

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Claus Vogelmeier
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort
Marburg

Identifikation von prognostischen Markern bei Patienten mit Sepsis



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Wiebke Regner, geb. Groenewold
aus Leer

Marburg 2015

Angenommen im Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
24.07.2015

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. Dr. R. Bals

Korreferent: Herr Prof. Dr. M. Lohoff

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Sepsis – eine systemische Entzündungsreaktion	1
1.1.1 Definition der unterschiedlichen Erscheinungsformen und Schweregrade	1
1.1.2 Pathophysiologie der Sepsis	2
1.1.3 Therapie der Sepsis	4
1.2 Vitamin D	6
1.2.1 Stoffwechsel des Vitamin D	6
1.2.2 Immunregulatorische Effekte von Vitamin D	8
1.2.3 Vitamin-D-Mangel	11
1.3 Cathelicidin-LL-37	13
1.3.1 Struktur, Vorkommen und Eigenschaften	13
1.3.2 Cathelicidine und ihre Rolle bei systemischen Infektionen	15
1.3.3 Cathelicidin und Vitamin D	17
1.4 Alpha ₁ -Antitrypsin als Akute-Phase-Protein.....	18
2 Fragestellung	19
3 Methoden	20
3.1 Patienten.....	20
3.2 Ein- und Ausschlusskriterien	20
3.2.1 Einschlusskriterien	20
3.2.2 Ausschlusskriterien	20
3.3 Studienablauf	21
3.4 APACHE-II-Score, SOFA-Score und MOD-Score	21
3.5 Bestimmung des 1,25-Dihydroxycholecalciferols.....	22
3.6 Bestimmung des 25-Hydroxycholecalciferols	22
3.7 Bestimmung des Alpha ₁ -Antitrypsins.....	23
3.8 Quantitative Bestimmung der Expression der Cathelicidin-LL-37-mRNA.....	23
3.9 Cathelicidin-LL-37-ELISA	25
3.10 Statistische Auswertung	26
4 Ergebnisse	27
4.1 Patienten.....	27
4.1.1 Patientencharakteristika	27
4.1.2 Labordaten und Intensivscores	29
4.2 Patienten auf Intensivstationen sind Vitamin-D ₃ defizient	32

4.3	SIRS-Patienten haben signifikant niedrigere Vitamin-D ₃ -Spiegel als Kontrollpatienten von Intensivstation	34
4.4	Das antimikrobielle Peptid Cathelicidin LL-37 ist bei SIRS-Patienten nicht signifikant erniedrigt	38
4.4.1	Relative Expression der Cathelicidin LL-37-mRNA.....	38
4.4.2	Cathelicidin LL-37-Serum-Spiegel	39
4.5	Korrelation zwischen 25-Hydroxycholecalciferol und Cathelicidin-LL-37.....	41
4.6	Alpha ₁ -Antitrypsin ist als Akute-Phase-Protein bei SIRS signifikant erhöht.....	43
4.7	Zusammenhang zwischen 25-Hydroxycholecalciferol und APACHE-II-Score als Maß für die Schwere der Erkrankung	44
4.8	Zusammenhang zwischen Cathelicidin-LL-37 und APACHE-II-Score als Maß für die Schwere der Erkrankung	47
4.8.1	Cathelicidin-LL-37-mRNA.....	47
4.8.2	Cathelicidin-LL-37-Serum-Spiegel.....	48
5	Diskussion	49
5.1	Vitamin-D-Insuffizienz und SIRS	49
5.2	Cathelicidin-LL-37 und SIRS	51
5.3	Alpha ₁ -Antitrypsin und SIRS.....	54
5.4	Zusammenhang zwischen Serumparameter und Schweregrad der Erkrankung.....	54
5.5	Schlussfolgerung.....	55
6	Zusammenfassung.....	57
7	Summary.....	59
	Literaturverzeichnis.....	61
	Verzeichnis akademischer Lehrer	76
	Danksagung	77

Abkürzungsverzeichnis

ACCP	American College of Chest Physicians
ANOVA	Analysis of variance
APACHE-II	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
BMI	Body-Mass-Index
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary Desoxyribonucleic-acid
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonucleic-acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F _I O ₂	Fraction of inspired oxygen
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
I.U.	International Units
KI	Konfidenzintervall
LPS	Lipopolysaccharid
Max	Maximum
Min	Minimum
MOD	Multiple Organ Dysfunction
mRNA	messenger Ribonucleic-acid
MW	Mittelwert
NF κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer
NO	Stickstoffmonoxid
p _a O ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
p _a CO ₂	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
r	Spearman-Koeffizient
RNA	Ribonucleic-acid
RT-PCR	Real-time Polymerase chain reaction
SCCP	Society of Critical Care Medicine
SD	Standardabweichung
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
SOFA	Sequential organ failure assessment
TGF β	Transforming Growth Factor β
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
VDB	Vitamin-D-bindendes Protein
VDR	Vitamin D Rezeptor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bildung von 1,25-Dihydroxycholecalciferol	7
Abbildung 2: 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel bei SIRS-Patienten im Winter- (November bis April, $n = 18$) und Sommerhalbjahr (Mai bis Oktober, $n = 14$)	32
Abbildung 3: 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel bei Patienten der Intensiv- Kontrolle im Winter- (November bis April, $n = 6$) und Sommerhalbjahr (Mai bis Oktober, $n = 10$)	33
Abbildung 4: 1,25-Dihydroxycholecalciferol-Spiegel zum Zeitpunkt der Aufnahme bei SIRS-Patienten, Patienten der Intensiv-Kontrolle und der gesunden Kontrolle	35
Abbildung 5: 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel zum Zeitpunkt der Aufnahme bei SIRS-Patienten, Patienten der Intensiv-Kontrolle und der gesunden Kontrolle	37
Abbildung 6: Relative Expression der Cathelicidin LL-37-mRNA zum Zeitpunkt der Aufnahme bei SIRS-Patienten, Patienten der Intensiv-Kontrolle und der gesunden Kontrolle	39
Abbildung 7: Cathelicidin-LL-37-Serum-Spiegel zum Zeitpunkt der Aufnahme bei SIRS-Patienten, bei Patienten der Intensiv-Kontrolle und bei Probanden der gesunden Kontrolle	40
Abbildung 8: Korrelation zwischen der relativen Cathelicidin-LL-37-mRNA- Expression und dem Cathelicidin-LL-37-Serum-Spiegel bei SIRS- Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation.	41
Abbildung 9: Korrelation von 25-Hydroxycholecalciferol [ng/ml] und Cathelicidin- LL-37-Serum-Spiegel [ng/ml] bei SIRS-Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation.	42
Abbildung 10: Korrelation von 25-Hydroxycholecalciferol [ng/ml] und relativer Expression der Cathelicidin-LL-37-mRNA	42
Abbildung 11: Alpha ₁ -Antitrypsin-Spiegel zum Zeitpunkt der Aufnahme bei SIRS- Patienten, bei Patienten der Intensiv-Kontrolle und bei Probanden der gesunden Kontrolle	44
Abbildung 12: APACHE-II-Score der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle in Abhängigkeit von der 25- Hydroxycholecalciferol-Serum-Konzentration – Einteilung in vier Gruppen.....	45
Abbildung 13: APACHE-II-Score der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle in Abhängigkeit von der 25- Hydroxycholecalciferol-Serum-Konzentration – Einteilung nach Suffizienzklassen („suffizient“ ≥ 30 ng/ml, „insuffizient“ 21–29 ng/ml und „defizient“ ≤ 20 ng/ml [nach [24]])	46
Abbildung 14: APACHE-II-Score der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle in Abhängigkeit von der Cathelicidin-LL-37- mRNA-Expression – Einteilung in vier Gruppen.....	47
Abbildung 15: APACHE-II-Score der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle in Abhängigkeit vom Cathelicidin-LL-37-Serum- Spiegel – Einteilung in vier Gruppen	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Patientencharakteristik (Kruskal-Wallis-Test, Chi-Test bei binären Variablen)	27
Tabelle 2:	Patientencharakteristik (Mehrfachnennungen bei Komorbiditäten und Therapie).....	28
Tabelle 3:	Laborchemische Daten und Intensivscores (Kruskal-Wallis-Test, Dunn's Multiple Comparison Test, Mann-Whitney-U-Test für Intensivscores).....	31
Tabelle 4:	Anzahl (Anteil) von Vitamin-D-suffizienten, -insuffizienten und -defizienten Patienten in den Untersuchungsgruppen	33
Tabelle 5:	1,25-Dihydroxycholecalciferol- und 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle bzw. gesunden Kontrolle zum Zeitpunkt der Aufnahme.....	34
Tabelle 6:	1,25-Dihydroxycholecalciferol-Spiegel der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle bzw. gesunden Kontrolle zum Zeitpunkt der Aufnahme.....	34
Tabelle 7:	25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle bzw. gesunden Kontrolle zum Zeitpunkt der Aufnahme.....	36
Tabelle 8:	Übersicht über die Cathelicidin LL-37 mRNA Expression bei SIRS-Patienten, Patienten der Intensiv-Kontrolle und Probanden der gesunden Kontrolle.	38
Tabelle 9:	Cathelicidin LL-37-Serumspiegel der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle bzw. gesunden Kontrolle zum Zeitpunkt der Aufnahme.....	40
Tabelle 10:	Übersicht über die Alpha ₁ -Antitrypsin-Spiegel [mg/l] bei SIRS-Patienten, Patienten der Intensiv-Kontrolle und Probanden der gesunden Kontrolle,	43

