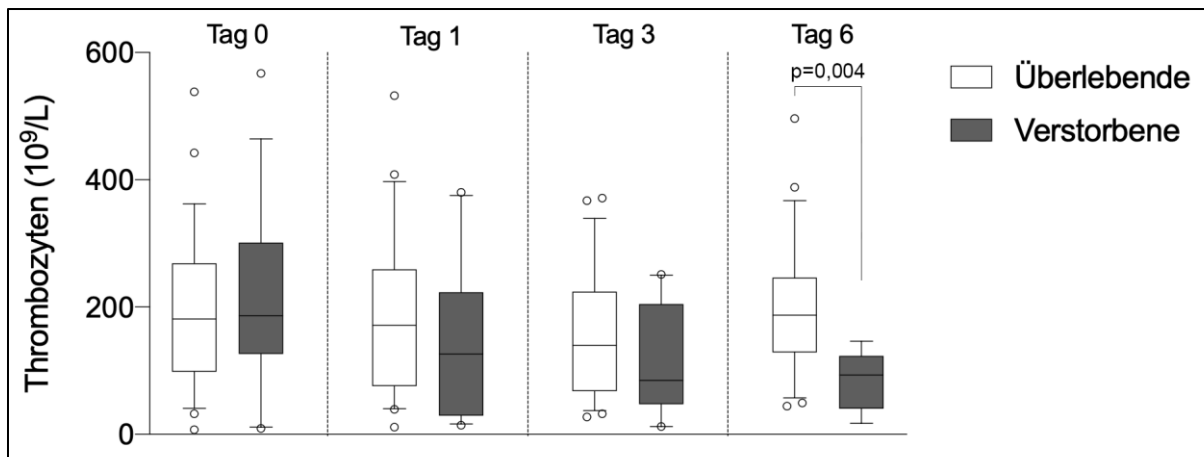




**Abbildung 22:** Boxplots der PTT-Werte (sek) an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar; PTT, partial thromboplastin time*

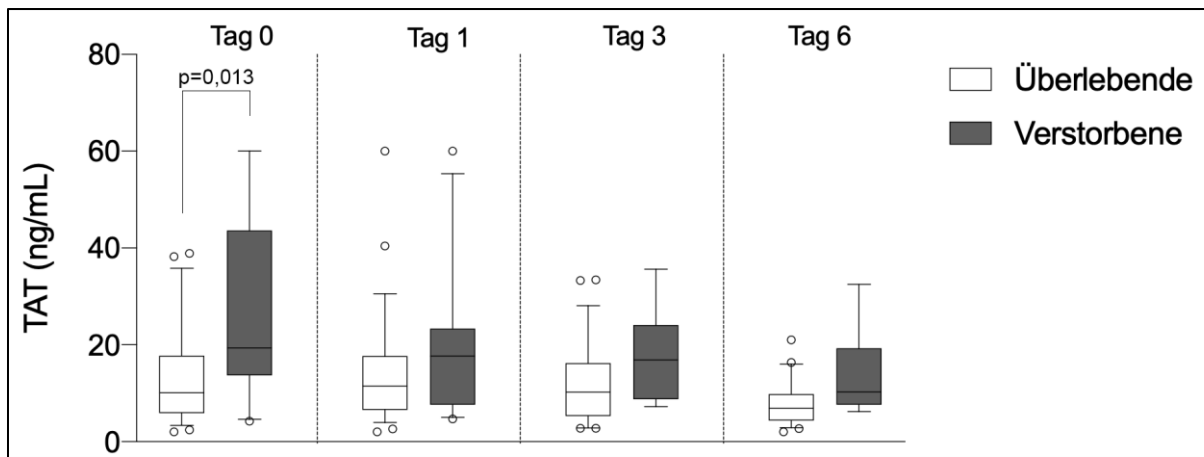
Zwischen den Subgruppen konnte kein signifikanter Unterschied der PTT-Werte festgestellt werden. Der Höchstwert (118 sek) wurde an Tag 3 in der Gruppe der Verstorbenen gemessen. Auch zu diesem Zeitpunkt zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den Verstorbenen (Überlebende 31 sek vs. Verstorbene 32 sek;  $p=0,51$ ) (siehe **Abbildung 22**).



**Abbildung 23:** Boxplots der Thrombozyten (10<sup>9</sup>/l) an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar*

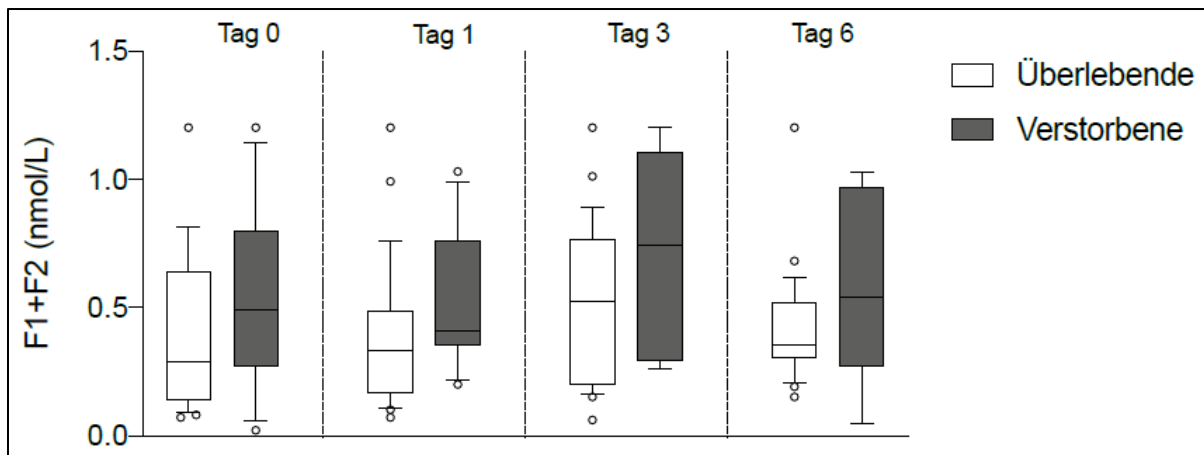
Die Thrombozyten waren zu Beginn der Studie in beiden Gruppen normwertig (Überlebende 181x10<sup>9</sup>/l vs. Nicht-Überlebende 186x10<sup>9</sup>/l; p=0,59). Nach 24 Stunden (Tag 1) waren die Thrombozyten in der Gruppe der Verstorbenen unterhalb des Referenzbereiches (Überlebende 171x10<sup>9</sup>/l vs. Nicht-Überlebende 126x10<sup>9</sup>/l; p=0,41). An Tag 3 zeigte sich in der Gruppe der Verstorbenen eine deutliche Thrombozytopenie (85x10<sup>9</sup>/l; IQR 58-192). Zwischen den Subgruppen konnte nur zum letzten Zeitpunkt der Studie (Tag 6) ein signifikanter Unterschied (Überlebende 187x10<sup>9</sup>/l vs. Nicht-Überlebende 93x10<sup>9</sup>/l; p=0,004) festgestellt werden (siehe **Abbildung 23**).



**Abbildung 24:** Boxplots der TAT-Werte (ng/ml) an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar; TAT, Thrombin-Antithrombin-Komplexe*

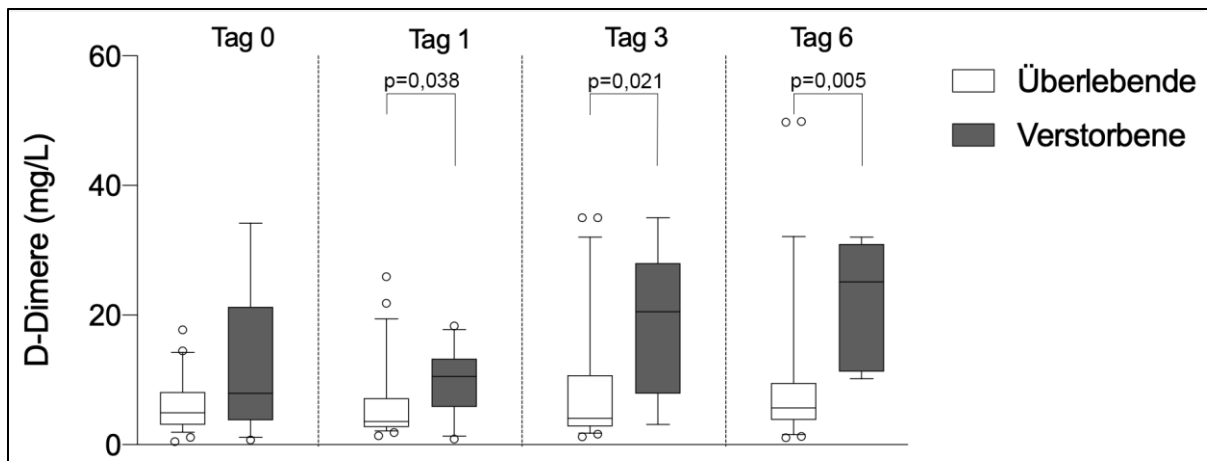
Die gemessenen TAT-Werte an Tag 0 waren in der Gruppe der Verstorbenen erheblich erhöht (19,4 ng/ml). Sie waren zu diesem Zeitpunkt signifikant höher im Vergleich zur Gruppe der Überlebenden (Verstorbene 19,4 ng/ml vs. Überlebende 10,1 ng/ml;  $p=0,01$ ). Im weiteren zeitlichen Verlauf nahmen die Werte in beiden Gruppen ab. An Tag 1 (Verstorbene 17,7 ng/ml vs. Überlebende 11,5 ng/ml;  $p=0,19$ ), Tag 3 (Verstorbene 16,9 ng/ml vs. Überlebende 10,2 ng/ml;  $p=0,10$ ) und Tag 6 (Verstorbene 10,3 ng/ml vs. Überlebende 6,9 ng/ml;  $p=0,07$ ) zeigten sich zunehmend niedrigere Werte. Deutlich zu erkennen ist, dass die Verstorbenen durchgehend höhere Werte aufwiesen als die Überlebenden. Es zeigte sich nur zu Beginn der Studie (Tag 0) ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Verstorbene 19,4 ng/ml vs. Überlebende 10,1 ng/ml;  $p=0,01$ ) (siehe **Abbildung 24**).



**Abbildung 25:** Boxplots der F 1+2-Werte (nmol/l) an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar; F 1+2, Prothrombinfragmente 1 und 2*

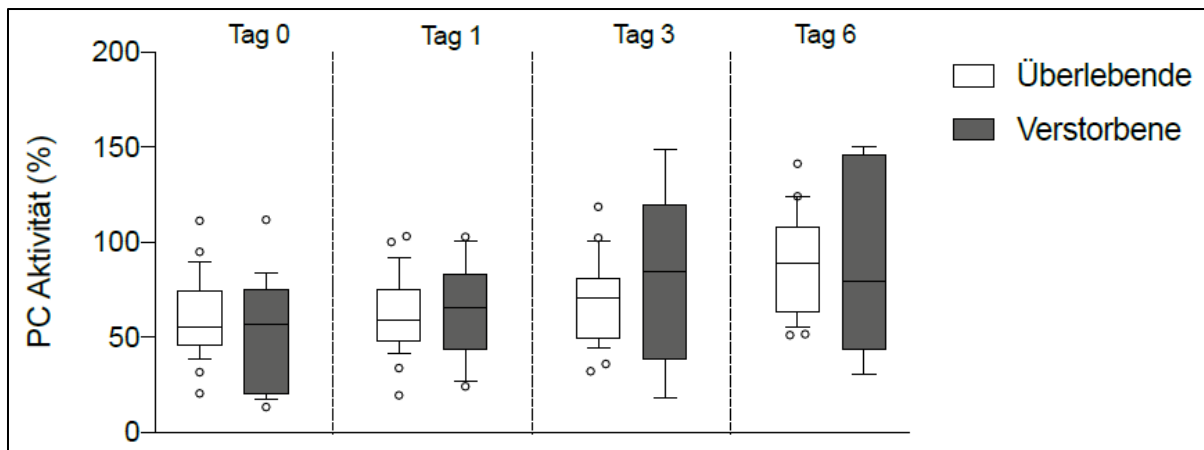
Die F 1+2 Werte waren zu Studienbeginn in der Subgruppe der Überlebenden leicht vermindert (0,30 nmol/l; IQR 0,10-0,60). In der Gruppe der Verstorbenen zeigten sich Normalwerte (0,50 nmol/l; IQR 0,30-0,80). Nach 24 Stunden waren die gemessenen F 1+2 Werte in beiden Gruppen normwertig (Referenzbereich 0,4-1,1 nmol/l). An Tag 3 zeigten sich in der Gruppe der Verstorbenen die meisten Höchtswerte (0,70 nmol/l; IQR 0,30-1,10). Es zeigte sich über den gesamten Zeitraum der Studie kein signifikanter Unterschied zwischen den Subgruppen ( $p > 0,05$ ) (siehe **Abbildung 25**).



**Abbildung 26:** Boxplots der D-Dimere (mg/l) an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar*

Die D-Dimere zeigten in der Subgruppe der verstorbenen Patienten eine stetige Erhöhung im Verlauf der Beobachtung. Ab dem zweiten Beobachtungstag (Tag 1) zeigten sich signifikante Unterschiede (Verstorbene 10,5 mg/l vs. Überlebende 3,6 mg/l;  $p=0,04$ ) im Vergleich zur Subgruppe der Überlebenden. Auch an den weiteren Zeitpunkten Tag 3 (Verstorbene 20,5 mg/l vs. Überlebende 4,1 mg/l;  $p=0,02$ ) und Tag 6 (Verstorbene 25,1 mg/l vs. Überlebende 5,7 mg/l;  $p<0,01$ ) waren signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen festzustellen (siehe **Abbildung 26**).