1 Einleitung

1.1 Sepsis – eine systemische Entzündungsreaktion

1.1.1 Definition der unterschiedlichen Erscheinungsformen und Schweregrade

Bei der Sepsis handelt es sich um eine schwere systemische durch Infektionen ausgelöste Entzündungsreaktion, die mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden ist [25]. In den USA treten geschätzt 751.000 Fälle pro Jahr auf, 215.000 Betroffene versterben an dieser Erkrankung [14]. In Deutschland erkranken jährlich zwischen 76 und 110 Personen pro 100.000 Einwohner [56].

Die systemische Reaktion reicht von einer leichten Entzündungsreaktion bis hin zum Multiorganversagen. Eine Sepsis kann nach den Kriterien der ACCP/SCCM-Konsensus-Konferenz (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine) diagnostiziert werden, wobei erst die Kombination mehrerer diagnostischer Komponenten wie Vitalparameter, Laborparameter und Organ(dys)funktionen zur Diagnose führt [2]:

- Infektion: Eine Infektion bezeichnet das Eindringen von pathogenen Organismen in normalerweise steriles Wirtsgewebe.
- Bakteriämie: Bakteriämie bezeichnet das Vorhandensein von Bakterien im Blut.
- SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrom): Das SIRS ist eine systemische entzündliche Antwort auf eine Vielzahl von schweren klinischen Angriffen, die nicht zwangsläufig infektiös sein müssen. Ein SIRS manifestiert sich durch zwei oder mehrere der folgenden Kriterien:
 - Temperatur $\leq 36\text{ °C}$ oder $\geq 38\text{ °C}$
 - Herzfrequenz ≥ 90 Schläge/min
 - Atemfrequenz ≥ 20 Atemzüge/min oder $p_a\text{CO}_2$ (arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck) ≤ 32 mmHg
 - Leukozytenzahl $> 12\ 000/\text{mm}^3$ oder $\leq 4000/\text{mm}^3$ oder $> 10\%$ unreife neutrophile Granulozyten
- Sepsis: Eine Sepsis bezeichnet die systemische entzündliche Antwort auf eine Infektion. Die Sepsis ist definiert durch das Vorhandensein von mindestens zwei der SIRS-Kriterien und dem mikrobiellen oder klinischen Nachweis einer Infektion.

- Schwere Sepsis: Dabei handelt sich um eine Sepsis, die mit einer Organdysfunktion und Hypoperfusion oder Hypotension assoziiert ist. Die Hypoperfusion bzw. anormale Perfusion kann eine Laktatazidose, Oligurie oder mentale Veränderungen beinhalten, beschränkt sich aber nicht darauf. Die auftretenden Organdysfunktionen sind im Einzelnen:
 - Akute Enzephalopathie
 - Arterielle Hypotension (systolischer Blutdruck < 90 mmHg)
 - Relative oder absolute Thrombozytopenie (Abfall um mehr als 30 % in 24 h oder < 100 000/mm³)
 - Arterielle Hypoxämie (p_aO_2 (arterieller Sauerstoffpartialdruck) < 75 mmHg oder p_aO_2/F_iO_2 (Fraction of inspired oxygen) < 250 mmHg unter Sauerstoffgabe)
 - Renale Dysfunktion (Diurese < 0,5 ml/kg Körpergewicht/h für mindestens 2 h oder Anstieg des Serumkreatinins auf das Zweifache des oberen Grenzwertes)
 - Metabolische Azidose (Base Excess < -5 mmol/l oder Laktatkonzentration 1,5-fach oberhalb des Referenzbereiches)
- Septischer Schock: Es liegt eine Sepsis mit Hypotension (systolischer Blutdruck < 90 mmHg) vor, die mit adäquatem Flüssigkeitsersatz nicht behandelt werden kann, keine andere ersichtliche Ursache hat und den Einsatz von Vasopressoren nötig macht.

1.1.2 Pathophysiologie der Sepsis

Eine Entzündungsreaktion dient in erster Linie dazu, die eingedrungenen Mikroorganismen zu beseitigen. Dabei kann es auch zu einer überschießenden Immunantwort mit einem möglicherweise tödlichen Ausgang kommen.

Neben Pathogenen wie Bakterien, Pilzen und Viren können auch Verbrennungen oder andere Traumata Auslöser für eine Immunreaktion mit Zytokinfreisetzung sein. Zytokine sind Botenstoffe, die der Kommunikation zwischen Zellen (des Immunsystems) dienen. Zu ihren Aufgaben gehören das Anlocken und/oder die Aktivierung von Abwehrzellen, das Wachstum und die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen sowie die Regulation der Produktion von Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren.

Pathogene tragen an ihrer Oberfläche Strukturen, „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMP), die von „pattern-recognition receptors“ (PRR) auf Immunzellen er-

kannt werden [72]. Zu den „pattern-recognition receptors“ gehören die Toll-like-Rezeptoren (TLR). Der TLR4 erkennt und bindet zusammen mit dem Lipopolysaccharid-(LPS)-bindenden Protein (LBP) und CD14 (Cluster of differentiation) das LPS in der Zellwand gram-negativer Bakterien. Durch die Bindung des Liganden wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer) die Expression von Genen inflammatorischer Zytokine induziert [78, 82]. Gram-positive Bakterien, wie *Neisseria meningitidis*, *Leptospira* und *Porphyromonas*, binden an den TLR2, was über eine ähnliche Signalkaskade ebenfalls zu einer vermehrten Zytokinfreisetzung führt.

Im Rahmen der Immunantwort werden auch Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen aktiviert, die Antigene präsentieren und Immunmodulatoren, antimikrobielle Proteine und Zytokine freisetzen. Daneben werden neutrophile Granulozyten zur Zelladhäsion, Phagozytose und Degranulation angeregt. Sauerstoffradikale und proinflammatorische Mediatoren werden ausgeschüttet [80]. Zu den freigesetzten Mediatoren/Zytokinen gehören der Tumornekrosefaktor (TNFα), Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8), Interferon-γ (IFN-γ) und der Macrophage Migratory Inhibitory Factor (MIF). Sekundäre Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO), Komplementfaktoren, Plättchen-aktivierender Faktor, Eicosanoide, Kaspasen, Proteasen, Kinine, Leukotriene und Histamin werden ausgeschüttet [82, 118]. Als ein wichtiger früher Mediator stimuliert TNFα bei einer Sepsis die Freisetzung von weiteren proinflammatorischen Mediatoren und führt darüber hinaus zu einem kapillären Leck, mikrovaskulären Thromben und vermindertem Herzzeitvolumen [80].

Der Komplementfaktor C5a ist chemotaktisch wirksam, beeinflusst ebenfalls die Freisetzung von Zytokinen und wirkt auf die Gerinnungskaskade ein [72]. Bei einem Überangebot von C5a kann die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten gestört sein [80].

Bei einer Sepsis wird das Gewebe nicht nur durch die Mikroorganismen selbst, sondern auch durch zahlreiche körpereigene Mediatoren geschädigt. Die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel führt zur lokalen Freisetzung von Radikalen und Proteasen, die das Gewebe zerstören können [80].

Gleichzeitig wird auch das Gerinnungssystem durch Zytokine aktiviert. Dabei kann es zu Gefäßverschlüssen kommen, die eine Hypoperfusion des nachfolgenden Gewebes zur Folge haben. Durch den exzessiven Verbrauch von Gerinnungsfaktoren kann diese Hyperkoagulabilität später in eine Hypokoagulabilität übergehen. Die Effekte der Zytokine auf das in- und extrinsische Gerinnungssystem, die Fibrinolyse und Endothelinteraktionen führen potenziell zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung [25]. Eine

überschießende Gerinnung kann außerdem pro-inflammatorische Eigenschaften haben [80].

Die Aktivierung von Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen, die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel, die endotheliale Dysfunktion und die Aktivierung der verschiedenen Kaskaden (Komplement, Gerinnung) und weiterer Mediatoren führen zu mikrovaskulären Verletzungen, Thromben, einem Verlust der Zellintegrität und zu einer Gewebeischämie. Die Mikrozirkulation ist gestört und die Autoregulation der Gefäße versagt, es kommt zur Organminderperfusion, die mit einem Versagen des betroffenen Organs enden kann [15, 82, 118].

Durch die Gewebeschäden werden „damage-associated molecular pattern molecules“ freigesetzt, die die generalisierte Immunantwort der Sepsis fördern und in deren Folge noch mehr Zytokine freigesetzt werden [72].

Daneben produziert der Körper anti-inflammatorische Mediatoren (IL-10, lösliche TNF-Rezeptoren, Transforming Growth Factor β (TGF β), IL-1-Rezeptor Antagonisten, Prostazyklin I₂, Phosphatasen, Hitze-Schock-Proteinen und Cortisol)). Im Regelfall wird ein empfindliches Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Prozessen aufrechterhalten [118].

Nach der ersten pro-inflammatorischen Phase tritt im Verlauf der Sepsis eine zweite, anti-inflammatorische, immunsuppressive Phase auf. Neutrophile Granulozyten produzieren keine aktivierenden Zytokine mehr, die Apoptose von Lymphozyten und dendritische Zellen setzt ein und supprimierende Zell-Typen überwiegen [33, 72]. Auch eine überschießende immunsuppressive Reaktion kann zu einem letalen Ausgang führen.

Ausschlaggebend für das Überleben einer schweren Infektion ist also auch die Aufrechterhaltung des empfindlichen Gleichgewichts zwischen pro- und anti-inflammatorischer Antwort.

1.1.3 Therapie der Sepsis

Wichtig für die erfolgreiche Behandlung einer Sepsis ist zunächst die Identifizierung des Fokus und des verursachenden Keimes. Die (chirurgische) Fokussanierung und der Einsatz von breit wirkenden Antibiotika bei unbekanntem Erreger bzw. eine zielgerichtete Antibiotikagabe bilden die Grundlage der Therapie.

Ein engmaschiges Monitoring des Blutdrucks, des Puls, des Zentralvenendruck, der Sauerstoffsättigung, der Flüssigkeitsbilanz sowie verschiedener Laborparameter, die Auskunft über einzelne Organfunktionen geben, und weitere klinische Untersuchungen sind wichtig, um Situation und Verlauf einschätzen zu können.

Die Flüssigkeitsgabe, der Einsatz von Katecholaminen und inotropen Substanzen, die die hämodynamische Funktion aufrechterhalten, und die Gabe von Blutprodukten wie Erythrozytenkonzentrate, Thrombozytenkonzentrate und FFP (fresh frozen plasma) spielen eine große Rolle bei der Therapie.

Die Gabe von Hydrocortison wird zwar in den Leitlinien noch empfohlen, hat aber in neueren Studien keinen generellen Überlebensvorteil gezeigt [139].

Weiterhin dienen eine nicht-invasive oder invasive Beatmung und eine Dialyse (vor allem die „continuous venovenous hemofiltration“, CVVH) dem Erhalt und der Unterstützung der Organfunktionen [15, 70, 80, 118].

Ein neuer Therapieansatz beinhaltet die Gabe von aktiviertem Protein C (Drotrecogin alpha, Xigris), das antikoagulatorisch, pro-fibrinolytisch, anti-inflammatorisch und anti-apoptotisch wirkt. Sein Einsatz beschränkt sich auf die schwere Sepsis. Neuere Studien belegen jedoch keinen Überlebensvorteil bei einer solchen Therapie, sondern das Auftreten von schweren Blutungskomplikationen [108, 118].

Klinische Studien mit dem „recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI₂₁) zeigten erste positive Ergebnisse. Patienten mit Meningokokkensepsis, die mit rBPI₂₁ behandelt wurden, mussten sich seltener schweren Amputationen unterziehen [96]. Der Einsatz von TLR-Antagonisten bei einer Sepsis wird dadurch limitiert, dass auch Prozesse inhibiert werden, die für das Überwinden der Sepsis notwendig sind [37]. Die Gabe von Cathelicidinen konnte bislang nur im Tierversuch die Letalität der Sepsis verringern [45]. Antikörper gegen verschiedene Zytokine, Komplementfaktor C5a und gegen LPS zeigten keinen oder nur wenig Erfolg [47, 80, 130, 153].

Bislang beschränkt sich die Therapie einer Sepsis auf eine Elimination der Erreger sowie auf eine Unterstützung der Organfunktionen und hat daher einen überwiegend supportiven Charakter. Derzeit können weder die pro-inflammatorische noch die immunsuppressive Phase der Sepsis, die beide zu einem letalen Ausgang führen können, direkt beeinflusst werden. Daher werden dringend neue Therapieansätze benötigt, um schwere Verläufe einer Sepsis besser behandeln oder durch die Förderung von protektiven Faktoren und durch präventive Maßnahmen vermeiden zu können.

1.2 Vitamin D

1.2.1 Stoffwechsel des Vitamin D

Vitamin D gehört zu den fettlöslichen Vitaminen und ist vor allem für den Knochenaufbau von großer Bedeutung.

Man unterscheidet Vitamin D₂ (Ergocalciferol), das in pflanzlichen Produkten und Hefen enthalten ist, Vitamin D₃ (Cholecalciferol) und die Metabolite 25-Hydroxycholecalciferol (Calcidiol) und 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol). Vitamin D₃ wird unter dem Einfluss von Sonnenlicht (UV-B) in der Haut synthetisiert. Als Provitamin wirkt 7-Dehydrocholesterol, das in der Leber aus Cholesterin entsteht und aus dem in der Haut durch UV-Einstrahlung und Wärmeeinwirkung Cholecalciferol gebildet werden kann [77]. In der Haut werden ca. 0,045 nmol/d/cm² produziert. Nach ca. 20 min UV-Bestrahlung wird eine Konzentration an Cholecalciferol in der Haut erreicht, die dann nicht weiter zu steigen scheint [147]. Die Menge des gebildeten Cholecalciferols ist dabei von der Sonnenexposition, der Pigmentierung und dem Alter abhängig [67, 76, 99]. Mit zunehmendem Alter (>70 Jahre) sinkt die Produktion in der Haut auf ca. 25 % [75]. Das fettlösliche Vitamin findet sich auch in öligem Fisch, z. B. Lachs, Makrelen, Sardinen und Kabeljau, in Lebertran, Butter und Eigelb [76].

Cholecalciferol und Ergocalciferol werden im Dünndarm durch passive Diffusion resorbiert, in Chylomikronen integriert und nach deren Abbau im Blut an Vitamin-D-bindendes Protein gebunden zur Leber transportiert. In der Leber wird das mit der Nahrung aufgenommene und das in der Haut durch Sonnenlicht synthetisierte Vitamin D durch eine Hydroxylase (25-OHase) zu 25-Hydroxycholecalciferol umgewandelt [75]. Seine Konzentration ist deutlich höher als die des 1,25-Dihydroxycholecalciferols und eignet sich zur Bestimmung des Versorgungszustandes.