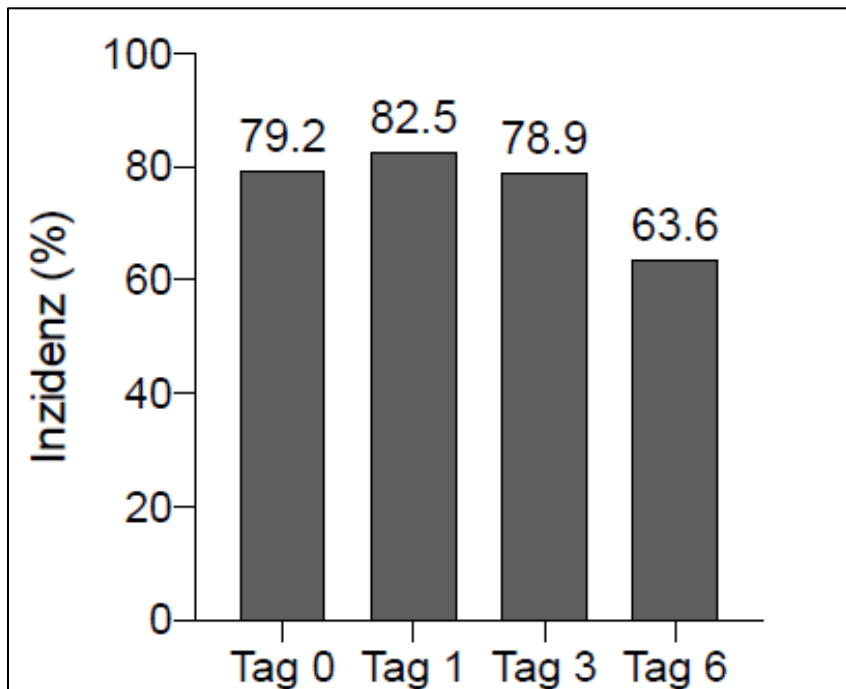
**Abbildung 27:** Boxplots der PC-Aktivität (%) an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar; PC-Aktivität, Protein C-Aktivität*

Die PC-Aktivität war zu Studienbeginn in der Gruppe der Überlebenden und in der Gruppe der Verstorbenen erheblich reduziert unter 70,0%. Bei den Verstorbenen wurde bei Studienbeginn (Tag 0) bei 19 (39,6%) Patienten eine PC-Aktivität unterhalb 70,0% gemessen. In der Gruppe der Überlebenden wurde bei 14 (29,2%) Patienten eine PC-Aktivität unterhalb 70% gemessen. Im weiteren Verlauf nahmen die Werte der PC-Aktivität in beiden Subgruppen kontinuierlich zu. Die Höchstwerte wurden an Tag 6 in der Gruppe der Verstorbenen gemessen (87,2%; IQR 63,25-107,68). Hier wurde bei 18 (37,5%) Patienten aus der Gruppe der Verstorbenen eine PC-Aktivität oberhalb 70% gemessen. Auch wenn die PC-Aktivität in der Gruppe der Verstorbenen stets höher war als in der Gruppe der Überlebenden, zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied (alle p-Werte >0,05) (siehe **Abbildung 27**).

### 3.3 Aktiviertes Protein C

APC lag bei 45 (93,5%) Patienten in mindestens einem Messwert innerhalb der vier Blutabnahmen über der LOQ. Bei allen Nicht-Überlebenden Patienten wurden erhöhte Messwerte festgestellt (siehe **Abbildung 30**). Die höchsten Werte wurden nach 24 Stunden (Tag 1) bei 33 (82,5%) Patienten gemessen (siehe **Abbildung 28**).

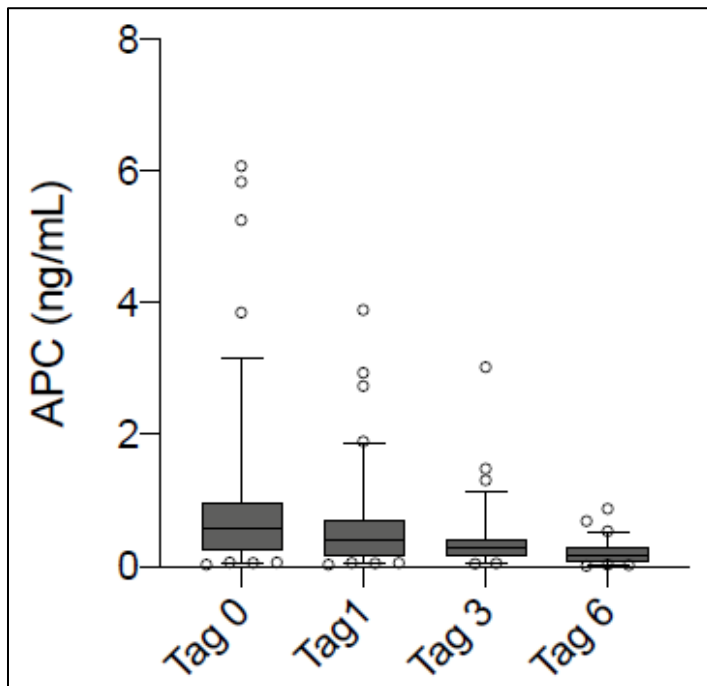


**Abbildung 28:** Balkendiagramm der Inzidenz-Werte (%) von APC oberhalb des LOQ in der Gesamtpopulation an Tag 0, 1, 3 und 6

*APC, aktiviertes Protein C; LOQ, limit of quantification*

Die Inzidenzwerte von APC oberhalb des LOQ nahmen im Laufe der Messungen initial bis zum Tag 1 zu und fielen dann kontinuierlich unterhalb des LOQ des OECA an Tag 6 ab. Die höchste Inzidenz zeigte sich an Tag 1 mit 82,5%. Ebenso zeigte sich bereits zu Beginn der Studie ein erhöhter Inzidenz Wert mit 79,2%. Am letzten Tag der Datenerhebung war die LOQ bereits auf 63,6% abgefallen.

## 3.3.1 Zeitlicher Verlauf von APC in der Gesamtpopulation



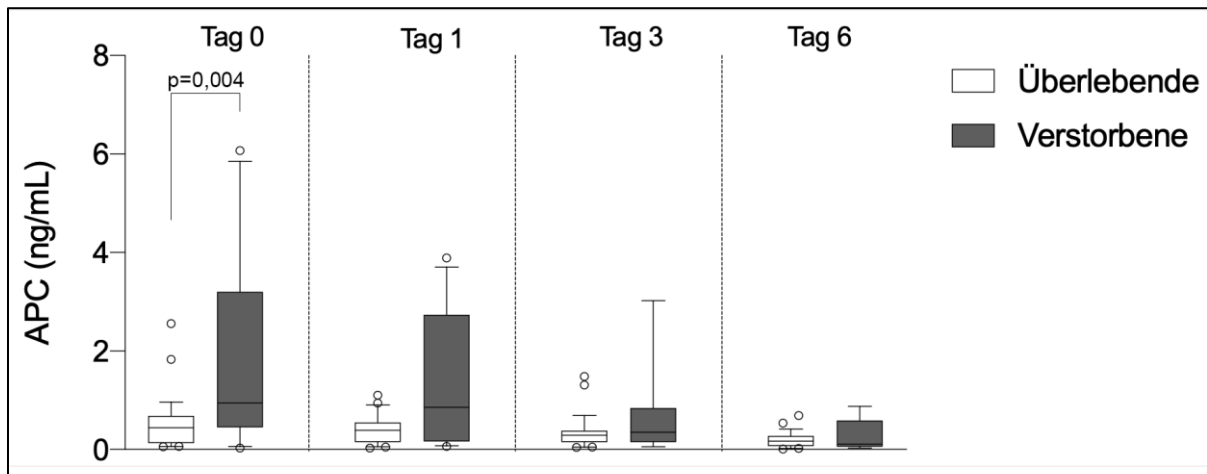
**Abbildung 29:** Boxplots der APC-Werte (ng/ml) in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar; APC, aktiviertes Protein C*

Zu Studienbeginn zeigten sich die Werte von APC in der Gesamtpopulation deutlich erhöht (0,59 ng/ml; IQR 0,27-0,93). Hier wurde auch der Maximalwerte mit 6,07 ng/ml gemessen. Im Verlauf zeigten die Werte des APC in der gesamten Studienkohorte eine kontinuierliche Abnahme von 0,59 ng/ml (IQR 0,27-0,93) zu Studienbeginn, zu 0,40 ng/ml (IQR 0,17-0,67) an Tag 1, zu 0,29 ng/ml (IQR 0,16-0,40) an Tag 3 und auf 0,16 ng/ml (IQR 0,07-0,28) an Tag 6 in der Gesamtpopulation. **Abbildung 29** stellt den Verlauf der APC-Werte der Gesamtpopulation graphisch dar.



## 3.3.2 Zeitlicher Verlauf von APC im Vergleich Überlebende versus Verstorbene



**Abbildung 30:** Boxplots der APC-Werte (ng/ml) an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene

*Die Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil; der Teiler entspricht dem Median; die Whisker entsprechen den 95%-Konfidenzintervallen; die Kreise stellen Ausreißer dar; APC, aktiviertes Protein C*

Als primärer Endpunkt der Studie wurde der Zusammenhang zwischen APC und der Mortalität untersucht. Im Vergleich der Verstorbenen mit den Überlebenden zeigten sich zu Beginn der Studie (Tag 0) signifikant höhere Messwerte in der Gruppe der Verstorbenen (Überlebende 0,44 ng/ml vs. Verstorbene 0,95 ng/ml;  $p < 0,004$ ). Im weiteren Verlauf zeigte sich das APC in beiden Subgruppen abnehmend. So wurden an den weiteren Zeitpunkten Tag 1 (Verstorbene 0,86 ng/ml vs. Überlebende 0,39 ng/ml;  $p = 0,18$ ), Tag 3 (Verstorbene 0,35 ng/ml vs. Überlebende 0,29 ng/ml;  $p = 0,40$ ) und Tag 6 (Verstorbene 0,11 ng/ml vs. Überlebende 0,17 mg/l;  $p = 0,94$ ) kontinuierlich niedrigere Werte gemessen. Es zeigte sich bis auf Tag 0 kein signifikanter Unterschied zwischen der Subgruppe der Überlebenden und Verstorbenen. Der höchste Wert wurde zu Studienbeginn in der Gruppe der Verstorbenen erreicht mit 6,07 ng/ml. Eine graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der APC-Werte im Vergleich der Subgruppen findet sich in **Abbildung 30**.

### 3.4 Korrelation der Parameter

Die Korrelationsanalyse als sekundärer Endpunkt der Studie zeigte signifikante Korrelationen zwischen APC und den Gerinnungsparametern. So konnte zu Studienbeginn (Zeitpunkt d0) ein positiver, signifikanter Zusammenhang zwischen APC und TAT ermittelt werden ( $r=0,674$ ;  $p<0,001$ ). Ebenso bestand zwischen APC und den D-Dimeren ( $r=0,411$ ;  $p=0,004$ ), sowie zwischen APC und F 1+2 ( $r=0,371$ ;  $p=0,010$ ) ein positiver, signifikanter Zusammenhang. 24 Stunden nach Studienbeginn (Zeitpunkt d1) konnte ein positiver signifikanter Zusammenhang zwischen APC und TAT ( $r=0,402$ ;  $p=0,010$ ), sowie zwischen APC und den D-Dimeren ( $r=0,332$ ;  $p=0,037$ ) gefunden werden. Auch nach 72 Stunden (Zeitpunkt d3) bestand ein positiver, signifikanter Zusammenhang zwischen APC und TAT ( $r=0,500$ ;  $p=0,001$ ), APC und D-Dimeren ( $r=0,435$ ;  $p=0,006$ ), sowie zwischen APC und F 1+2 ( $r=0,437$ ;  $p=0,006$ ). Zum letzten Zeitpunkt der Datenerhebung (d6) waren insgesamt weniger signifikante Korrelationen wie zu Beginn der Datenerhebung zu finden. Hier konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen APC und einem etablierten Gerinnungsparameter ermittelt werden. Eine Zusammenfassung der Korrelationen ist in **Tabelle 11** dargestellt. Eine Korrelation der Parameter mit einer DIC konnte in unserer Studie nicht festgestellt, da in keiner der beiden Subgruppen eine manifeste DIC beobachtet werden konnte.

**Tabelle 11: Spearankorrelationen von APC mit Gerinnungsparametern zu den Zeitpunkten d0, d1, d3, d6**

\*  $p<0,05$ ; die  $p$ -Werte geben die Korrelation zwischen APC und den Gerinnungsparametern an den entsprechenden Studienzeitpunkten wieder

APC, aktiviertes Protein C; d, Tag; F 1+2, Prothrombinfragment 1 und 2; INR, International Normalized Ratio; PC-Aktivität, Protein C-Aktivität; PTT, partial thromboplastin time; TAT, Thrombin-Antithrombin-Komplex

	APC d0	APC d1	APC d3	APC d6
1 D-Dimere	0,411*	0,332*	0,435*	0,280
2 TAT	0,674*	0,402*	0,500*	0,156
3 F 1+2	0,371*	0,252	0,437*	0,182
4 Thrombozyten	0,047	0,115	-0,047	0,004
5 INR	0,054	0,243	0,227	0,023
6 PTT	-0,046	-0,197	-0,05	-0,395
7 PC-Aktivität	-0,238	-0,216	-0,341	-0,297

### 3.5 APC und Mortalität

Als Sekundärer Endpunkt wurde die diagnostische Wertigkeit der APC-Werte hinsichtlich der 28-Tage Mortalität evaluiert. Hierzu kalkulierten wir *Cutoff*-Werte und führten ROC-Analysen durch. Die *Cutoff*-Werte wurden hierbei mit Hilfe des *Youden*-Index berechnet. Dazu wurden jeweils die Maximal- bzw. Minimalwerte verwendet, um einen *Cutoff* mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität zu ermitteln.