In der Niere, vor allem im Pars convoluta des distalen Tubulus, aber auch in anderen Bereichen der Niere, wie im proximalen Tubulus, im Sammelrohr und in der Henle-Schleife, in Keratinozyten, Lymphknoten, Epithelzellen des Kolons und des Dünndarms, Inselzellen des Pankreas und Endothelzellen wird 25-Hydroxycholecalciferol durch die 1 α -Hydroxylase in die aktive Form 1,25-Dihydroxycholecalciferol umgewandelt [30, 160].

Die folgende Abbildung 1 gibt eine Übersicht über die Bildung des aktiven Metaboliten 1,25-Dihydroxycholecalciferol (nach [76]):

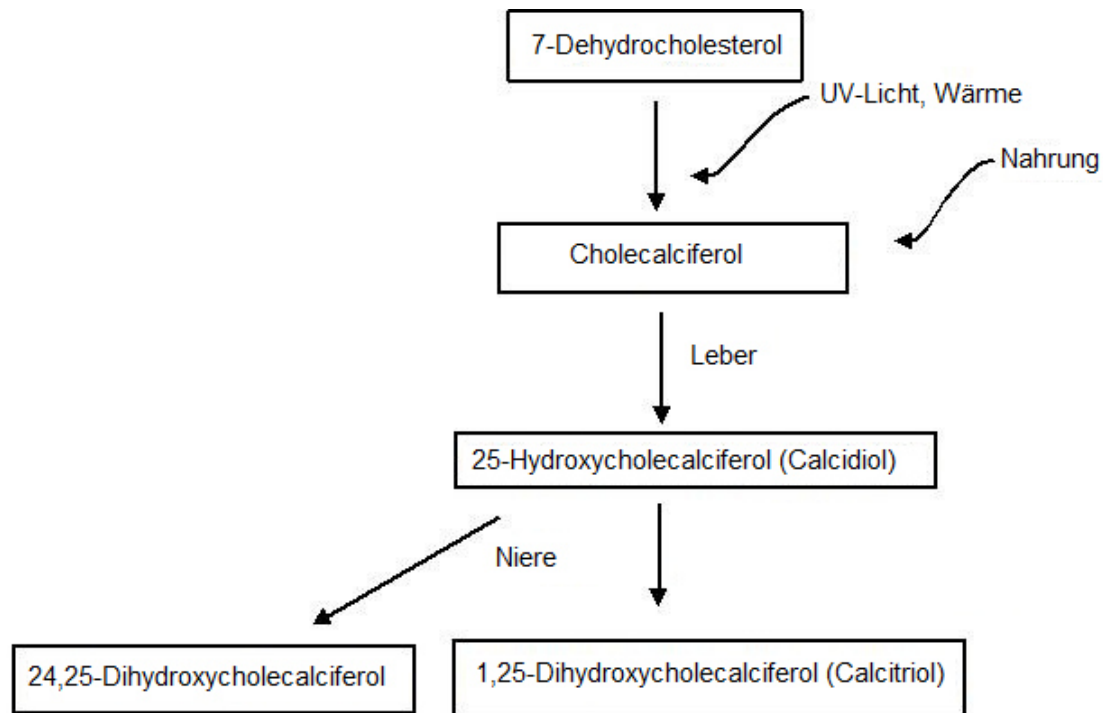


Abbildung 1: Bildung von 1,25-Dihydroxycholecalciferol

Die 1α -Hydroxylase wird über den Calcium-Phosphat-Haushalt reguliert. Parathormon, niedrige Calciumspiegel und hohe Phosphatspiegel fördern die Umwandlung zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol, was wiederum negativ rückkoppelnd auf die Parathormonsekretion und die Expression der 1α -Hydroxylase wirkt [99]. Calcium übt zudem einen negativ regulatorischen Effekt auf Parathormon aus. 1,25-Dihydroxycholecalciferol aktiviert die 24-Hydroxylase, ein Enzym, das die Reaktion von 1,25-Dihydroxycholecalciferol zu dem inaktiveren 1,24,25-Trihydroxyvitamin D₃ oder 24,25-Dihydroxyvitamin D₃ katalysiert, und reguliert daher im Sinne einer negativen Rückkopplung seine eigene Konzentration. Dieser Mechanismus wirkt vor allem auto- und parakrin auf 1,25-Dihydroxycholecalciferol-produzierende Zellen abseits der Niere [73, 76, 142].

1,25-Dihydroxycholecalciferol bindet innerhalb der Zelle an den Vitamin-D-Rezeptor (VDR), was zur Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor führt. Die entstehenden Komplexe binden mit weiteren Kofaktoren an die VDR-sensible Region (VDRE, Vitamin D Responsive Elements) von verschiedenen Genen und regulieren so unter anderem die Bildung Calcium-bindender Proteine [142].

Damit fördert Vitamin D die Calcium- und Phosphat-Resorption im Darm und über die Regulation der Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten den Knochenaufbau. In den distalen Tubuli der Niere kommt es zur vermehrten Rückresorption von Calcium und Phosphat [142].

Zur Diagnostik eines Vitamin-D-Mangels sollte das 25-Hydroxycholecalciferol gemessen werden. 1,25-Dihydroxycholecalciferol fällt schon bei leicht eingeschränkter Nierenfunktion ab und kann auch bei einem 25-Hydroxycholecalciferol-Defizit noch normal oder sogar erhöht sein [76].

Der Vitamin-D-Stoffwechsel wird durch externe und interne Faktoren moduliert. Eine Malabsorption bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie eine verminderte Synthese von 1,25-Dihydroxycholecalciferol bei Niereninsuffizienz, primärem und sekundärem Hyperparathyroidismus und Lebererkrankungen führen zu niedrigen Vitamin-D-Spiegeln [77]. Bei Sarkoidose und der Vitamin-D-abhängigen Rachitis Typ II kommt es zu erhöhten Vitamin-D-Spiegeln [3, 105].

1.2.2 Immunregulatorische Effekte von Vitamin D

Der VDR konnte außer auf den üblichen Zielorganen wie Dünndarm (Epithel mit Mikrovilli), Niere (proximaler Tubulus, Pars convoluta) und Knochen (Osteoklasten, Osteoblasten) auch auf Keratinozyten, Endothelzellen, Inselzellen des Pankreas, Epithelzellen der Atemwege, Kolonzellen, Lymphozyten, Brustgewebe, Prostatazellen, im Gehirn und auf Makrophagen, dendritischen Zellen, Promyelozyten und aktivierten T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Es wurde daher vermutet, dass Vitamin D neben der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase und des Knochenstoffwechsels noch weitere Funktionen haben muss [36, 55, 57, 71, 77]. Diese Vermutung wird durch die extrarenale Expression der 1α -Hydroxylase unterstützt [160]. Die 1α -Hydroxylase konnte unter anderem in der Haut, in Lymphknoten, im Kolon und im Pankreas, in Endothelzellen und in Makrophagen, dendritischen Zellen sowie in T- und B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Die 1α -Hydroxylase wird in extrarenalen Zellen und Geweben nicht durch den Parathormon-Calcium-Vitamin-D-Regelkreis reguliert [36]. Eine Stimulation des Endothels mit TNF α oder LPS führt zu einer erhöhten Enzymaktivität der 1α -Hydroxylase. Weiter wird die Adhäsion von Monozyten durch 25-Hydroxycholecalciferol und 1,25-Dihydroxycholecalciferol gefördert. 1,25-Dihydroxycholecalciferol wirkt dabei vermutlich über autokrine/parakrine Regelkreise. Reife dendritische Zellen mit einer geringen VDR-Expression synthetisieren 1,25-Dihydroxycholecalciferol, das dann auf VDR-reiche unreife dendritische Zellen wirkt. In Endothelzellen kann durch eine parakrine Wirkung die Aktivierung von NF κ B durch LPS und damit die Zytokin-Produktion in benachbarten Zellen verhindert werden [57]. 1,25-Dihydroxycholecalciferol ist damit an der Eindämmung einer überschießenden, für den Organismus schädlichen Reaktion auf Pathogene beteiligt. Dieser Mechanismus erfordert aber die Bereitstellung von 25-Hydroxycholecalciferol, was bei einem Vitamin-D-Defizit nicht gewährleistet werden kann [4, 57, 73, 159, 160].