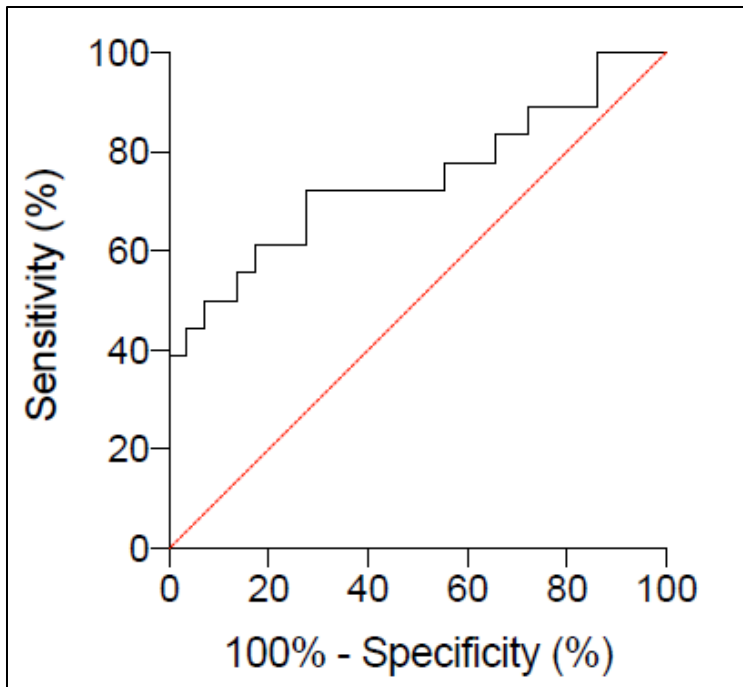
**Tabelle 12: ROC-Analysen, Cutoff-Werte und AUC**

APC, aktiviertes Protein C; AUC, area under the curve; F 1+2, Prothrombinfragment 1 und 2; INR, International Normalized Ratio; max, Maximalwert; min, Minimalwert; PC-Aktivität, Protein C-Aktivität; PTT, partial thromboplastin time; TAT, Thrombin-Antithrombin-Komplex

	<b>Cutoff-Wert</b>	<b>AUC</b>
D-Dimere max	≥ 21,23	0,662
TAT max	≥ 22,5	0,667
F 1+2 max	≥ 1,03	0,534
Thrombozyten min	≥ 217	0,570
INR max	≤ 1,21	0,547
PTT max	≥ 58,5	0,602
APC max	≥ 0,776	0,757
PC-Aktivität min	≤ 40,7	0,544

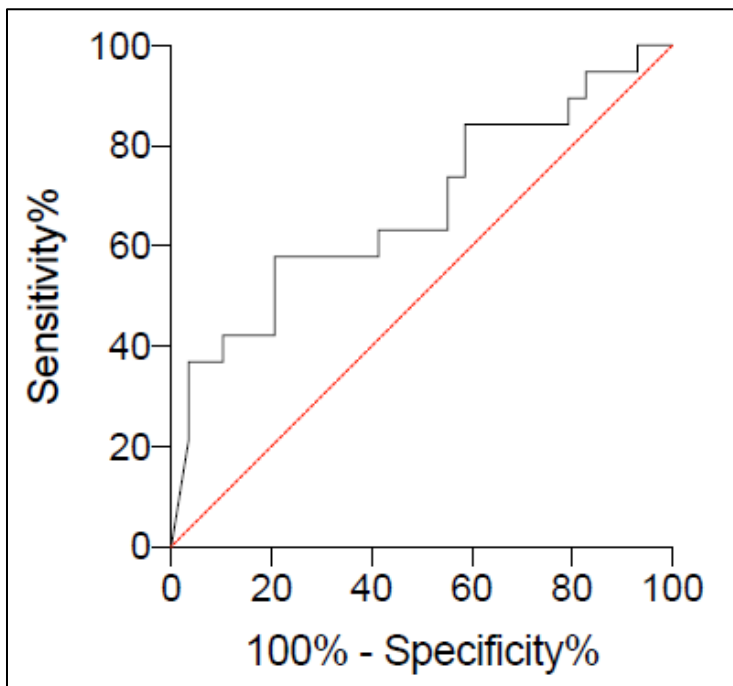
Die ROC-Analysen erbrachten eine AUC von 0,76 für APC, eine AUC von 0,67 für TAT und eine AUC von 0,66 für die D-Dimere. Die AUC von TAT ist insgesamt als „schwach“, die AUC von APC als „ausreichend“ einzuordnen (Safari et al., 2016). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der AUC von APC und TAT ( $p=0,332$ ). Alle *Cutoff*-Werte der Parameter mit der entsprechenden AUC sind in **Tabelle 12** dargestellt.

Für die Berechnung des Zusammenhangs zwischen APC und der 28-Tage-Mortalität konnten die Daten von insgesamt 47 Patienten verwendet werden. Der beste *Cutoff*-Wert für die Mortalität wurde für APC-Werte über 0,77 ng/ml berechnet. Dies ergab eine Sensitivität von 72,2% und eine Spezifität von 72,4%. Die Anzahl der richtig Positiven lag bei 61,9%. Die Anzahl der richtig Negativen lag bei 80,8%. Die ROC-Kurve von APC ist in **Abbildung 31** dargestellt. Der beste *Cutoff*-Wert für die Mortalität wurde für TAT-Werte über 22,5 ng/ml berechnet (Sensitivität 65,5%, Spezifität 65,5%). Die Roc-Kurve von TAT ist in **Abbildung 32** dargestellt.



**Abbildung 31:** ROC-Kurve von APC für die Vorhersage der Mortalität

Die schwarze Linie stellt die ROC-Kurve mit der AUC für APC dar; die rote Linie beschreibt die AUC 0,5; APC, aktiviertes Protein C; AUC, area under the curve; max, maximal; ROC, receiver operating characteristics



**Abbildung 32:** ROC-Kurve von TAT für die Vorhersage der Mortalität

Die schwarze Linie stellt die ROC-Kurve mit der AUC für TAT dar; die rote Linie beschreibt die AUC 0,5; AUC, area under the curve; max, maximal; ROC, receiver operating characteristics; TAT, Thrombin-Antithrombin-Komplex

**Tabelle 13: Kreuztabelle APC**Cutoff von  $APC \geq 0,77$  ng/ml; APC, aktiviertes Protein C

			Überlebende	Verstorbene	Gesamt
APC Cutoff	< Cutoff	Anzahl	21	5	26
		% innerhalb Cutoff	80,8%	19,2%	100%
	≥ Cutoff	Anzahl	8	13	21
		% innerhalb Cutoff	38,1%	61,9%	100%
Gesamt	Anzahl	29	18	47	
	% innerhalb Cutoff	61,7%	38,3%	100%	

Insgesamt betrachtet lagen 26 Fälle unterhalb des *Cutoffs* von APC und 21 Fälle oberhalb des *Cutoffs* von APC ( $\geq 0,77$  ng/ml). Die Population unterhalb des *Cutoffs* für APC zeigte 21 (80,8%) Überlebende und 5 (19,2%) Verstorbene. In der Population oberhalb des *Cutoffs* ( $APC \geq 0,77$  ng/ml) waren 8 (38,1%) Überlebende und 13 (61,9%) Verstorbene (siehe **Tabelle 13**).

Die Analyse des prädiktiven Nutzens von APC hinsichtlich der 28-Tage-Mortalität als sekundären Endpunkt zeigte einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen APC-Werten oberhalb des *Cutoffs* ( $APC \geq 0,77$  ng/ml) und der Mortalität ( $\chi^2 = 8,953$ ;  $p < 0,003$ ). Patienten mit APC-Werten oberhalb des *Cutoff*-Wertes hatten ein signifikant höheres Risiko an einem *septischen Schock* zu versterben. Statistisch signifikante Zusammenhänge zeigten sich ebenfalls für D-Dimere ( $\chi^2 = 8,392$ ;  $p < 0,004$ ) und TAT ( $\chi^2 = 6,947$ ;  $p < 0,008$ ). Die Effektstärke wurde mit Hilfe von Cramer's V berechnet. Es zeigt sich die größte Effektstärke mit Cramer's V von 0,436 für APC, gefolgt von Cramer's V von 0,418 für D-Dimere und 0,380 für TAT. Als weiterer sekundärer Endpunkt der Studie wurde der Einfluss von unterschiedlichen Parametern auf die 28-Tage-Mortalität untersucht. Hierzu wurde eine univariate, logistische Regression durchgeführt. Hierbei wurden folgende Variablen als mögliche Einflussgrößen auf die Mortalität verwendet: Geschlecht, Alter, APC max, TAT max, APACHE II Score und Nierenversagen im Verlauf. Als Prädiktoren für die 28-Tage Mortalität konnten das Nierenversagen im Verlauf (OR 4,04; 95%-KI 1,13-14,02;  $p = 0,03$ ), der APACHE II Score (OR 1,13; 95%-KI 1,03-1,22;  $p = 0,04$ ), die TAT-Komplexe (OR 1,13; 95%-KI 1,01-1,92;  $p = 0,04$ ) und APC (OR 2,93; 95%-KI 1,23-7,31;  $p = 0,02$ ) ermittelt werden. Die weitere Analyse mittels multivariater logistischer Regression, identifizierte APC (OR 4,253; 95%-KI 1,28-14,11;  $p = 0,018$ )

und das Nierenversagen im Verlauf (OR 0,047; 95%-KI 0,003-0,75;  $p=0,031$ ) als unabhängige Prädiktoren für die 28-Tage Mortalität (siehe **Tabelle 14**).

**Tabelle 14: Multivariate logistische Regression**

*APC, aktiviertes Protein C; APACHE, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; KI, Konfidenzintervall; max, maximal; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; TAT, Thrombin-Antithrombin-Komplex*

Parameter	Odds-Ratio	p-Wert	95%-KI Odds-Ratio	Nagelkerkes R <sup>2</sup>
<b>Geschlecht</b>	0,534	0,576	[0,059-4,806]	0,530
<b>Alter</b>	1,069	0,242	[0,956-1,194]	
<b>APC max</b>	4,253	0,018	[1,282-14,106]	
<b>TAT max</b>	1,055	0,183	[0,975-1,142]	
<b>APACHE II Score</b>	1,133	0,283	[0,902-1,423]	
<b>Nierenversagen im Verlauf</b>	0,047	0,031	[0,003-0,751]	

Das Modell weist mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,530 (Nagelkerkes R-Quadrat) eine sehr gute Güte auf.

## 4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Analyse des diagnostischen Nutzens eines OECA-Testverfahrens zur Bestimmung von APC bei Patienten im *septischen Schock*. Dazu konnten 48 Patienten über den Zeitraum eines Jahres in die Studie eingeschlossen werden. Als primärer Endpunkt wurde die Assoziation von APC mit der 28-Tages Mortalität definiert. Als sekundäre Endpunkte wurden die Korrelation von APC mit etablierten Gerinnungsparametern, die diagnostische Wertigkeit von APC, sowie der prädiktive Nutzen von APC hinsichtlich der 28-Tage Mortalität festgelegt. In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass in der initialen Phase der Sepsis die APC-Werte in der Gruppe der Verstorbenen signifikant höher sind und mit etablierten Gerinnungsparametern korrelieren. Des Weiteren sind erhöhte APC-Werte zu Beginn der Sepsis unabhängige Prädiktoren für die 28-Tage Mortalität. Das OECA-Verfahren stellt für die Messung von APC eine schnelle, hoch sensitive und für den klinischen Alltag gut durchführbare Methode dar. In der nachfolgenden Diskussion werden die Ergebnisse der Studie im Hinblick auf die aktuelle Studienlage diskutiert.

### 4.1 Diskussion der Testmethode

Bisher gibt es keine etablierte Messmethode im klinischen Alltag zur Bestimmung von endogen zirkulierendem APC. Insgesamt ist die Quantifizierung von APC durch die kurze Halbwertszeit von nur 20 Minuten, bei kontinuierlicher Inaktivierung durch endogene Inhibitoren, schwierig (Müller et al., 2012). Ebenso besteht beim Nachweis von Proteinen in humanen Plasmaproben eine generelle Herausforderung. Das humane Plasma besteht aus einer Vielzahl verschiedener Proteine, von denen die 22 häufigsten 99% der Proteinmasse ausmachen (Lao et al., 2009). Dies macht die enorme Herausforderung deutlich, Proteine zu detektieren, die nur in niedrigen Konzentrationen vorkommen, geringe Halbwertszeiten aufweisen und strukturell ähnliche Zymogene besitzen.

Aufgrund der wichtigen physiologischen Rolle von APC in der Entwicklung zahlreicher Erkrankungen, jedoch aktuell noch fehlender etablierter Messmethoden, sind in der Literatur zahlreiche Methoden zur Bestimmung von APC beschrieben worden. Oto et al. fassten in einem review von 2020 alle bisherigen Methoden zur APC-Bestimmung zusammen (Oto et al., 2020). Insgesamt konnten alle bisherigen Verfahren in drei Kategorien zusammengefasst werden. Dabei wurden ECA-Verfahren

(Gruber and Griffin, 1992; Liaw et al., 2003; Orthner et al., 1993), Sandwich-ELISA Verfahren (España et al., 2001; Fernández et al., 2006; Martos et al., 2016) und Aptamer-basierte Biosensoren (Erdem and Congur, 2014; Hosseini Ghalehno et al., 2019; Koyun et al., 2019) verwendet.

Die ECA-Assays basieren auf einem monoklonalen oder polyklonalen Antikörper, welcher APC bindet. Hierbei wird die amidolytische Aktivität von APC als Enzym genutzt und die Umsetzung eines spezifischen chromogenen Substrates gemessen. Die LOD dieses Messverfahrens liegt bei 5 pmol/l (Gruber and Griffin, 1992; Liaw et al., 2003). Im Vergleich zu dem von uns verwendeten OECA-Verfahren mit einer LOD von 0,39 pmol/l (0,02 ng/ml) ist das ECA-Verfahren weniger sensitiv (Müller et al., 2012). Die Dauer für die Durchführung dieses Testverfahrens liegt bei 19 bis 300 Stunden (Gruber and Griffin, 1992; Liaw et al., 2003). Dies eignet sich nur bedingt für den klinischen Alltag.

Für die Durchführung eines Sandwich-ELISA Verfahrens werden zwei Antikörper benötigt. Einen monoklonalen anti-PC-Antikörper und einen anti-PC-Inhibitor-Antikörper. Hierbei wird die APC-Konzentration aus der Differenz der Konzentrationen an APC-PCI-Komplexen in den beiden Antikörper-Proben bestimmt. Die Durchführung dauert circa 4 Stunden. Es erfolgt keine direkte Messung von APC. Das von Fernandez et al. entwickelte ELISA-Verfahren wurde bisher nur im Tiermodell bei Mäusen untersucht (Fernández et al., 2006). Eine weitere Studie zur Quantifizierung von APC mittels ELISA von 2016 misst die Summe von frei zirkulierendem APC und APC-PCI-Komplexen, wodurch eine exakte Messung von APC nur bedingt möglich ist (Martos et al., 2016).

Die neueste Generation von APC-Testverfahren nutzt Aptamer-basierte Biosensoren mit Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) oder Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) (Erdem and Congur, 2014; Hosseini Ghalehno et al., 2019; Koyun et al., 2019). Ghalehno et al. beschrieben die Verwendung eines selektiven und einfachen elektrochemischen Aptasensors mit Gold Nanopartikeln unter Verwendung von Methylenblau als Redoxindikator. Hier konnten APC-Konzentrationen ab 1,78 pmol/l (0,073 ng/ml) detektiert werden. Bisher wurde dieses Assay jedoch noch nicht in Studien mit humanen Plasmaproben durchgeführt (Hosseini Ghalehno et al., 2019).



Alle bisherigen Methoden zur Messung von APC unterscheiden sich deutlich hinsichtlich der LOD, des notwendigen Plasmavolumens der zu untersuchenden Probe, sowie der Bearbeitungszeit bis zum Vorliegen des Testergebnisses.

Das OECA-Verfahren wurde bisher nur in der Studie von Müller et al. angewendet. Auffällig ist hierbei die niedrige LOD im Vergleich zu anderen Messverfahren. Ebenso fällt das APC bei Gesunden, laut Müller et al., beim OECA-Verfahren unter die Bestimmungsgrenze (LOD) und ist somit weder nachweisbar noch messbar. APC ist demnach ca. 50-125-mal niedriger beim Gesunden, als dies in anderen Verfahren der Fall ist, wohingegen bei anderen Messmethoden auch bei Gesunden ein APC zwischen 23 pmol/l und 41 pmol/l gemessen werden konnte (Liaw et al., 2003; Martos et al., 2016). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die APC-Konzentration, die bei Müller et al. zur Generierung der Kalibrierungskurve verwendet wurde, unterschätzt wurde (Oto et al., 2020). Müller dagegen begründet die niedrige LOD und hohe Sensitivität durch das hochspezifische Aptamer HS02-52G (Müller et al., 2012).