In letzter Zeit rückte die Bedeutung des Vitamin D für die Immunmodulation in den Fokus der klinischen Forschung. Primär spielt Vitamin D für die angeborene Immunabwehr eine wichtige Rolle, aber auch die Regulation der erworbenen Immunantwort wird beeinflusst. Beispielsweise wird die Entwicklung der T-Helferzellen Typ 1 (T_H1 -Zellen) durch Vitamin D_3 gehemmt, wohingegen die Entwicklung der T-Helferzellen Typ 2 (T_H2 -Zellen) unabhängig von der Präsenz Antigen-präsentierender Zellen gefördert wird. Dieser Effekt wird durch die erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 unter der Einwirkung von 1,25-Dihydroxycholecalciferol vermittelt. Durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol wird bei aktivierten T_H -Zellen die Expression von VDR-messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) erhöht [34, 104]. Darüber hinaus inhibiert 1,25-Dihydroxycholecalciferol die Proliferation von T-Zellen und damit auch die Expression von T-Zell-Zytokinen wie IL-2, IFN- γ und TNF α [36].

Im Tiermodell wurde für Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis, Systemischer Lupus erythematoses, chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Diabetes mellitus Typ I gezeigt, dass Vitamin D hyperreaktive T-Zellen inhibiert und daher immunsuppressiv wirkt. Die immunsuppressive Wirkung des 1,25-Dihydroxycholecalciferols wurde im Tierversuch auch erfolgreich zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation verwendet [49].

Der „3rd National Health and Nutrition Examination Survey“ konnte einen Zusammenhang zwischen niedrigen 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegeln und gehäuften Infekten der oberen Atemwege nachweisen. Die Wahrscheinlichkeit für derartige Infekte lag in der Gruppe < 10 ng/ml 25-Hydroxycholecalciferol um 55 % höher. Diese Ergebnisse blieben auch nach Adjustierung demografischer und klinischer Charakteristika sowie der Jahreszeit bestehen [63].

Epidemiologische Untersuchungen in den USA zeigten im Winter eine höhere Sepsisrate als im Sommer oder Herbst [69]. Es wird vermutet, dass die verminderte Sonneneinstrahlung im Winter und ein damit einhergehender niedriger Vitamin-D-Spiegel zu gehäuften Infekten führen.

Wirkung auf das Monozyten-Makrophagen-System

Die für die angeborene und erworbene Immunantwort wichtigen Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems exprimieren ebenfalls den VDR und die 1 α -Hydroxylase [36, 126].

Myeloide Leukämiezellen werden durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol zur Differenzierung zu Makrophagen angeregt [1, 143]. Darüber hinaus werden die chemotaktischen und phagozytotischen Eigenschaften von Monozyten und Makrophagen durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol verstärkt [36].

Monozyten und dendritische Zellen bilden nach Stimulation mit 1,25-Dihydroxycholecalciferol geringere Mengen an IL-12. Die Reifung der dendritischen Zellen wird durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibiert (Verringerung der Expression von CD40, CD80, CD86), wodurch sich ihre Wirkung auf T-Lymphozyten verändert. IL-12 erhöht die Produktion des pro-inflammatorisch wirkenden IFN- γ und trägt zur Aktivierung und Differenzierung von T_H-1-Zellen bei. Letztere spielen bei Autoimmunerkrankungen eine große Rolle [13, 36, 43, 44, 126].

Unter dem Einfluss von IFN- γ wird bei Bindung von LPS an CD14/TLR die Synthese von 1 α -Hydroxylase in Monozyten induziert [140].

Die Sekretion des anti-inflammatorisch wirkenden IL-10 wird durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol angeregt und die Apoptose dendritischer Zellen gefördert [126]. *In vitro* konnte mit 1,25-Dihydroxycholecalciferol eine dosis- und zeitabhängige verminderte Expression der TLR2- und TLR4-Rezeptoren auf Monozyten (nicht auf Keratinozyten oder Endothelzellen [57]) und eine vermehrte Expression von CD14 nachgewiesen werden. Diese Veränderungen resultierten in einer verminderten TNF α -Bildung, einem wichtigen Mediator bei Schock und Multiorganversagen [131].

Beeinflussung der Lipopolysaccharid-Wirkung auf Monozyten und Endothelzellen durch Vitamin D

LPS kann als Bestandteil der Membran gram-negativer Bakterien die Differenzierung von Monozyten inhibieren. Weiter erhöht LPS zwar die VDR-mRNA-Konzentration in Monozyten, aber reduziert den VDR-Protein-Gehalt. Die durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol geförderte Differenzierung von Monozyten/Makrophagen wird inhibiert, was dazu führt, dass die Zellen nicht in der Lage sind, eingedrungene Organismen zu beseitigen [1, 43, 49, 128].

Mit Vitamin D behandelte Endothelzellen reagierten auf LPS-Stimulation mit einer verminderten Expression von NF κ B, IL-6, IL-8 und RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted), was einer (überschießenden) Immunaktivie-

rung entgegen wirken könnte [57]. Verschiedene pathogenetische Mechanismen bei Sepsis betreffen die Störung der Integrität des Endothels (Permeabilität, Koagulation, Autoregulation, Interaktion mit Monozyten/Makrophagen/Neutrophilen). Vitamin D ist also vermutlich in der Lage, diese Integrität bei Infektionen mit gram-negativen Bakterien zu erhalten und die Aktivierung des Endothels durch LPS zu verringern.

Die Tatsache, dass LPS über TLR eine Signalkaskade auslöst, die zur Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen führt, verdeutlicht das immunregulatorische Potential von 1,25-Dihydroxycholecalciferol.

1.2.3 Vitamin-D-Mangel

Es ist davon auszugehen, dass weltweit viele Menschen (1 Milliarde [77]) unter einem Mangel an Vitamin D, zumindest aber unter einer insuffizienten Versorgung, leiden. Der geringe Vitamin-D-Gehalt in der Nahrung, eine verminderte Vitamin-D-Bildung in der Haut in den Wintermonaten oder bei stärker pigmentierter Haut und die abnehmende Syntheserate bei älteren Menschen führen in Europa zu einer Prävalenz von 28–100 % bei der gesunden Bevölkerung und von 70–100 % bei hospitalisierten Patienten [76]. Ab einem Serumspiegel von < 20 ng/ml (50 nmol/l) 25-Hydroxycholecalciferol geht man von einem Defizit aus [77].

Bei Intensivpatienten mit Vitamin-D-Mangel ist die Mortalität dreimal höher als bei Patienten mit einem suffizienten Vitamin-D-Spiegel. Ein bereits im gesunden Zustand vorhandener Mangel an Vitamin D kann sich während einer schweren, intensivpflichtigen Erkrankung besonders negativ auswirken [93, 94].

Im „3rd National Health and Nutrition Examination Survey“ mit 18.883 Teilnehmern mit einem Durchschnittsalter von 38 Jahren lag der durchschnittliche 25-Hydroxycholecalciferol-Wert bei 29 ng/ml. Die „Tromsø“-Studie bestimmte in ihrer Studienpopulation (27.158 Teilnehmer) Werte um $53,5$ nmol/l ± 16 nmol/l ($\approx 21,44$ ng/ml $\pm 6,4$ ng/ml) 25-Hydroxycholecalciferol [81].

Des Weiteren wird ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI) mit einem Vitamin-D-Mangel in Verbindung gebracht, da in Adipozyten vermehrt Vitamin D gespeichert wird und die körperliche Aktivität bei Adipösen herabgesetzt ist [31].

Während zur Prävention der Osteomalazie 10 ng/ml 25-Hydroxycholecalciferol auszureichen scheinen, wird für die Erhaltung der allgemeinen Gesundheit ein deutlich höherer Spiegel gefordert [63].