Die Kalibrierung des OECA-Verfahrens wurde mit zwei verschiedenen APC Varianten durchgeführt: rAPC (Xigris®) und *plasma derived APC* (aus Plasma gewonnenes APC, pAPC). Bei identischen Konzentrationen beider Produkte wurden durchweg höhere Messwerte für rAPC gemessen. Dies ist wahrscheinlich auf die höhere Reinheit, sowie auf ein anderes Glykosilierungsmuster von rAPC zurückzuführen (Müller et al., 2012). Zur Kalibrierung des OECA-Verfahrens wurde daher das pAPC verwendet, um eine Unterschätzung der APC-Plasmaspiegel zu vermeiden. Die LOD des Assays wurde bei 0,02 ng/ml (0,39 pmol/l) festgelegt und stellt eine im Vergleich zu anderen Messmethoden niedrigere Nachweisgrenze dar. Die erhöhte Sensitivität des OECA-Testverfahrens kann die hohe Prävalenz der Patienten mit erhöhten APC-Werten in unserer Studie erklären. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer Vereinheitlichung der Tests zur Vergleichbarkeit zwischen Laboren und Messmethoden.

Mit 100µl Plasmavolumen ist das benötigte Plasmavolumen für das OECA-Verfahren im Vergleich zu den meisten Messmethoden niedrig. Die benötigten Plasmavolumen reichen je nach Messmethode von 2,5µl bis 9000µl (Bauer et al., 1984; Takazoe et al., 1999). Das geringe Plasmavolumen lässt somit eine Bestimmung im Rahmen einer laborchemischen Routineuntersuchung im klinischen Alltag sicherstellen.

Das OECA-Verfahren bietet mit einer circa 7-stündigen Gesamtbearbeitungszeit eine, im Vergleich zu anderen Verfahren, schnellere Durchführung. Vergleichbare Messmethoden brauchen zwischen 3 bis 300 Stunden von der Probenentnahme bis zum Testergebnis (Gruber and Griffin, 1992; Liaw et al., 2003). Eine Gesamtbearbeitungsdauer von 7 Stunden würde einen Gebrauch im klinischen Alltag mit Hinblick auf ein zeitnahes Monitoring bei rAPC-Gabe, sowie zur frühzeitigen Therapieevaluation bei erhöhten prognostischen Mortalitätsmarkern ermöglichen. Vorteile von Aptamer-basierten Testverfahren im Vergleich zu Antikörper-basierten Verfahren sind die thermische Stabilität der Aptamere. Sie weisen im Vergleich zu Antikörper-basierten Messmethoden auch keine Immunität auf. Insgesamt sind Aptamere leicht und günstig zu produzieren und sind ebenso einfach zu inaktivieren. Sie lassen sich einfach modifizieren und besitzen eine hohe Spezifität und Affinität zu ihrem Liganden. Ebenso konnte ein Einfluss des Aptamers auf die Aktivität von APC für das OECA-Verfahren nicht nachgewiesen werden (Müller et al., 2012).

Zusammenfassend bietet die Messung von APC mittels OECA-basiertem Testverfahren ein standardisiertes Testsystem mit einer niedrigen LOD, kombiniert mit einer Gesamtbearbeitungszeit von nur 7 Stunden, im Vergleich zu anderen Antikörper-basierten Testverfahren.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Primärer Endpunkt

Als primärer Endpunkt wurde die Assoziation von APC mit der 28-Tage-Mortalität definiert. In unserer Studie zeigten sich zu Studienbeginn bei 93,5% der Patienten im *septischen Schock* erhöhte APC-Werte. Die höchsten Werte wurden nach 24 Stunden bei 82,5% der Patienten gemessen. In der Subgruppe der Verstorbenen zeigten sich zu Studienbeginn signifikant höhere APC-Werte als in der Gruppe der Überlebenden ( $p=0,004$ ).

Vorausgegangene Studien bei Patienten mit Sepsis und im *septischen Schock* berichten von heterogenen Ergebnissen in Bezug auf die Prävalenz erhöhter APC-Werte. Die Forschergruppe um Liaw et al. konnte in ihrer Studie, mittels eines ELISA-basierten Assays mit einem *capture* Antikörper erhöhte APC-Werte zu Studienbeginn bei 32 Patienten mit schwerer Sepsis nachweisen (Liaw et al., 2004). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, zeigte diese Studie erhöhte APC-Werte in der Gruppe der Überlebenden. Mit dem gleichen Assay Format zeigte die Arbeitsgruppe um De Kleijn

erhöhte APC-Werte bei 32 Kindern mit schwerer Meningokokken Sepsis (de Kleijn et al., 2003). Hier wurden ebenso wie in unserer Studie erhöhte APC-Werte in der Gruppe der Verstorbenen gefunden. Hingegen dieser Studien und unseren Ergebnissen, ist in anderen Studien nur von einem kleinen Prozentsatz erhöhter APC-Werte bei Patienten mit Sepsis und *septischem Schock* die Rede (Bernard et al., 2001b; Mesters et al., 2000). Die hohe Sensitivität des OECA-Verfahrens stellt eine mögliche Erklärung für die hohe Prävalenz von Patienten mit erhöhten APC-Werten in unserer Studie dar.

Die initial erhöhten APC-Werte bei allen Verstorbenen und bei der Mehrheit der Überlebenden lassen auf eine initial suffiziente endotheliale Funktion schließen, welche die initiale Generierung von APC ermöglicht. Zur Generierung von APC ist ein funktionsfähiger Thrombomodulin-Thrombin-Komplex, die Integrität des EPCR, sowie das Vorhandensein seines Zymogens PC, sowie Thrombin notwendig (Colbert and Schmidt, 2016; Elisen et al., 1998; Mohan Rao et al., 2014). Die Integrität des Endothels lässt sich jedoch ohne simultane Untersuchung entsprechender endothelialer Parameter, wie Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), nicht sicher beurteilen. Hier wären weitere Studien, welche den Nutzen von APC als Surrogatparameter für die endotheliale Funktion analysieren, notwendig.

Nach dem initialen Anstieg von APC, sank im Verlauf der Studie das APC innerhalb der ersten 48 Stunden stark herab, einhergehend mit einer abnehmenden Thrombinbildung, welche sich durch die Abnahme der TAT-Komplexe widerspiegelte. Dies deckt sich mit der Charakterisierung des Protein C/APC-Systems bei Patienten mit MODS und schwerer Sepsis in einer vorausgegangen Studie (Borgel et al., 2007). Die rasche Abnahme von APC nach 48 Stunden lässt sich durch unterschiedliche Faktoren erklären. Zum einen könnte durch die endotheliale Dysfunktion im Rahmen der Sepsis eine suffiziente Aktivierung von PC nicht mehr gegeben sein. Ebenso ist die Abnahme von Thrombin und somit die herabgesetzte Aktivierung von PC zu APC eine mögliche Ursache für den Abfall des APC im Verlauf. Gleichzeitig könnte durch die Zunahme der Aktivität des PCI der abnehmende Verlauf erklärt werden. Die Ergebnisse unserer Studie legen nahe, dass eine abnehmende Gerinnungsaktivierung eine wichtige Rolle spielen könnte. Dies wird durch die abnehmende Thrombingenerierung im Verlauf, sowie die signifikante Korrelation zwischen APC und TAT unterstützt. Die TAT-Komplexe sind hier als Maß für die zunehmende Inhibierung

von Thrombin und die damit einhergehende Abnahme der Gerinnungsaktivierung zu interpretieren.

Die PC-Aktivität war initial (d0) in der Gesamtpopulation erniedrigt und stieg im Laufe der Studie kontinuierlich bis an Tag 6 an. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen erniedrigtem PC und erhöhter Mortalität im *septischen Schock*, wie er in zahlreichen Studien nachgewiesen ist, konnte in unserer Studie nicht nachgewiesen werden (Alcaraz et al., 1995; Fijnvandraat et al., 1995; Fourrier et al., 1992; Hazelzet et al., 1994; Hesselvik et al., 1991; Leclerc et al., 1992; Lin et al., 2008; Lorente et al., 1993; Marlar et al., 1985; Orwoll et al., 2015; Powars et al., 1987, 1993; Román et al., 1992; Sapru et al., 2015). Es lässt sich in unserer Studie eine tendenziell negative Korrelation zwischen APC und seinem Zymogen PC nachweisen. Im Verlauf nahm die Thrombin Konzentration ab, einhergehend mit einer abnehmenden Aktivierung von PC zu APC. Es resultierten abnehmende APC-Werte und eine zunehmende PC-Aktivität im Verlauf, da die abnehmenden Thrombin-Konzentrationen für eine abnehmende Aktivierung von PC zu APC verantwortlich sind. Dies wird durch Mesters et al. unterstützt (Mesters et al., 2000). Dem gegenüber steht die Annahme, dass erniedrigte PC-Werte mit erniedrigten APC-Werten einhergehen (Bernard et al., 2001b; Faust et al., 2001; Yan and Dhainaut, 2001).

#### 4.2.2 Sekundärer Endpunkt

Als einer der sekundären Endpunkte der Studie wurde die diagnostische Wertigkeit von APC analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die APC-Werte in der Gruppe der verstorbenen Patienten mit *septischem Schock* zu Studienbeginn signifikant höher sind als in der Gruppe der Überlebenden. Es zeigte sich ebenso ein signifikanter Zusammenhang zwischen den APC-Werten oberhalb des *Cutoffs* und der Mortalität. Dies geht mit einer Sensitivität von 72,2% und eine Spezifität von 72,4% einher. Patienten im *septischen Schock* mit APC-Werten  $\geq 0,776$  ng/ml hatten ein signifikant höheres Risiko innerhalb von 28 Tagen zu versterben. Erhöhte APC-Werte konnten zudem als unabhängige Prädiktoren für die 28-Tage-Mortalität in unserer Studie identifiziert werden.

Ein Zusammenhang von erhöhten APC-Werten mit der Mortalität zeigte sich bisher nur in wenigen Studien. So unterstützen die Ergebnisse von de Kleijn et al. unsere Studie,

welche erhöhte APC-Werte, bei 27 von 28 Kindern mit Meningokokken Sepsis und Purpura fulminans, nach Gabe von PC identifizieren konnten (de Kleijn et al., 2003). Zur Messung von APC wurde in dieser Studie der ECA von Gruber et al. verwendet mit einer LOD von 2,5 ng/ml und einer Bearbeitungsdauer von bis zu mehreren Tagen (Gruber and Griffin, 1992). APC zeigte in dieser Studie eine starke Korrelation mit TAT. Ein signifikanter Unterschied des APC-TAT-Verhältnisses zwischen den Überlebenden und Verstorbenen konnte hier nachgewiesen werden. Das APC-TAT Verhältnis war in der Gruppe der Verstorbenen signifikant höher und unterstreicht die Aussage unserer Studie im Hinblick auf erhöhte APC-Werte in der Gruppe der Verstorbenen. Liaw et al. unterstützt unsere Studienergebnisse im Hinblick auf erhöhte APC-Werte bei Patienten mit Sepsis (Liaw et al., 2004). In einer Studie mit 32 Patienten mit schwerer Sepsis konnten erhöhte APC-Werte bei 20 von 32 Patienten gefunden werden. Im Gegensatz zu unserer Studie, waren hier jedoch die APC-Werte in der Gruppe der Überlebenden signifikant erhöht. Als Messmethode wurde ein ECA mit einem monoklonalen Antikörper mit einer LOD von 2,5 ng/ml verwendet. Die Inkubationszeit betrug in diesem Assay circa 19 Stunden (Liaw et al., 2003). Eine weitere Studie untersuchte 26 Patienten mit Chemotherapie-induzierter Neutropenie und infolgedessen schwerer Sepsis und *septischem Schock* (Mesters et al., 2000). Hier wurden die APC-Werte ebenso mittels ECA-Verfahren nach Gruber und Griffin (LOD 2,5 ng/ml) gemessen. Hier zeigten sich, nach 12 Stunden, in der Subgruppe der Patienten mit *septischem Schock* erhöhte APC-Werte. Dies deckt sich mit den Ergebnissen unserer Studie. Alle 13 Patienten mit *septischem Schock* verstarben. Es konnte hier kein signifikanter Unterschied, zwischen der Subgruppe der Patienten mit *septischem Schock* und derer mit schwerer Sepsis, in Hinblick auf die APC-Werte ermittelt werden. Gegenüber unseren Studienergebnissen stehen die Ergebnisse von Faust et al. (Faust et al., 2001). In einer Studie bei 14 Kindern mit schwerer Meningokokken Sepsis lagen nur erniedrigte oder nicht messbare APC-Werte bei allen 14 Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe vor (Faust et al., 2001). Die APC-Messungen wurden in dieser Studie mittels modifiziertem ECA-Verfahren nach Gruber et al. mit einer LOD von 3 ng/ml durchgeführt. Die LOD dieses Verfahrens steht der LOD von 0,02 ng/ml in dem von uns verwendeten OECA-Verfahrens gegenüber.

Als sekundärer Endpunkt wurde ebenso die Korrelation von APC mit etablierten Gerinnungsparametern analysiert. Die im Verlauf der Studie abnehmenden APC-

Werte gingen mit abnehmenden TAT- und F1+2-Werten einher. Hier konnte eine signifikante, positive Korrelation von APC mit etablierten Gerinnungsparametern, wie D-Dimere, TAT und F1+2 nachgewiesen werden. Wir gehen daher davon aus, dass die abnehmende Thrombingerierung unter der Therapie für die abnehmende Aktivierung von PC zu APC verantwortlich ist, welches sich in den nach 24 Stunden abnehmenden APC-Werten unserer Studie zeigt. Die Aktivierung von APC wird durch Thrombin vermittelt und spiegelt den Aktivierungsstatus des plasmatischen Gerinnungssystems wider. Die initial erhöhten TAT-Werte, als Maß für die Thrombingerierung, unterstützen die Ergebnisse unserer Studie. So zeigen erhöhte APC-Werte eine Aktivierung des Gerinnungssystems und korrelieren mit einer schlechten Prognose.

Als weiterer sekundärer Endpunkt wurde die Korrelation von APC mit DIC definiert. Hier zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge mit dem Studienkollektiv. Die Verteilung der DIC zeigte sich in der Gruppe der Überlebenden und bei den Verstorbenen ähnlich und lag in beiden Subgruppen unterhalb des Grenzwertes für eine manifeste DIC. Dies spiegelt nicht die allgemeine Prävalenz einer DIC im Rahmen eines *septischen Schock* von circa 35% wider (Okamoto et al., 2016).

#### 4.3 Limitationen

Die Studie schloss 48 Patienten mit *septischem Schock* ein. Der Anteil der männlichen Probanden lag bei 79,2% und ist somit im gesamten Studienkollektiv sehr hoch. Die Studienpopulation spiegelt ebenso nur die Versorgungsrealität an der Universitätsmedizin Mannheim wider. Zuletzt lässt die geringe Fallzahl nur eine bedingte Generalisierung der Studienaussage zu. Es bleibt abzuwarten, ob sich die Ergebnisse dieser Studie in einer großen multizentrischen Studie mit einer hohen Fallzahl bestätigen lassen.

Durch die Veröffentlichung der neuen Sepsis 3 Leitlinie im Jahre 2016, rückte die systemische Reaktion auf eine Infektion in den Fokus der diagnostischen Kriterien (Singer et al., 2016). Für die aktuelle geltende Definition einer Sepsis ist nun nicht mehr die Infektion selbst entscheidend, sondern die durch sie ausgelöste Reaktion mit resultierenden Organschädigungen. Zur Diagnose wird der SOFA Score herangezogen. Durch die neuen Sepsis-Kriterien ist eine mögliche Änderung des Patientenkollektivs unserer Studie denkbar. Der gemessene SOFA Score zu Beginn

des intensivmedizinischen Aufenthaltes war mit 12,0 (IQR 11,0-14,0) Punkten in unserem Studienkollektiv bereits per se erhöht. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch unter der aktuellen Sepsis Definition, sich das Studienkollektiv nicht maßgeblich geändert hätte, als zum Zeitpunkt unserer Studiendurchführung, in der das Studienkollektiv nach Sepsis-2 Leitlinie ausgewählt wurde.

#### 4.4 Implikationen für die klinische Praxis

Die Sepsis, bzw. der *septische Schock*, stellt mit ihrer inflammatorischen und thromboembolischen Komponente die Todesursache Nummer drei in Deutschland dar. Als prädiktiver Faktor könnte APC durch das Erkennen von Patienten mit erhöhtem Risiko für ein schlechtes Outcome, zu einer frühzeitigen Erkennung derer und damit zu einem besseren Outcome beitragen. Eine schnelle und verlässliche Prognoseeinschätzung könnte so diesen Patienten eine schnellere Therapieintervention ermöglichen. Rekombinante APC-Varianten, z.B. ohne antithrombotische Wirkung, versprechen ebenso neue therapeutische Einsatzmöglichkeiten (Griffin et al 2015). Dazu sind standardisierte Messmethoden zum Monitoring von APC, zur weiteren Entwicklung beim Einsatz von rAPC, zur Vergleichbarkeit und zur Durchführung von großen Studien, dringend notwendig. Das OECA-Verfahren könnte sich dafür mit einer niedrigen LOD und einer Gesamttestzeit von 7 Stunden zum Standardverfahren etablieren. Zusätzlich stellt das OECA-Verfahren, das als *Catcher* ein Aptamer anstelle eines Antikörpers benutzt, eine interessante Alternative zu herkömmlichen Verfahren dar. Die gute Reproduzierbarkeit sowie einfache Modifizierbarkeit des Verfahrens könnten weitere vielfältige Anwendungsmöglichkeiten eröffnen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der diagnostische Nutzen eines *Oligonucleotide-Enzyme-Capture-Assay*-basierten Testverfahrens zur Bestimmung von aktiviertem Protein C bei Patienten im *septischen Schock* untersucht. Ziel dieser Arbeit war die Assoziation von aktiviertem Protein C und der 28-Tage-Mortalität zu analysieren. Als sekundäre Endpunkte wurden die Korrelation von aktiviertem Protein C mit etablierten Markern der plasmatischen Gerinnung, sowie der disseminierten intravasale Koagulopathie, die diagnostische Wertigkeit von aktiviertem Protein C und der prädiktive Nutzen von aktiviertem Protein C hinsichtlich der 28-Tages-Mortalität analysiert.

Insgesamt konnten 48 Patienten mit *septischem Schock* in die Studie eingeschlossen werden. Aktiviertes Protein C wurde zu Studienbeginn (d0), nach 24 Stunden (d1), nach 72 Stunden (d3) und nach 144 Stunden (d6) mittels eines *Oligonucleotide-Enzyme-Capture-Assay*-basierten Testverfahrens gemessen. Von den eingeschlossenen Patienten verstarben innerhalb des Studienzeitraumes von 28 Tagen insgesamt 19 (39,6%) Patienten, während 29 (60,4%) der Studienteilnehmer überlebten. Die Werte von aktiviertem Protein C waren zu Studienbeginn in der Gruppe der Verstorbenen signifikant erhöht ( $p=0,004$ ) und zeigten eine starke Korrelation mit etablierten Gerinnungsparametern wie D-Dimere, Thrombin-Antithrombin-Komplexe und Prothrombinfragmente 1+2. Werte von aktiviertem Protein C über 0,77 ng/ml gingen mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko einher. Mittels univariater und multivariater logistischer Regression konnten das aktivierte Protein C (OR 4,253; 95%-KI 1,28-14,11;  $p=0,018$ ) als unabhängiger Prädiktor für die 28-Tage Mortalität analysiert werden.

Als prädiktiver Faktor könnte aktiviertes Protein C, Patienten im *septischen Schock* mit erhöhtem Risiko für ein schlechtes Outcome frühzeitig identifizieren. Eine schnelle und verlässliche Prognoseeinschätzung mittels Messung von aktiviertem Protein C, könnte so diesen Patienten eine schnellere Therapieintervention ermöglichen. Standardisierte Messmethoden zum Monitoring von aktiviertem Protein C, zur Vergleichbarkeit und zur Durchführung von großen Studien sind dringend notwendig. Das *Oligonucleotide-Enzyme-Capture-Assay* könnte sich dafür mit einer niedrigen Bestimmungsgrenze und einer Gesamttestzeit von nur 7 Stunden zum Standardverfahren etablieren.



## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Alcaraz, A., España, F., Sánchez-Cuenca, J., Zuazu, I., Estellés, A., Aznar, J., and Vicente, V. (1995). Activation of the protein C pathway in acute sepsis. *Thrombosis Research* 79, 83–93.

Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W., and Weiber, R. (2016). *Multivariate Analysemethoden: eine anwendungsorientierte Einführung* (Berlin Heidelberg: Springer Gabler).

Bates, S. (2012). D-Dimer Assays in Diagnosis and Management of Thrombotic and Bleeding Disorders. *Semin Thromb Hemost* 38, 673–682.

Bauer, K.A., Kass, B.L., Beeler, D.L., and Rosenberg, R.D. (1984). Detection of protein C activation in humans. *J. Clin. Invest.* 74, 2033–2041.

Becher, T., Müller, J., Akin, I., Baumann, S., Bosch, K., Stach, K., Borggrefe, M., Pötzsch, B., and Loßnitzer, D. (2018). The evolution of activated protein C plasma levels in septic shock and its association with mortality: A prospective observational study. *Journal of Critical Care* 47, 41–48.

Bernard, G.R., Dhainaut, J.-F., and Helterbrand, J.D. (2001a). Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis. *The New England Journal of Medicine* 11.

Bernard, G.R., Ely, E.W., Wright, T.J., Fraiz, J., Stasek, J.E., Russell, J.A., Mayers, I., Rosenfeld, B.A., Morris, P.E., Yan, S.B., et al. (2001b). Safety and dose relationship of recombinant human activated protein C for coagulopathy in severe sepsis: *Critical Care Medicine* 29, 2051–2059.

Bishop, P., and Lawson, J. (2004). Recombinant biologics for treatment of bleeding disorders. *Nat Rev Drug Discov* 3, 684–694.

Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M.H., and Sibbald, W.J. (1992). Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* 101, 1644–1655.

Borgel, D., Bornstain, C., Reitsma, P.H., Lerolle, N., Gandrille, S., Dali-Ali, F., Esmon, C.T., Fagon, J.-Y., Aiach, M., and Diehl, J.-L. (2007). A Comparative Study of the Protein C Pathway in Septic and Nonseptic Patients with Organ Failure. *Am J Respir Crit Care Med* 176, 878–885.

Bouwens, E.A.M., Stavenuiter, F., and Mosnier, L.O. (2013). Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway. *J Thromb Haemost* 11, 242–253.

Branson, HermanE., Marble, R., Katz, J., and Griffin, JohnH. (1983). INHERITED PROTEIN C DEFICIENCY AND COUMARIN-RESPONSIVE CHRONIC RELAPSING PURPURA FULMINANS IN A NEWBORN INFANT. *The Lancet* 322, 1165–1168.

Brass, L.F. (2003). Thrombin and Platelet Activation. *Chest* 124, 18S-25S.

Butenas, Mann, and Butenas (2002). Blood coagulation. *Biochemistry (Moscow)* 67, 3–12.

Carlotta Rossi, Michele Giardino, Daniele Crespi, Abramo Anghileri, Daniele Poole, and Guido Bertolini per il Gruppo Italiano per la Valutazione degli Interventi in Terapia Intensiva (GiV (2013). Il registro GiViTI sull'utilizzo del farmaco Xigris® nelle Terapie Intensive italiane. *Recenti Progressi in Medicina*.

Colbert, J.F., and Schmidt, E.P. (2016). Endothelial and Microcirculatory Function and Dysfunction in Sepsis. *Clinics in Chest Medicine* 37, 263–275.

Dole, V.S., Bergmeier, W., Mitchell, H.A., Eichenberger, S.C., and Wagner, D.D. (2005). Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. *Blood* 106, 2334–2339.

Eckey, H.-F., and Türck, M. (2006). Statistische Signifikanz (p-Wert). *WIST* 35, 415–418.

Elisen, M.G.L.M., von dem Borne, P.A.Kr., Bouma, B.N., and Meijers, J.C.M. (1998). Protein C Inhibitor Acts as a Procoagulant by Inhibiting the Thrombomodulin-Induced Activation of Protein C in Human Plasma. *Blood* 91, 1542–1547.

Engel, C., Brunkhorst, F.M., Bone, H.-G., Brunkhorst, R., Gerlach, H., Grond, S., Gruendling, M., Huhle, G., Jaschinski, U., John, S., et al. (2007). Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 33, 606–618.

Erdem, A., and Congur, G. (2014). Dendrimer modified 8-channel screen-printed electrochemical array system for impedimetric detection of activated protein C. *Sensors and Actuators B: Chemical* 196, 168–174.

Espana, F., Zuazu, I., Vicente, V., Estellés, A., Marco, P., and Aznar, J. (1996). Quantification of circulating activated protein C in human plasma by immunoassays--enzyme levels are proportional to total protein C levels. *Thromb Haemost* 75, 56–61.

España, F., Vayá, A., Mira, Y., Medina, P., Estellés, A., Villa, P., Falcó, C., and Aznar, J. (2001). Low level of circulating activated protein C is a risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 86, 1368–1373.

Faust, S.N., Levin, M., Harrison, O.B., Goldin, R.D., Lockhart, M.S., Kondaveeti, S., Laszik, Z., Esmon, C.T., and Heyderman, R.S. (2001). Dysfunction of Endothelial Protein C Activation in Severe Meningococcal Sepsis. *N Engl J Med* 345, 408–416.

Fernández, J.A., Lentz, S.R., Dwyre, D.M., and Griffin, J.H. (2006). A novel ELISA for mouse activated protein C in plasma. *Journal of Immunological Methods* 314, 174–181.

Ferreira, F.L. (2001). Serial Evaluation of the SOFA Score to Predict Outcome in Critically Ill Patients. *JAMA* 286, 1754.

Fijnvandraat, K., Derkx, B., Peters, M., Bijlmer, R., Sturk, A., Prins, M.H., van Deventer, S.J., and ten Cate, J.W. (1995). Coagulation activation and tissue necrosis in meningococcal septic shock: severely reduced protein C levels predict a high mortality. *Thromb Haemost* 73, 15–20.

Fourrier, F., Chopin, C., Goudemand, J., Hendrycx, S., Caron, C., Rime, A., Marey, A., and Lestavel, P. (1992). Septic Shock, Multiple Organ Failure, and Disseminated Intravascular Coagulation. *Chest* 101, 816–823.

Gruber, A., and Griffin, J. (1992). Direct detection of activated protein C in blood from human subjects. *Blood* 79, 2340–2348.

Hardaway, R.M., and Vasquez, Y. (2001). Disseminated Intravascular Coagulation in Sepsis. *SEMINARS IN THROMBOSIS AND HEMOSTASIS* 27, 8.

Hazelzet, J.A., van der Voort, E., Lindemans, J., ter Heerdt, P.G.J., and Neijens, H.J. (1994). Relation between cytokines and routine laboratory data in children with septic shock and purpura. *Intensive Care Med* 20, 371–374.

Hesselvik, J.F., Malm, J., Dahlbäck, B., and Blombäck, M. (1991). Protein C, protein S and C4b-binding protein in severe infection and septic shock. *Thromb Haemost* 65, 126–129.

Heublein, S., Hartmann, Michael, and Hagel, Stefan (2013). Epidemiologie der Sepsis in deutschen Krankenhäusern - eine Analyse administrativer Daten. *INTENSIV-NEWS Forum für Intensiv- und Notfallmedizin* 1–3.

Honore, P.M., Jacobs, R., De Waele, E., and Spapen, H.D. (2014). Biomarkers to Detect Sepsis: A “Burning” Issue But Still a Long Way to Go\*. *Critical Care Medicine* 42, 2137–2138.

Hosseini Ghalehno, M., Mirzaei, M., and Torkezadeh-Mahani, M. (2019). Electrochemical aptasensor for activated protein C using a gold nanoparticle – Chitosan/graphene paste modified carbon paste electrode. *Bioelectrochemistry* 130, 107322.

Huang, M., Cai, S., and Su, J. (2019). The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. *IJMS* 20, 5376.

Jawad, I., Lukšić, I., and Rafnsson, S.B. (2012). Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality. *J Glob Health* 2.

Jurk, K., and Kehrel, B.E. (2005). Platelets: Physiology and Biochemistry. *Semin Thromb Hemost* 31, 381–392.

Kalafatis, M., Egan, J.O., van 't Veer, C., Cawthorn, K.M., and Mann, K.G. (1997). The regulation of clotting factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 7, 241–280.