Derzeit existieren keine einheitlichen Richtwerte, die eine suffiziente, insuffiziente oder defizitäre Versorgung kennzeichnen, aber bei einem Spiegel von > 30 ng/ml geht man

von einer normalen Versorgung aus. Als defizitär bezeichnet man 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel < 20 ng/ml (50 nmol/l). Eine Insuffizienz liegt bei 21–29 ng/ml [77].

Die Halbwertszeit von 25-Hydroxycholecalciferol liegt zwischen einem und zwei Monaten [147]. Um über das ganze Jahr einen Spiegel um 50 nmol/l (≈ 20 ng/ml) aufrecht zu erhalten, muss der Serumspiegel vermutlich im Sommer zwischen 70 und 90 nmol/l (≈ 29 –37 ng/ml) betragen [31].

Ein Vitamin-D-Mangel scheint mit vielen verschiedenen Erkrankungen wie Kolonkarzinomen [62, 115], Prostatakarzinomen [10, 98, 146], kardiovaskulären Erkrankungen [52], Multiple Sklerose [49], chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [6, 39], Diabetes mellitus [6, 39, 100, 125], Systemischem Lupus erythematodes [6, 49] und vielen weiteren Krebserkrankungen [62, 68] in Zusammenhang zu stehen. Ein Kausalzusammenhang zwischen der Erkrankung und dem Vitamin-D-Mangel konnte bislang nicht zweifelsfrei bewiesen werden. Weiterhin ist fraglich, ob nur die Mortalität oder auch die Inzidenz von Krebserkrankungen durch Vitamin D beeinflusst wird [17]. Probanden der „Tromsø“-Studie mit niedrigem Vitamin-D-Spiegel zeigten eine höhere Gesamtmortalität [81].

Intensivpatienten mit niedrigem Vitamin-D-Spiegel, zeigten nach einer Operation eine höhere Infektionsrate und eine längere Verweildauer auf der Intensivstation als Patienten mit ausreichendem Spiegel [58].

Ausreichende Vitamin-D-Spiegel vor einer Nierentransplantation scheinen das Risiko für Krebserkrankungen nach Transplantation und unter Immunsuppression zu verringern [54].

Vitamin-D-Mangel ist also ein weit verbreitetes Phänomen mit möglicherweise unterschätzten Auswirkungen auf die Gesundheit. Derzeit ist aber noch nicht klar, ob und in welcher Höhe Vitamin D beim Erwachsenen substituiert werden sollte und wie Nebenwirkungen (Hypercalcämie) der Hochdosis-Therapie vermieden werden können. In verschiedenen Studien zeigte die Gabe von Vitamin D über mehrere Wochen keinen Effekt auf das Auftreten von Atemwegsinfekten [87, 116]. Für die Behandlung von Psoriasis, Osteoporose und sekundärem Hyperparathyroidismus gibt es zugelassene Vitamin-D-Analoga, die die positiven Effekte von 1,25-Dihydroxycholecalciferol besitzen und weniger hyperkalzämische Nebenwirkungen verursachen (z. B. Tacalcitol, Paricalcitol) [97].

1.3 Cathelicidin-LL-37

1.3.1 Struktur, Vorkommen und Eigenschaften

Bei den Cathelicidinen handelt es sich um eine Familie von antimikrobiellen Peptiden, die im Rahmen der angeborenen Immunabwehr vor allem bei der Barrierefunktion von Epithelien eine Rolle spielen.

Das kodierende Gen für das Cathelicidin-LL-37 wird als CAMP-(Cathelicidin Antimicrobial Peptide)-Gen bezeichnet. Es befindet sich auf Chromosom 3, p21.3 [92].

Cathelicidine werden sowohl in den zytoplasmatischen Granula der Peroxidase-negativen neutrophilen Leukozyten als auch in Epithelzellen und anderen Zellen als inaktive Propeptide gespeichert und nach Aktivierung ausgeschüttet, wo sie dann ihre antimikrobielle Wirkung entfalten [46].

Ihren Namen erhielten die Cathelicidine durch die konservierte Proregion, die einem Peptid namens Cathelin („Cathepsin L Inhibitor“) ähnelt. Cathelicidine besitzen außerdem eine variable C-terminale antimikrobielle Domäne und ein N-terminales Signalpeptid [120, 158].

In verschiedenen Tiermodellen wurden zahlreiche Proteine identifiziert, die zur Gruppe der Cathelicidine gehören. Bisher konnte aber beim Menschen nur das Cathelicidin-LL-37 (bestehend aus 37 Aminosäuren, die ersten beiden Aminosäuren sind Leucine) nachgewiesen werden [152]. hCAP18 („human cationic antimicrobial protein of 18 kDa“) bezeichnet die in Vesikeln gespeicherte Protein-Vorstufe, von der durch die Serinprotease Proteinase 3 das C-terminale reife antibakterielle Peptid, das Cathelicidin-LL-37 abgespalten wird [138]. Das aus den Aminosäuren 1-12 bestehende N-terminale Ende des Cathelicidin-LL-37 besitzt eine chemotaktische Wirkung, ermöglicht eine Oligomerisierung, vermittelt eine proteolytische Resistenz, hat hämolytische Eigenschaften und vermutlich immunmodulatorische Funktion [38]. Das C-terminale Ende (Aminosäuren 32–37) spielt ebenfalls eine Rolle bei der Tetramerbildung und LPS-Bindung. Der mittlere Teil zwischen dem N- und C-terminalen Ende ist für die eigentliche antimikrobielle Aktivität verantwortlich [38, 124]. Das kleinste (synthetische) Peptid mit antimikrobieller Aktivität, KR-12 besitzt eine große Ähnlichkeit zu der Aminosäuresequenz 18–29 im Cathelicidin-LL-37. Nach dem heutigen Kenntnisstand besitzt KR-12 keine toxische Wirkung auf menschliche Zellen [151].

Cathelicidine haben eine amphipatische, sekundäre α -Helix-Peptidstruktur. Die Ausbildung einer α -helikalen Struktur ist vom pH-Wert, der Anionenkonzentration und der Konzentration von Cathelicidin-LL-37 in der Lösung abhängig. Die α -Helix-Struktur ist Voraussetzung für die antimikrobielle Aktivität [85]. Cathelicidin-LL-37 ist insgesamt

positiv geladen. Das N-terminale Ende ist hydrophob, in wässrigen Lösungen bildet Cathelicidin-LL-37 Oligomere. Es ist in der Lage negativ geladene Bakterienmembranen zu penetrieren. Derzeit werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wie Cathelicidin-LL-37 die Bakterienmembranen durchdringen kann:

Die N-terminalen Enden könnten mit der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien interagieren und sich mit Hilfe der helikalen Struktur als transmembranäre Kanäle in die Membran einlagern. Durch eine Art Teppich-Bildung greifen die Cathelicidin-Monomere dann die innere Membran an. Die Bildung von Oligomeren ist Voraussetzung für diesen Angriff.

Alternativ wird eine alleinige Poren- oder Teppich-Bildung als Mechanismus diskutiert. Andere antimikrobielle Peptide bilden keine Poren, sondern zerstören Membranen, indem sie ihre Monomere Teppich-ähnlich auf der Membran anordnen [23, 124].

Für KR-12 konnte gezeigt werden, dass seine positive Ladung die negativ geladenen Phosphatidylglycerol-Bestandteile der Bakterienmembran anzieht [151].

Antimikrobielle Peptide inhibieren innerhalb der Zelle die DNA-(Desoxyribonukleinsäure)- und RNA-Synthese, Enzyme, die Ribosomenfunktion, die Proteinsynthese und Proteinfaltung sowie die Mitochondrienfunktion [127].

Außer in Neutrophilen findet sich Cathelicidin-LL-37 auch im Knochenmark, in Myelozyten und Metamyelozyten, in Atemwegsepithelien, in der Mundschleimhaut, in der Zunge, im Ösophagus, im Hoden, in der Cervix und Vagina, sowie in deren Sekreten (Speichel, Schweiß, Sperma,). Im Plasma kommt es gebunden an Lipoproteinen vor [9, 19, 111, 119, 120, 136, 150]. Im Rahmen von Entzündungen wird es auch von Monozyten, Lymphozyten und Keratinozyten produziert [7, 60].