- de Kleijn, E.D., de Groot, R., Hack, C.E., H. Mulder, P.G., Engl, W., Moritz, B., Joosten, K.F.M., and Hazelzet, J.A. (2003). Activation of protein C following infusion of protein C concentrate in children with severe meningococcal sepsis and purpura fulminans: A randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose-finding study: *Critical Care Medicine* 31, 1839–1847.
- Knaus, W.A., Draper, E.A., Wagner, D.P., and Zimmerman, J.E. (1985). APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit. Care Med.* 13, 818–829.
- Koster, T., Vandenbroucke, J., Rosendaal, F., de Ronde, H., Briët, E., and Bertina, R. (1993). Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *The Lancet* 342, 1503–1506.
- Koyun, S., Akgönüllü, S., Yavuz, H., Erdem, A., and Denizli, A. (2019). Surface plasmon resonance aptasensor for detection of human activated protein C. *Talanta* 194, 528–533.
- Kraska-Miller, M. (2014). *Nonparametric statistics for social and behavioral sciences* (Boca Raton: CRC Press).
- Lao, Y.-H., Peck, K., and Chen, L.-C. (2009). Enhancement of Aptamer Microarray Sensitivity through Spacer Optimization and Avidity Effect. *Anal. Chem.* 81, 1747–1754.
- Le Gall, J.R. (1993). A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 270, 2957–2963.
- Leclerc, F., Hazelzet, J., Jude, B., Hofhuis, W., Hue, V., Martinot, A., and Van der Voort, E. (1992). Protein C and S deficiency in severe infectious purpura of children: A collaborative study of 40 cases. *Intensive Care Med* 18, 202–205.
- Levi, M., and Poll, T. (2015). Coagulation in Patients with Severe Sepsis. *Semin Thromb Hemost* 41, 009–015.
- Levi, M., and van der Poll, T. (2007). Recombinant human activated protein C: current insights into its mechanism of action. *Crit Care* 11, S3.
- Levi, M., and van der Poll, T. (2017). Coagulation and sepsis. *Thrombosis Research* 149, 38–44.
- Levi, M., van der Poll, T., and Büller, H.R. (2004). Bidirectional Relation Between Inflammation and Coagulation. *Circulation* 109, 2698–2704.
- Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.-L., and Ramsay, G. (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference: *Critical Care Medicine* 31, 1250–1256.
- Li, Z., Delaney, M.K., O'Brien, K.A., and Du, X. (2010). Signaling During Platelet Adhesion and Activation. *ATVB* 30, 2341–2349.

- Liaw, P.C.Y., Ferrell, G., and Esmon, C.T. (2003). A monoclonal antibody against activated protein C allows rapid detection of activated protein C in plasma and reveals a calcium ion dependent epitope involved in factor Va inactivation. *J Thromb Haemost* 1, 662–670.
- Liaw, P.C.Y., Esmon, C.T., Kahn moui, K., Schmidt, S., Kahn moui, S., Ferrell, G., Beaudin, S., Julian, J.A., Weitz, J.I., Crowther, M., et al. (2004). Patients with severe sepsis vary markedly in their ability to generate activated protein C. *Blood* 104, 3958–3964.
- Lin, S.-M., Wang, Y.-M., Lin, H.-C., Lee, K.-Y., Huang, C.-D., Liu, C.-Y., Wang, C.-H., and Kuo, H.-P. (2008). Serum thrombomodulin level relates to the clinical course of disseminated intravascular coagulation, multiorgan dysfunction syndrome, and mortality in patients with sepsis\*: *Critical Care Medicine* 36, 683–689.
- Lord, S.T. (2011). Molecular Mechanisms Affecting Fibrin Structure and Stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31, 494–499.
- Lorente, J.A., García-Frade, L.J., Landín, L., de Pablo, R., Torrado, C., Renes, E., and García-Avello, A. (1993). Time Course of Hemostatic Abnormalities in Sepsis and its Relation to Outcome. *Chest* 103, 1536–1542.
- Mammen, E. (1998). Antithrombin: Its Physiological Importance and Role in DIC. *Semin Thromb Hemost* 24, 19–25.
- Marlar, R.A., Endres-Brooks, J., and Miller, C. (1985). Serial studies of protein C and its plasma inhibitor in patients with disseminated intravascular coagulation. *Blood* 66, 59–63.
- Martinelli, I., Mannucci, P.M., De Stefano, V., Taioli, E., Rossi, V., Crosti, F., Paciaroni, K., Leone, G., and Faioni, E.M. (1998). Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood* 92, 2353–2358.
- Martos, L., Bonanad, S., Ramón, L.A., Cid, A.-R., Bonet, E., Corral, J., Miralles, M., España, F., Navarro, S., and Medina, P. (2016). A simplified assay for the quantification of circulating activated protein C. *Clinica Chimica Acta* 459, 101–104.
- Mateo, J., Oliver, A., Borrell, M., Sala, N., and Fontcuberta, J. (1997). Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism--results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study). *Thromb Haemost* 77, 444–451.
- Mesters, R.M., Helterbrand, J., Utterback, B.G., Yan, S.B., Chao, Y.B., Fernandez, J.A., Griffin, J.H., and Hartman, D.L. (2000). Prognostic value of protein C concentrations in neutropenic patients at high risk of severe septic complications: *Critical Care Medicine* 28, 2209–2216.
- Minne, L., Abu-Hanna, A., and de Jonge, E. (2009). Evaluation of SOFA-based models for predicting mortality in the ICU: A systematic review. *Crit Care* 12, R161.
- Mohan Rao, L.V., Esmon, C.T., and Pendurthi, U.R. (2014). Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. *Blood* 124, 1553–1562.

Moore, K.L., Andreoli, S.P., Esmon, N.L., Esmon, C.T., and Bang, N.U. (1987). Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J. Clin. Invest.* *79*, 124–130.

Moore, K.L., Esmon, C.T., and Esmon, N.L. (1989). Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. *Blood* *73*, 159–165.

Mosnier, L.O., Zlokovic, B.V., and Griffin, J.H. (2007). The cytoprotective protein C pathway. *Blood* *109*, 3161–3172.

Müller, J., Isermann, B., Dücker, C., Salehi, M., Meyer, M., Friedrich, M., Madhusudhan, T., Oldenburg, J., Mayer, G., and Pötzsch, B. (2009). An Exosite-Specific ssDNA Aptamer Inhibits the Anticoagulant Functions of Activated Protein C and Enhances Inhibition by Protein C Inhibitor. *Chemistry & Biology* *16*, 442–451.

Müller, J., Becher, T., Braunstein, J., Berdel, P., Gravius, S., Rohrbach, F., Oldenburg, J., Mayer, G., and Pötzsch, B. (2011). Profiling of Active Thrombin in Human Blood by Supramolecular Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* *50*, 6075–6078.

Müller, J., Friedrich, M., Becher, T., Braunstein, J., Kupper, T., Berdel, P., Gravius, S., Rohrbach, F., Oldenburg, J., Mayer, G., et al. (2012). Monitoring of plasma levels of activated protein C using a clinically applicable oligonucleotide-based enzyme capture assay: Measurement of activated protein C. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* *10*, 390–398.

Nagelkerke, N.J.D. (1991). A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika* *78*, 691–692.

Okamoto, K., Tamura, T., and Sawatsubashi, Y. (2016). Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care* *4*, 23.

Orthner, C.L., Kolen, B., and Drohan, W.N. (1993). A sensitive and facile assay for the measurement of activated protein C activity levels in vivo. *Thromb Haemost* *69*, 441–447.

Orwoll, B.E., Spicer, A.C., Zinter, M.S., Alkhouli, M.F., Khemani, R.G., Flori, H.R., Neuhaus, J.M., Calfee, C.S., Matthay, M.A., and Sapru, A. (2015). Elevated soluble thrombomodulin is associated with organ failure and mortality in children with acute respiratory distress syndrome (ARDS): a prospective observational cohort study. *Crit Care* *19*, 435.

Oto, J., Fernández-Pardo, Á., Miralles, M., Plana, E., España, F., Navarro, S., and Medina, P. (2020). Activated protein C assays: A review. *Clinica Chimica Acta* *502*, 227–232.

van der Poll, T., Büller, H.R., ten Cate, H., Wortel, C.H., Bauer, K.A., van Deventer, S.J.H., Hack, C.E., Sauerwein, H.P., Rosenberg, R.D., and ten Cate, J.W. (1990). Activation of Coagulation after Administration of Tumor Necrosis Factor to Normal Subjects. *N Engl J Med* *322*, 1622–1627.


- van der Poll, T., Levi, M., Hack, C.E., ten Cate, H., van Deventer, S.J., Eerenberg, A.J., de Groot, E.R., Jansen, J., Gallati, H., and Büller, H.R. (1994). Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *Journal of Experimental Medicine* 179, 1253–1259.
- Pötzsch, B., and Madlener, K. (2010). *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie* (Berlin, Heidelberg: Springer).
- Powars, D., Rogers, Z., and Patch, M. (1987). Purpura Fulminans in Meningococemia: Association with Acquired Deficiencies of Proteins C and S. *N Engl J Med* 317, 571–572.
- Powars, D., Larsen, R., Johnson, J., Hulbert, T., Sun, T., Patch, M.J., Francis, R., and Chan, L. (1993). Epidemic Meningococemia and Purpura Fulminans with Induced Protein C Deficiency. *Clinical Infectious Diseases* 17, 254–261.
- Ranieri, V.M., Thompson, B.T., Barie, P.S., Dhainaut, J.-F., Douglas, I.S., Finfer, S., Gårdlund, B., Marshall, J.C., Rhodes, A., Artigas, A., et al. (2012). Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. *N Engl J Med* 366, 2055–2064.
- Roback, M.G., Stack, A.M., Thompson, C., Brugnara, C., Schwarz, H.P., and Saladino, R.A. (1998). ACTIVATED PROTEIN C CONCENTRATE FOR THE TREATMENT OF MENINGOCOCCAL ENDOTOXIN SHOCK IN RABBITS: SHOCK 9, 138–142.
- Román, J., Velasco, F., Fernandez, F., Fernandez, M., Villalba, R., Rubio, V., and Torres, A. (1992). Protein C, protein S and C4b-binding protein in neonatal severe infection and septic shock. *Journal of Perinatal Medicine* 20, 111–116.
- Ruggeri, Z.M., and Mendolicchio, G.L. (2007). Adhesion Mechanisms in Platelet Function. *Circulation Research* 100, 1673–1685.
- Safari, S., Baratloo, A., Elfil, M., and Negida, A. (2016). Evidence Based Emergency Medicine; Part 5 Receiver Operating Curve and Area under the Curve. *Emerg (Tehran)* 4, 111–113.
- Sapru, A., Calfee, C.S., Liu, K.D., Kangelaris, K., Hansen, H., Pawlikowska, L., Ware, L.B., Alkhouli, M.F., Abbot, J., and Matthay, M.A. (2015). Plasma soluble thrombomodulin levels are associated with mortality in the acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 41, 470–478.
- Scheer, C., Fuchs, C., and Rehberg, S. (2016). Biomarkers in Severe Sepsis and Septic Shock: Just Listen to the Heart? 2.
- Schmaier, A.H. (2008). The elusive physiologic role of Factor XII. *J. Clin. Invest.* JCI36617.
- Simmons, J., and Pittet, J.-F. (2015). The coagulopathy of acute sepsis: Current Opinion in Anaesthesiology 28, 227–236.
- Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C.M., et al. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801.

- Takazoe, K., Ogawa, H., Yasue, H., Sakamoto, T., Oshima, S., Arai, H., Moriyama, Y., Shimomura, H., Hirai, N., Kaikita, K., et al. (1999). Association of Plasma Levels of Activated Protein C with Recanalization of the Infarct-Related Coronary Artery after Thrombolytic Therapy in Acute Myocardial Infarction. *Thrombosis Research* 95, 37–47.
- Taylor, F., Toh, C.-H., Hoots, K., Wada, H., and Levi, M. (2001). Towards Definition, Clinical and Laboratory Criteria, and a Scoring System for Disseminated Intravascular Coagulation: On behalf of the Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). *Thromb Haemost* 86, 1327–1330.
- Taylor, F.B., Chang, A., Esmon, C.T., D'Angelo, A., Vigano-D'Angelo, S., and Blick, K.E. (1987). Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboon. *J. Clin. Invest.* 79, 918–925.
- Taylor, F.B., Stearns-Kurosawa, D.J., Kurosawa, S., Ferrell, G., Chang, A.C., Laszik, Z., Kosanke, S., Peer, G., and Esmon, C.T. (2000). The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood* 95, 1680–1686.
- Teasdale, G., and Jennett, B. (1974). ASSESSMENT OF COMA AND IMPAIRED CONSCIOUSNESS. *The Lancet* 304, 81–84.
- Vanhoutte, P.M. (1988). Platelets, endothelium and blood vessel wall. *Experientia* 44, 105–109.
- Vincent, J.-L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonça, A., Bruining, H., Reinhart, C.K., Suter, P.M., and Thijs, L.G. (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 (see contributors to the project in the appendix). *Intensive Care Med* 22, 707–710.
- Whiles, B.B., Deis, A.S., and Simpson, S.Q. (2017). Increased Time to Initial Antimicrobial Administration Is Associated With Progression to Septic Shock in Severe Sepsis Patients: *Critical Care Medicine* 45, 623–629.
- Winter, W.E., Flax, S.D., and Harris, N.S. (2017). Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Laboratory Medicine* 48, 295–313.
- Xu, J., Esmon, N.L., and Esmon, C.T. (1999). Reconstitution of the Human Endothelial Cell Protein C Receptor with Thrombomodulin in Phosphatidylcholine Vesicles Enhances Protein C Activation. *J. Biol. Chem.* 274, 6704–6710.
- Yan, S.B., and Dhainaut, J.-F. (2001). Activated protein C versus protein C in severe sepsis: *Critical Care Medicine* 29, S69–S74.



## 7 TABELLARISCHER ANHANG

### 7.1 Anhang Ethikvotum

	
<b>UMM</b> UNIVERSITÄTSMEDIZIN MANNHEIM	Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg Universitätsklinikum Mannheim
<small>UMM Universitätsmedizin Mannheim Med. Ethik-Kommission II, Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, 68167 Mannheim</small>	<b>Medizinische Fakultät Mannheim Medizinische Ethik-Kommission II</b>
Herrn <b>PD Dr. med. Ralf Lehmann</b> I. Medizinische Klinik Universitätsmedizin Mannheim Theodor-Kutzer-Ufer 1-3  68167 Mannheim	Vorsitzender: <b>Professor Dr. med. Jens-Peter Striebel</b>  Sachbearbeiterinnen: Fr. Cao, Fr. Goerner, Fr. Heberlein Haus 42 – Ebene 3 Theodor-Kutzer-Ufer 1-3 68167 Mannheim  Telefon: +49 621 383-9706 -9707 -9708 Telefax: +49 621 383-9710 <a href="mailto:ethikkommission-ii@medma.uni-heidelberg.de">ethikkommission-ii@medma.uni-heidelberg.de</a> <a href="http://www.umm.uni-heidelberg.de/mst/ethikkommission">www.umm.uni-heidelberg.de/mst/ethikkommission</a>
Mannheim, 28.04.2015 / MG <b>Unser Zeichen: 2015-526N-MA</b>	
<b>Studientitel:</b> Bestimmung neuer, Oligonucleotid-Enzym-Capture-Assay (OECA) basierter Gerinnungsmarker zur Quantifizierung der endothelialen Dysfunktion und Gerinnungsaktivierung bei Patienten mit Sepsis	
<b>Studienleiter:</b> <b>PD Dr. med. Ralf Lehmann</b>	
<b>Prüfstelle:</b> I. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mannheim, Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, 68167 Mannheim, Eingang 13.03.2015	
<b><u>Votum</u></b>	
Sehr geehrter Herr Dr. Lehmann,	
die Ethik-Kommission II der Medizinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg hat das o. g. Forschungsvorhaben	
unter Berücksichtigung nachfolgender Unterlagen	
Ethikantrag vom 15.03.2015 Patienteninformation und Einverständniserklärung, Version 1.0 vom 15.03.2015 Betreuerinformation und Einverständniserklärung, Version 1.0 vom 15.03.2015	
<b><u>Geforderte bzw. akzeptierte Modifikationen</u></b> Stellungnahme vom 27.04.2015 Patienteninformation und Einverständniserklärung, Version 1.1 vom 26.04.2015 Betreuerinformation und Einverständniserklärung, Version 1.1 vom 26.04.2015	
mit den unten aufgeführten Kommissionsmitgliedern am 14.04.2015 mündlich beraten und folgenden Beschluss gefasst:	
<b>Gegen das Vorhaben sind aus ethischer und berufsrechtlicher Sicht keine Bedenken zu erheben.</b>	
Für dieses Votum gelten die nachfolgend formulierten Bedingungen:	
1. Der Ethik-Kommission sind Mitteilungen über schwerwiegende oder unerwartete unerwünschte Ereignisse, die während der Studie auftreten und die Sicherheit der Studienteilnehmer oder die	
<small>Klinikum Mannheim GmbH Universitätsklinikum, Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, 68167 Mannheim Registriergericht: Amtsgericht Mannheim, HRB Mannheim 7331 Aufsichtsratsvorsitzender: Oberbürgermeister Dr. Peter Kurz Geschäftsführer: Dr. Jörg Blattmann, Prof. Dr. med. Frederik Wenz</small>	<small>Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, 68167 Mannheim Dekan: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Uwe Bliker</small>

Durchführung der Studie beeinträchtigen könnten, in Verbindung mit einer begründeten Stellungnahme des Leiters der klinischen Prüfung zu übersenden und mit dem Hinweis zu versehen, ob aus seiner Sicht die Nutzen/Risiko-Relation des Vorhabens verändert worden ist.

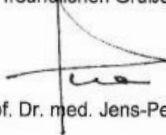
2. Ethisch relevante Änderungen im Prüfplan und in der Phase der Umsetzung bitten wir, der Kommission mitzuteilen; geänderte Passagen sollten deutlich kenntlich gemacht werden.
3. Der Antragsteller hat sicherzustellen, dass die Akten und Unterlagen nach dem Abschluss des Vorhabens in seinem derzeitigen Arbeitsbereich verwahrt und ordnungsgemäß verwaltet werden.
4. Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass die Verwendung dieses positiven Votums zur Durchführung der Studie mit der Verpflichtung verbindet, der Med. Ethik-Kommission II spätestens innerhalb von 6 Monaten nach Beendigung der Studie dies mit einem maximal einseitigen, die Studienergebnisse zusammenfassenden Bericht (gegebenenfalls Originalpublikation) schriftlich anzuzeigen.

Dieser Beschluss wurde einstimmig gefasst.

Unabhängig vom Beratungsergebnis der Ethik-Kommission II mache ich darauf aufmerksam, dass die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung einer klinischen Prüfung beim Leiter der klinischen Prüfung und auch bei allen an der Prüfung teilnehmenden Ärzten liegt.

Die Ethik-Kommission II der Universität Heidelberg an der Medizinischen Fakultät Mannheim arbeitet gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen und den ICH-GCP-Richtlinien. Den Beratungen der Medizinische Ethik-Kommission II liegt gemäß der gültigen Berufsordnung die maßgebende Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki in der revidierten Fassung von 2008 zu Grunde.

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Dr. med. Jens-Peter Striebel

**Kommissionsmitglieder:**

- Dr. med. Dorothee Dörr, M.A.**  
Fachärztin für Anästhesiologie, Referentin für Klinische Ethikberatung, Universitätsmedizin Mannheim
- Prof. Dr. med. Lutz Frölich**  
Stellvertr. Vorsitzender  
Leiter der Abt. und Forschungsabt. für Gerontopsychiatrie und des Kompetenznetz Demenzen, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie am Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
- Prof. Dr. jur. utr. Reinhard Mußgnug**  
Em. Ordinarius für Staats- und Verwaltungsrecht, Verfassungsgeschichte und Finanz- und Steuerrecht an der Juristischen Fakultät der Universität Heidelberg
- Frau PD Dr. med. Eva Neumaier Probst**  
Fachärztin für Radiologie, Neuroradiologische Abteilung, Universitätsmedizin Mannheim
- Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Manfred V. Singer**  
Em. Ordinarius für Innere Medizin II, Gastroenterologie, Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
- Prof. Dr. med. vet. Gisbert Sponer**  
Apl. Prof. für Pharmakologie und Toxikologie, Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
- Prof. Dr. med. Jens-Peter Striebel**  
Vorsitzender  
Apl. Professor für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie und Bluttransfusionswesen, Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
- Prof. Dr. med. Karl-Ludwig Waag**  
Em. Ordinarius für Kinderchirurgie und Facharzt für Chirurgie, Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
- Prof. Dr. sc. hum Christel Weiß**  
Apl. Prof. für Biomathematik und Epidemiologie, Diplom-Mathematikerin, Abteilung für Medizinische Statistik, Biomathematik und Informationsverarbeitung, Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg

## 7.2 Anhang DIC Score

Diagnostischer Algorithmus zur Diagnose einer manifesten DIC (Taylor et al., 2001):

### 1. Risikobeurteilung:

vorbestehende Grunderkrankung vorhanden, welche bekanntermaßen mit einer DIC assoziiert ist? (siehe **Tabelle 15**) Wenn ja, dann weiter mit Punkt 2, ansonsten kein Vorliegen einer manifesten DIC wahrscheinlich

### 2. Globale Gerinnungstests durchführen:

Thrombozyten, Prothrombinzeit (PT), Fibrinogen, lösliche Fibrinmonomere oder Fibrinabbauprodukte

### 3. Score kalkulieren anhand der Ergebnisse der Gerinnungstests (siehe Tabelle 16: DIC Score (Taylor et al., 2001) **Tabelle 16**)

### 4. Interpretation (siehe **Tabelle 17**)

**Tabelle 15: DIC-assozierte Grunderkrankungen**

*DIC, disseminated intravascular coagulation*

	Sepsis/schwere Infektion (alle Keime)
	Trauma (z B. Polytrauma, Neurotrauma, Fettembolie)
	Organdestruktion (z.B. schwere Pankreatitis)
	maligne Erkrankungen: solide Tumore, myeloproliferative/ lymphoproliferative maligne Erkrankungen
<b>Grunderkrankungen, mit bekanntem Risiko eine manifeste DIC zu entwickeln</b>	geburtshilfliche Komplikationen: Fruchtwasserembolie, vorzeitige Plazentablösung
	Gefäßanomalien: Kasabach-Merrit-Syndrom, große Gefäßaneurysmen
	schweres Leberversagen
	schwere toxische oder immunologische Reaktionen: Schlangenbisse, Freizeitdrogen, Transfusionsreaktionen, Transplantatabstoßung

**Tabelle 16: DIC Score (Taylor et al., 2001)**

*DIC, disseminated intravascular coagulation*

<b>Parameter</b>		<b>Score-Punkte</b>
<b>Thrombozyten</b>	> 100.000/m <sup>3</sup>	0
	50.000 – 100.000/m <sup>3</sup>	1
	< 50.000/m <sup>3</sup>	2
<b>Fibrinmarker (z.B. D-Dimere, Fibrinospaltprodukte)</b>	Normal	0
	Leicht erhöht	2
	Stark erhöht	3
<b>Prothrombinzeit</b>	< 3 Sek.	0
	Sek.	1
	> 6 Sek	2
<b>Fibrinogen</b>	> 1g/l	0
	< 1g/l	1

**Tabelle 17: Interpretation DIC Score**

*DIC, disseminated intravascular coagulation*

<b>Score-Wert</b>	<b>Interpretation</b>	<b>Empfehlung</b>
<b>&gt; 5 Punkte</b>	Manifeste DIC vorhanden	Tägliche Wiederholung des Scores
<b>&lt; 5 Punkte</b>	Keine manifeste DIC vorhanden	Wiederholung des Scores in 1 - 2 Tagen

7.3 Anhang SOFA Score

**Tabelle 18: SOFA Score (Vincent et al., 1996)**

*ZNS, zentrales Nervensystem; GCS, Glasgow Coma Scale; MAP, mean arterial pressure*

Organsystem	Parameter	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	4 Punkte
<b>Lunge</b>	Oxygenierung sindex (PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ) in mmHg	< 400	< 300	< 200 und künstliche Beatmung	< 100 und künstliche Beatmung
<b>ZNS</b>	GCS	13–14	10–12	6–9	< 6
<b>Herz- Kreislauf</b>	MAP (mmHg), Katecholamin dosis	MAP < 70	Dopamin ≤ 5 / Dobutamin (beliebige Dosis mind. 1 h)	Dopamin > 5 / Adrenalin/ Nordrenalin ≤ 0.1/µg/kg/min	Dopamin > 15/ Adrenalin/ Noradrenalin > 0.1/µg/kg/min
<b>Leber</b>	Bilirubin (mg/dl)	1,2–1,9	2,0–5,9	6,0–11,9	>12,0
<b>Gerinnung</b>	Thrombozyten /µl	< 150.000	< 100.000	< 50.000	< 20.000
<b>Nieren</b>	Kreatinin (mg/dl)	1,2–1,9	2,0–3,4	3,5–4,9 oder Urin < 500 ml/d	> 5,0 oder Urin < 200 ml/d

Es muss der jeweils schlechteste Wert pro Organsystem zur Berechnung herangezogen werden.

**Auswertung SOFA Score:**

Ein Anstieg ≥2 Punkten spricht für eine akute Organdysfunktion. Wurde der Score zuvor nicht erfasst gilt als Vergleichswert 0. Bei stationären Patienten geht man von einer Mortalitätsrate von >10% ab einem SOFA Score von 2 aus (Ferreira, 2001).

7.4 Anhang APACHE II Score

NEGATIVE WERTE	ABWEICHUNGEN NACH OBEN					ABWEICHUNGEN NACH UNTEN					Punkte		
	+4	+3	+2	+1	+0	+1	+2	+3	+4				
Temperatur – rektal (°C)	≥ 41°C	39-40,9°C		38,5-38,9°C	36-38,4°C	34-35,9°C	32-33,9°C	30-31,9°C	≤ 29,9°C				
Mittlerer arterieller Druck (mmHg)	≥ 160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤ 49				
Herzfrequenz HF /min	≥ 180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤ 39				
Atemfrequenz AF /min <i>Beatmet und nicht beatmet</i>	≥ 50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤ 5				
Oxygenierung Wenn der $FO_2:0,5$ ist, dann wird die Alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz $AaDO_2$ berücksichtigt Bei einem $FO_2:0,3$ wird der arterielle Sauerstoffdruck (paCO <sub>2</sub> mmHg) berücksichtigt	≥ 500	350-499	200-349		<200								
pH arteriell	≥ 7,7	7,6-7,69		7,5-7,59	7,33-7,49		7,25-7,32	7,15-7,24	≤ 7,15				
Natrium mmol/l	≥ 180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤ 110				
Kalium mmol/l	≥ 7	6-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3-3,4	2,5-2,9		≤ 2,5				
Kreatinin mg/100ml Bei Nierenversagen Punkte verdoppeln	≥ 3,5	2-3,4			0,6-1,4		<0,6						
Hämatokrit %	≥ 60			46-49,9	30-45,9		20-29,9		<20				
Leukozyten (x1000)	≥ 40		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		<1				
Glasgow-Coma-Skala (GCS)	<b>Punkte = 15 – aktueller Glasgow-Coma-Score</b>												
	<b>Punkte gesamt:</b>												
	<b>Age Points: ≤ 44 Jahre = 0 Punkte</b>					<b>65-74 = 5 Punkte</b>					<b>≥ 75 = 6 Punkte</b>		
Durch Biopsie gesicherte Zirrhose und festgestellter portaler Hochdruck						Ja <input type="radio"/>					Nein <input type="radio"/>		
Oberer gastrointestinale Blutungen in der Vorgeschichte, ausgehend von einem portalen Hochdruck						Ja <input type="radio"/>					Nein <input type="radio"/>		
Vorhergehende Episoden mit hepatischer Insuffizienz/hepatischer Enzephalopathie/hepatischem Koma						Ja <input type="radio"/>					Nein <input type="radio"/>		
New York Health Association (NYHA) Class IV						Ja <input type="radio"/>					Nein <input type="radio"/>		
Chronische restriktive, obstruktive oder gefäßbedingte Erkrankungen, die mit einer schweren Einschränkung bei leichten Aufgaben einhergehen (z.B. Unfähigkeit Haushalt zu führen)						Ja <input type="radio"/>					Nein <input type="radio"/>		
bekannte chronische Hypoxie, Hyperkapnie, sekundäre Polyzystämie, schwere pulmonale Hypertension (>40mmHg) oder Abhängigkeit von Beatmung						Ja <input type="radio"/>					Nein <input type="radio"/>		
chronische Dialyse						Ja <input type="radio"/>					Nein <input type="radio"/>		
Der Patient hatte eine Therapie, welche die Abwehrkraft gegen Infektionen schwächt (z. B. Immunsuppression, Chemotherapie, Bestrahlung, langfristige oder hochdosierte Steroide)						Ja <input type="radio"/>					Nein <input type="radio"/>		
Erkrankungen, die mit einer Immunschwäche einhergehen (z.B. Leukämie, Lymphom, AIDS)						Ja <input type="radio"/>					Nein <input type="radio"/>		
Nicht-operierter Patient						bei einem JA 5 Punkte					sonst 0 Punkte		
Postoperativer Patient nach Notfall-OP						bei einem JA 5 Punkte					sonst 0 Punkte		
Postoperativer Patient nach Elektiv-OP						bei einem JA 2 Punkte					sonst 0 Punkte		
<b>APACHE II Score:</b>						<b>+</b>						<b>+</b>	<b>=</b>

<sup>1</sup>ie berechnet sich aus AaDO<sub>2</sub> (mmHg) = p<sub>a</sub>O<sub>2</sub>-p<sub>i</sub>O<sub>2</sub> oder wird vom BGA-Gerät zur Verfügung gestellt

Abbildung 33: APACHE II Score (Knaus et al., 1985)

©2004 www.IntensivCareUnit.de/André Gerdes  
- Ohne Gewähr -

**Tabelle 18: Auswertung APACHE II Score**

*Punktsummenwerte: Minimum: 0 Punkte; Maximum: 71 Punkte*

<b>Punktsummenwert</b>	<b>0-4</b>	<b>5-9</b>	<b>10-14</b>	<b>15-19</b>	<b>20-24</b>	<b>25-29</b>	<b>30-34</b>	<b>&gt; 34</b>
<b>Mortalität (ca.)</b>	4 %	8 %	15 %	25 %	40 %	55 %	75 %	85 %