Cathelicidin-LL-37 ist in der Lage sowohl gram-negative und gram-positive Bakterien als auch Viren und Pilze abzutöten. Auch der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* wird eliminiert [120].

In Keratinozyten erhöhen LPS und IL-1 α die Expression des CAMP-(Cathelicidin antimicrobial peptide)-Genes, wohingegen TNF α , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 und IFN- γ nicht dazu in der Lage sind. Bei der atopischen Dermatitis sind vermutlich erhöhte IL-10-Spiegel für eine verminderte Expression der antimikrobiellen Peptide verantwortlich. Bei Psoriasis ist die Expression von Cathelicidin-LL-37 erhöht. Bei dieser Erkrankung kommt es deutlich seltener als bei der atopischen Dermatitis zu Infektionen mit pathogenen Keimen [79, 123]. In Monozyten konnte die Cathelicidin-LL-37-Expression durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol erhöht werden [109].

Eine weitere wichtige Eigenschaft von Cathelicidin-LL-37 ist die Förderung der Differenzierung von dendritischen Zellen. Nach Exposition exprimieren dendritische Zellen vermehrt phagozytotische und kostimulatorische Rezeptoren, nehmen mehr Antigen auf und bilden vermehrt IL-12 und IL-6, was wiederum T_H1-Zellen aktiviert. Dadurch wird die T_H1-Antwort verstärkt und die T-Zell-Stimulation hält länger an. Aufgrund dieser Effekte kann Cathelicidin-LL-37 als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem angesehen werden [48].

Bei physiologischen Konzentrationen von 1–5 µg/ml Cathelicidin-LL-37 auf Schleimhäuten dominiert eine immunmodulatorische Funktion. Dabei reichen auch Konzentration von < 1 µg/ml zur Neutralisation von Endotoxinen [111]. Während systemischen, pulmonalen und nicht-pulmonalen Infektionen ließ sich bei Neugeborenen eine erhöhte Konzentration von Cathelicidin-LL-37 im Trachealsekret nachweisen. Diese Konzentrationen korrelierten mit dem IL-8- und TNFα-Spiegel [132]. Ein erhöhter Cathelicidin-LL-37-Spiegel fand sich auch in der Lavage-Flüssigkeit von Sarkoidose-Patienten [8]. Weiterhin fördert Cathelicidin-LL-37 die Angiogenese, wodurch die Vaskularisierung von Wunden gesteigert wird. Diese Effekte werden vermutlich über den von Epithelzellen exprimierten FPRL1-(Formyl peptide receptor-like-1)-Rezeptor vermittelt [89].

1.3.2 Cathelicidine und ihre Rolle bei systemischen Infektionen

LPS spielen als Bestandteile von Pathogenen eine große Rolle bei systemischen Infektionen.

Cathelicidine können LPS binden und neutralisieren. Durch die Bindung wird die Anheftung von LPS an CD14 verhindert und die Interaktion von LPS mit dem Lipopolysaccharid-bindenden Protein (LBP) geblockt. Die Steigerung der Zytokinproduktion (TNFα) bleibt aus und ein Endotoxinschock wird vermieden [91, 114]. Cathelicidin-LL-37 kann sowohl gelöstes LPS als auch an CD14 gebundenes LPS an Makrophagen binden und neutralisieren. Darüber hinaus ist Cathelicidin-LL-37 möglicherweise als einziges antimikrobielles Peptid in der Lage, LPS aus seiner Bindung an CD14 zu verdrängen. Auch LPS-Aggregate können durch Cathelicidin-LL-37 aufgelöst werden [129]. In Anwesenheit von LPS wird die durch LPS getriggerte TNFα-Sekretion sowie die Produktion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine durch Neutrophile inhibiert. Fehlt LPS, fördert Cathelicidin-LL-37 die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen [11]. Ähnliches gilt für die Beeinflussung der Stimulation durch die Lipoteichonsäure gram-positiver Bakterien bzw. durch Bestandteile von Mykobakterien [129, 134].

Cathelicidin-LL-37 unterdrückt die LPS-Antwort nur selektiv, die Bildung von Zytokinen, die für die Zellrekrutierung und Chemotaxis benötigt werden, wird nicht gehemmt [111].

Cathelicidin-LL-37 beeinflusst die Expression von Genen (z. B. Rezeptoren, Zelloberflächenantigene, Zytokine, Chemokine, Interleukine), deren Produkte sowohl anti- als auch pro-inflammatorische Funktionen erfüllen. Pro-inflammatorische Zytokine (IL-8) bzw. Zytokinrezeptoren (IL-8-Rezeptor-beta (IL-8RB), IFN- γ -Rezeptor) und chemotaktisch wirksame Mediatoren wie Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1), CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-4 (CXCR-4) und CC-Motiv-Chemokinrezeptor-2 (CCR-2) werden vermehrt gebildet; DNA-Reparaturproteine, Macrophage-Inflammatory-Protein-1 α (MIP1 α), Onkostatin M und IL-12 dagegen vermindert. Cathelicidin-LL-37 spielt daher nicht nur eine große Rolle bei der direkten Elimination von Bakterien sondern auch bei der Modulation der Immunantwort (z. B. Aktivierung von Neutrophilen) [11, 74, 134].

Außerdem werden durch Cathelicidin-LL-37 T-Lymphozyten, Mastzellen, Neutrophile und Monozyten chemotaktisch angezogen. Durch die Mobilisation von intrazellulärem Calcium (vermutlich über G-Proteine und Phospholipase C, Inositoltrisphosphat-Bildung) kann Cathelicidin-LL-37 die Degranulation von Mastzellen induzieren, wodurch Histamine freigesetzt werden [120–122]. Die Aktivierung von Neutrophilen, T-Lymphozyten und Monozyten geschieht vermutlich über den FPRL1-(Formyl peptide receptor-like-1)-Rezeptor [155]. Für andere Effekte werden andere Rezeptoren benötigt [112].

In einem Sepsis-Modell bei Ratten rief Cathelicidin-LL-37 die gleichen Effekte (verminderte TNF α - und NO-Sekretion) hervor wie Imipenem und Polymyxin B. Darüber hinaus konnte die Konzentration von Endotoxin im Plasma gesenkt werden [45].

Die prophylaktische oder therapeutische Gabe von Cathelicidin-LL-37 in einem weiteren Sepsismodell bei Ratten zeigte eine verbesserte Überlebensrate [145].

Bei gleichzeitiger Gabe eines synthetisch hergestellten Cathelicidin-LL-37 und LPS konnte eine hohe Dosis die Mortalität senken. Gleiches galt für die Gabe von niedrig dosiertem Cathelicidin-LL-37 2 h zeitverzögert nach LPS-Gabe, während hohe Dosen zu diesem Zeitpunkt einen toxischen Effekt ausübten und die Mortalität anhoben [61]. Die experimentelle Injektion von Cathelicidin-LL-37 führte zu niedrigeren Konzentrationen von Endotoxin, IL-6 und TNF α .

Die Gabe eines rekombinanten antimikrobiellen Peptides (rBPI21, recombinant bactericidal/permeability-increasing protein) bei Kindern mit Meningokokken-Sepsis zeigte positive Effekte auf die Mortalität und erniedrigte die Zahl der notwendigen Amputationen signifikant [96].

Eine Überexpression von Cathelicidin-LL-37 in Mäusen schützte die Tiere vor Infektionen und Entzündungen. Höhere Konzentrationen von Cathelicidin-LL-37 konnte bei

diesen Tieren in der bronchoalveolären Lavage und im Serum nachgewiesen werden. Der erhöhte Gehalt im Serum konnte die TNF α -Sekretion nach LPS-Gabe senken und die Mortalität der Mäuse um 15–25 % reduzieren [22].

In einem Xenograft-Modell für Mukoviszidose konnte durch die Überexpression von Cathelicidin-LL-37 die sonst stark beeinträchtigte Fähigkeit, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* abzutöten, wieder auf ein normales Niveau angehoben werden [20, 21].