## 7.5 Anhang SAPS II Score

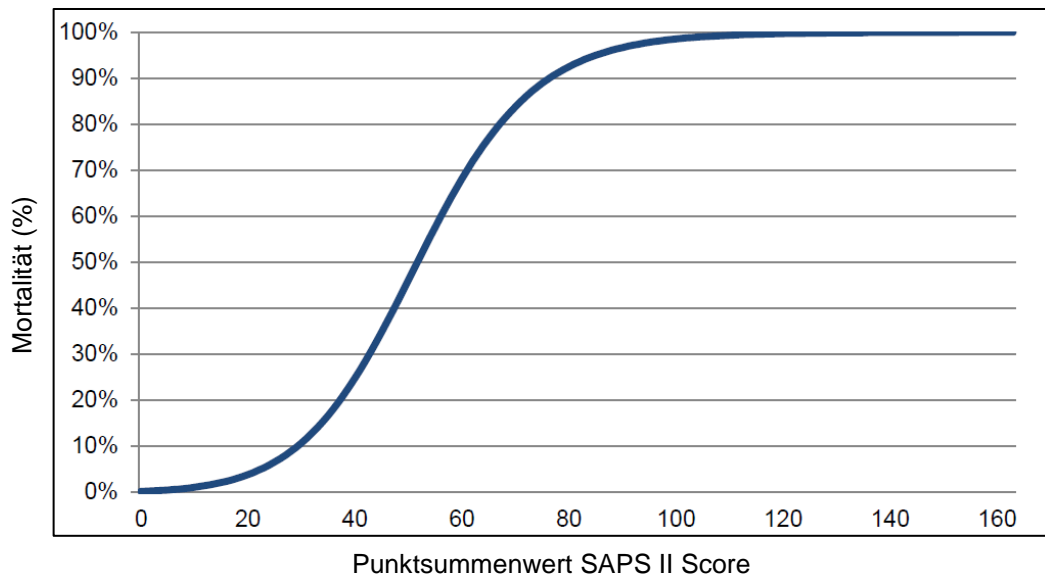
**Tabelle 19: SAPS II Score (Le Gall, 1993)**

*AIDS, Acquired Immune Deficiency Syndrome; GCS, Glasgow Coma Scale; PaO<sub>2</sub>, Sauerstoffpartialdruck*

<b>Parameter</b>	<b>Wert</b>	<b>Punkte</b>
<b>Alter (Jahren)</b>	< 40	0
	40-59	7
	60-69	12
	70-74	15
	75-79	16
	> 80	18
<b>Herzfrequenz (Schläge/min.)</b>	< 40	11
	40-69	2
	70-119	0
	120-159	4
	> 160	7
<b>Blutdruck (systolisch, mmHg)</b>	< 70	13
	70-99	5
	100-199	0
	> 200	2
<b>Temperatur (°C)</b>	< 39,0	0
	> 39,0	3
<b>bei Beatmung PaO<sub>2</sub> (mmHg)/FiO<sub>2</sub></b>	< 100	11
	100-199	9
	> 200	6
<b>Urinausscheidung (l/Tag)</b>	< 0,5	11
	0,5-0,99	4
	> 1,0	0

Parameter	Wert	Punkte
	<60	0
	60-179	6
<b>Harnstoff (mg/dl)</b>	>180	10
oder	oder	oder
<b>Harnstoff-Stickstoff (mg/dl)</b>	< 28	0
	28-83	6
	> 84	10
	< 1,0	12
<b>Leukozyten (10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	1,0-19,9	0
	> 20	3
	< 3	3
<b>Kalium (mmol/l)</b>	3,0-4,9	0
	> 5	3
	< 125	5
<b>Natrium (mmol/l)</b>	125-144	0
	> 145	1
	< 15	6
<b>Serum Bikarbonat (mg/l)</b>	15-19	3
	> 20	0
	< 4,0	0
<b>Bilirubin (mg/dl)</b>	4,0-5,9	4
	> 6,0	9
	> 6	26
	6-8	13
<b>GCS (vor Sedierung)</b>	9-10	7
	11-13	5
	14-15	0
	metastasierende Tumorerkrankung	9
<b>Vorerkrankungen</b>	maligne hämatologische Erkrankung	10
	AIDS	17
	geplant chirurgisch	0
<b>Zuweisung auf die Intensivstation</b>	medizinisch	6
	ungeplant chirurgisch	8





**Abbildung 34:** Auswertung SAPS II Score (Le Gall, 1993)

*Punktsammenwerte: Minimum: 0 Punkte, Maximum: 163 Punkte*

## 7.6 Anhang Glasgow Coma Scale

**Tabelle 20: Glasgow Coma Scale** (Teasdale and Jennett, 1974)

*Punktsammenwerte: Minimum: 3 Punkte, Maximum: 15 Punkte*

Punkte	Augen öffnen	verbale Reaktion	motorische Reaktion
6	-	-	auf Aufforderung
5	-	konversationsfähig und orientiert	gezielt auf Schmerzreiz
4	spontan	desorientiert	Beugeabwehr
3	auf Aufforderung	inadäquate Äußerungen	Beugesynergismen
2	auf Schmerzreiz	unverständliche Laute	Strecksynergismen
1	keine Reaktion	keine Reaktion	keine Reaktion

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b> Die primäre Hämostase: Initiation, modifiziert nach (Jurk and Kehrel, 2005) .....	8
<b>Abbildung 2:</b> Die primäre Hämostase: Adhäsion, modifiziert nach (Jurk and Kehrel, 2005) .....	9
<b>Abbildung 3:</b> Die primäre Hämostase: Aktivierung und Aggregation, modifiziert nach (Jurk and Kehrel, 2005) .....	10
<b>Abbildung 4:</b> Die Gerinnungskaskade, modifiziert nach (Bishop and Lawson, 2004) .....	12
<b>Abbildung 5:</b> Das Protein C/S-System, modifiziert nach (Bouwens et al., 2013) ....	15
<b>Abbildung 6:</b> Das Sepsis Kontinuum nach S2-Leitlinie, modifiziert nach (Levy et al., 2003) .....	19
<b>Abbildung 7:</b> Die Stadien der Sepsis, modifiziert nach (Jawad et al., 2012) .....	20
<b>Abbildung 8:</b> Die zeitliche Entwicklung der Sepsis Leitlinien, eigene Abbildung .....	21
<b>Abbildung 9:</b> Der Studienablauf .....	30
<b>Abbildung 10:</b> Oligonucleotide-Enzyme-Capture-Assay, eigene Abbildung .....	35
<b>Abbildung 11:</b> Inzidenz (%) der 28-Tage Mortalität des Studienkollektivs .....	37
<b>Abbildung 12:</b> Prävalenz (%) der septischen Fokusse in der Studienpopulation ....	39
<b>Abbildung 13:</b> Liegedauer auf Intensivstation (Tage): Gesamtpopulation, Vergleich Überlebende und Verstorbene .....	41
<b>Abbildung 14:</b> Boxplots der INR-Werte in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6 .....	43
<b>Abbildung 15:</b> Boxplots der PTT-Werte (sek) in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6 .....	44
<b>Abbildung 16:</b> Boxplots der Thrombozyten-Werte ( $10^9/l$ ) in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6 .....	45
<b>Abbildung 17:</b> Boxplots der TAT-Werte (ng/ml) in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6 .....	46
<b>Abbildung 18:</b> Boxplots der F 1+2-Werte (nmol/l) in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6 .....	47
<b>Abbildung 19:</b> Boxplots der D-Dimere (mg/l) in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6 .....	48

---

<b>Abbildung 20:</b> Boxplots der PC-Aktivität (%) in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6 .....	49
<b>Abbildung 21:</b> Boxplots der INR-Werte an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene .....	50
<b>Abbildung 22:</b> Boxplots der PTT-Werte (sek) an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene .....	51
<b>Abbildung 23:</b> Boxplots der Thrombozyten ( $10^9/l$ ) an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene .....	52
<b>Abbildung 24:</b> Boxplots der TAT-Werte (ng/ml) an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene .....	53
<b>Abbildung 25:</b> Boxplots der F 1+2-Werte (nmol/l) an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene .....	54
<b>Abbildung 26:</b> Boxplots der D-Dimere (mg/l) an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene .....	55
<b>Abbildung 27:</b> Boxplots der PC-Aktivität (%) an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene .....	56
<b>Abbildung 28:</b> Balkendiagramm der Inzidenz-Werte (%) von APC oberhalb des LOQ in der Gesamtpopulation an Tag 0, 1, 3 und 6 .....	57
<b>Abbildung 29:</b> Boxplots der APC-Werte (ng/ml) in der Gesamtpopulation gemessen an Tag 0, 1, 3 und 6 .....	58
<b>Abbildung 30:</b> Boxplots der APC-Werte (ng/ml) an Tag 0, 1, 3 und 6 im Vergleich Überlebende vs. Verstorbene .....	59
<b>Abbildung 31:</b> ROC-Kurve von APC für die Vorhersage der Mortalität .....	62
<b>Abbildung 32:</b> ROC-Kurve von TAT für die Vorhersage der Mortalität.....	62
<b>Abbildung 33:</b> APACHE II Score (Knaus et al., 1985) .....	88
<b>Abbildung 34:</b> Auswertung SAPS II Score (Le Gall, 1993) .....	91

## 9 TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1:</b> Die Gerinnungsfaktoren (Pötzsch and Madlener, 2010) .....	11
<b>Tabelle 2:</b> Parameter der Blutgerinnung (Pötzsch and Madlener, 2010) .....	17
<b>Tabelle 3:</b> Biomarker im Rahmen des septischen Schocks (Huang et al., 2019).....	22
<b>Tabelle 4:</b> Ein- und Ausschlusskriterien .....	29
<b>Tabelle 5:</b> Übersicht der dokumentierten Patientendaten .....	31
<b>Tabelle 6:</b> Übersicht der klinischen Parameter zu Studienbeginn .....	32
<b>Tabelle 7:</b> Laborparameter an Tag 0, 1, 3 und 6.....	34
<b>Tabelle 8:</b> Basisdaten und Anamnese der gesamten Studienpopulation, Vergleich Überlebende und Verstorbene.....	38
<b>Tabelle 9:</b> Klinische Parameter der gesamten Studienpopulation, Vergleich Überlebende und Verstorbene.....	40
<b>Tabelle 10:</b> Laborparameter an Tag 0 in der Gesamtpopulation, Vergleich Überlebende und Verstorbene.....	42
<b>Tabelle 11:</b> Spearmankorrelationen von APC mit Gerinnungsparametern zu den Zeitpunkten d0, d1, d3, d6 .....	60
<b>Tabelle 12:</b> ROC-Analysen, Cutoff-Werte und AUC .....	61
<b>Tabelle 13:</b> Kreuztabelle APC.....	63
<b>Tabelle 14:</b> Multivariate logistische Regression .....	64
<b>Tabelle 15:</b> DIC-assoziierte Grunderkrankungen.....	85
<b>Tabelle 16:</b> DIC Score (Taylor et al., 2001).....	86
<b>Tabelle 17:</b> Interpretation DIC Score .....	86
<b>Tabelle 18:</b> Auswertung APACHE II Score .....	89
<b>Tabelle 19:</b> SAPS II Score (Le Gall, 1993).....	89
<b>Tabelle 20:</b> Glasgow Coma Scale (Teasdale and Jennett, 1974) .....	91

## 10 EIGENANTEIL UND EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsvorhabens an der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim erstellt. Die Patientendaten wurden durch mich erhoben und ausgewertet. Diese Daten sowie deren Diskussion sind das zentrale Ergebnis dieser Dissertation.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in den folgenden Arbeiten vorab publiziert:

1. Becher, T., Müller, J., Baumann, S., Akin, I., Bosch, K., El-Battrawy, I., Fastner, C., Stach, K., Borggreffe, M., Pötzsch, B., and Loßnitzer, D. (2016). Prognostic value of activated Protein C in patients with septic shock. Posterpräsentation Critical Care Canada Forum, Toronto, 31.10.2016.
2. Becher, T., Müller, J., Akin, I., Baumann, S., Bosch, K., Stach, K., Borggreffe, M., Pötzsch, B., and Loßnitzer, D. (2018). The evolution of activated protein C plasma levels in septic shock and its association with mortality: A prospective observational study. *Journal of Critical Care* 47, 41–48.

Bei der **1. Publikation** handelt es sich um die Veröffentlichung von Teilergebnissen der vorliegenden Arbeit im Rahmen einer Posterpräsentation beim *Critical Care Canada Forum* am 31.10.2016. Mein Eigenanteil an der Publikation erstreckte sich auf die Erhebung und Auswertung der Patientendaten, sowie das Schreiben des Manuskriptentwurfs für das Poster.

Bei der **2. Publikation** handelt es sich um die Veröffentlichung der Daten der vorliegenden Dissertation. Mein Eigenanteil an der Publikation erstreckte sich auf die Erhebung und Auswertung der Patientendaten sowie dem Mitwirken am Verfassen des Manuskriptentwurfs.

## 11 LEBENS LAUF

### PERSONALIEN

Name und Vorname: Bosch, Katharina  
Geburtsdatum: 11.04.1989  
Geburtsort: Mannheim  
Familienstand: ledig  
Vater: Arnold Bosch  
Mutter: Claudia Bosch

### SCHULISCHER WERDEGANG

1999 – 2008 St. Paulusheim, Bruchsal  
17.06.2008 Abitur

### UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2008/09 - 2011 Studium der Zahnmedizin an der Universität Heidelberg  
SS 2012 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg  
19.03.2014 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)  
2014 - 2018 Hauptstudium  
06.04.2017 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)  
07.06.2018 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

### BERUFLICHER WERDEGANG

2018-2019 Universitätsklinikum Regensburg, Unfallchirurgie  
2020 Krankenhaus Neuwittelsbach, München, Innere Medizin  
2020-2021 Krankenhaus für Naturheilweisen, München, Innere Medizin

## 12 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Ibrahim Akin danke ich für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Tobias Becher, der mir zum Verständnis vieler Quellen verhalf und mir wichtige sachliche Hinweise gab. Ebenso bedanke ich mich für die unermüdliche Betreuung und Geduld, sowie die Durchsicht meiner Arbeit und vielen Anregungen, die zur Vollendung derselben notwendig waren.

Der Dank der meinen Eltern, Arnold und Claudia Bosch, gebührt, ist nicht in Worte zu fassen. Ihre immerwährende Unterstützung und der stete Glaube an mich, haben es mir erst möglich gemacht, mich dieser Promotion zu widmen. Danke für eure endlose Liebe. Euch ist diese Arbeit gewidmet.

Zuletzt möchte ich mich bei Sebastian Lorenz bedanken. Seine unermüdliche Unterstützung und Geduld, haben wesentlich zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen. Danke für deinen Rückhalt.