Patienten mit niedrigem Cathelicidin-LL-37-Spiegel, die sich einer dauerhaften Hämodialyse unterziehen mussten, hatten verglichen mit Patienten mit höherem Ausgangsspiegel eine erhöhte 1-Jahres-Mortalitätsrate, hervorgerufen durch Infektionen [64].

1.3.3 Cathelicidin und Vitamin D

Die Interaktion von *Mycobacterium tuberculosis* mit dem TLR 2/1 führt zu einer vermehrten Expression des Genes Cyp27B1 (1- α -Hydroxylase katalysiert die Bildung von 1,25-Dihydroxycholecalciferol), zu einer vermehrten Expression des VDR und nach Stimulation mit 1,25-Dihydroxycholecalciferol zu einer vermehrten Bildung von Cathelicidin durch eine direkte Induktion des zugehörigen Genes (CAMP) [102]. Sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene wird die Produktion von Cathelicidin gesteigert. Als Folge davon wird *Mycobacterium tuberculosis* effektiver abgetötet. Ein 25-Hydroxycholecalciferol-Defizit (25-Hydroxycholecalciferol ist eine Vorstufe von 1,25-Dihydroxycholecalciferol) beeinträchtigt diesen Vorgang [103]. Die Promotorregion des Cathelicidin-Gens besitzt ein VDR-response-Element, daher ist der VDR für die antimikrobielle Aktivität des Cathelicidins unverzichtbar [101].

Daneben konnte aber auch ein nicht auf eine veränderte Genexpression beruhender Weg, über den Vitamin D₃ Mykobakterien abtöten kann, identifiziert werden. In Makrophagen sind die Phosphatidylinositol-3-Kinase und die Entstehung von Sauerstoffmetaboliten durch die Nikotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat-(NADPH)-abhängige Oxidase an der Eliminierung von Mykobakterien beteiligt [135].

Epithelzellen des Respirationstraktes zeigten parallel zur Umwandlung von 25-Hydroxycholecalciferol zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol eine vermehrte Cathelicidin- und CD14-Expression. Virale RNA war in der Lage, die Expression der 1- α -Hydroxylase zu erhöhen und gemeinsam mit Vitamin D die Bildung von Cathelicidin zu induzieren [71]. Auch in bronchialen Epithelzellen von Mukoviszidose-Patienten konnte gezeigt werden, dass 1,25-Dihydroxycholecalciferol die Cathelicidin-Expression steigert [156].

Keratinocyten reagierten nach Stimulation mit TGF β mit einer vermehrten Synthese von 1 α -Hydroxylase. Die Fähigkeit der Keratinocyten, mikrobielle Bestandteile über TLR2 zu erkennen und Cathelicidin zu bilden, wurde verstärkt. 1,25-Dihydroxycholecalciferol steigert wiederum die Synthese von TLR2 auf Keratinocyten [100, 133]. Verletzte oder infizierte Haut ist durch eine erhöhte Konzentration von Cathelicidin gekennzeichnet [53].

Monozyten bilden *ex vivo* unter Zugabe von 25-Hydroxycholecalciferol und nach TLR-Aktivierung vermehrt hCAP (Vorstufe des Cathelicidin-LL-37). Der Anstieg ist dabei proportional zum Serum-Vitamin-D-Spiegel. Die gleiche Beobachtung wurde auch unter dem Einwirken von LPS gemacht [5].

1.4 Alpha₁-Antitrypsin als Akute-Phase-Protein

Das zu der Serpin-Familie gehörige Alpha₁-Antitrypsin ist ein Glykoprotein von 52 kDa, das sich in allen Geweben und Körperflüssigkeiten finden lässt. Das zugehörige Gen (SERPINA1) liegt auf Chromosom 14;q31-32.3 [59]. Alpha₁-Antitrypsin wird in großen Mengen von Hepatozyten und Monozyten produziert und über die Leber an das Blut abgegeben. Im Serum liegt die Konzentration bei 150–350 mg/dl. Die Hauptfunktion des Alpha₁-Antitrypsins ist die Inhibition der Serinproteasen, insbesondere der neutrophilen Elastase (ausgeschüttet von neutrophilen Granulozyten) und damit der Schutz des Gewebes vor proteolytischer Zerstörung. Im gesunden Organismus herrscht ein Gleichgewicht zwischen der gewebszerstörenden neutrophilen Elastase und dem protektiven Alpha₁-Antitrypsin. Bei Alpha₁-Antitrypsin-Mangel kommt es zur Akkumulation von Alpha₁-Antitrypsin in der Leber und somit zur Leberzirrhose, da das veränderte Protein nicht freigesetzt werden kann. Durch den resultierenden Mangel kommt es dann zum Lungenemphysem [40, 59].

Da Alpha₁-Antitrypsin zu den Akute-Phase-Proteinen gehört, wird es bei Entzündungsreaktionen vermehrt gebildet [50]. Vor allem IL-6, IL-1 und TGF- β regen die Produktion der Akute-Phase-Proteine in der Leber an [41]. Nach bisherigen Erkenntnissen eignet es sich nur begrenzt zur (frühen) Diagnose einer Entzündungsreaktion/Sepsis [35, 141].

2 Fragestellung

Obwohl in den letzten Jahrzehnten Fortschritte in der Diagnostik und Therapie der Sepsis gemacht werden konnten, bleibt die Erkrankung mit einer hohen Morbidität und Mortalität behaftet.

Bei der Pathogenese der Sepsis spielen die angeborene Immunabwehr und das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischer Immunantwort eine große Rolle.

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung von Vitamin D als Modulator der Immunfunktion erkannt. Dagegen ist noch nicht geklärt, wie sich ein Vitamin-D-Mangel auf die Immunreaktion bei einer Sepsis auswirkt und ob dieser Mangel als Risikofaktor für das Auftreten und den Verlauf der Erkrankung zu bewerten ist.

Die Rolle der antimikrobiellen Cathelicidine bei einer Sepsis ist derzeit ebenfalls noch unzureichend erforscht.

Ziel der Arbeit ist es, folgende Fragen zu klären:

- 1) Weisen Sepsis-Patienten einen verminderten Vitamin-D-Spiegel auf?
- 2) Ist die Serumkonzentration antimikrobieller Peptide, wie Cathelicidin-LL-37, bei Patienten mit Sepsis erniedrigt?
- 3) Kommt es bei einer Sepsis zu einer veränderten Serumkonzentrationen des α_1 -Antitrypsins?
- 4) Korrelieren die potenziell gemessenen Veränderungen in den Vitamin-D-, Cathelicidin-LL-37-Spiegeln mit dem Gesundheitszustand der Patienten?

Mit dieser Analyse sollen mögliche Risikofaktoren für die Entwicklung bzw. für einen schweren Verlauf der Erkrankung identifiziert werden.

3 Methoden

3.1 Patienten

Zwischen Februar 2008 und März 2009 wurden 32 SIRS-Patienten, 16 Intensiv-Patienten (Intensiv-Kontrollen) und 16 gesunde Kontrollen in die von der Ethikkommission der Universität Marburg genehmigte Beobachtungsstudie eingeschlossen.

Die SIRS-Patienten wurden nach Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien innerhalb von 12 h nach Aufnahme auf den teilnehmenden Intensivstationen 1, 3, 4, 5 und 8 des Universitätsklinikums Marburg in die Studie aufgenommen.

Die Aufklärung der Patienten oder der gesetzlichen Betreuer erfolgte durch die an der Studie teilnehmenden Ärzte.

Die Kontrollpatienten wurden auf den Intensivstationen 4 und 5 (Intensiv-Kontrolle) und unter den Mitarbeitern des Klinikums (gesunde Kontrolle) rekrutiert.

3.2 Ein- und Ausschlusskriterien

3.2.1 Einschlusskriterien

Für die Aufnahme in die SIRS-Gruppe mussten die Patienten mindestens zwei der folgenden SIRS-Kriterien erfüllen:

- Körperkerntemperatur ≥ 38 °C oder ≤ 36 °C
- Herzfrequenz ≥ 90 Schläge/min
- Atemfrequenz ≥ 20 Atemzüge/min oder $\text{paCO}_2 \leq 32$ mmHg (Spontanatmung)
- Leukozyten $> 12000/\text{mm}^3$ oder $< 4000/\text{mm}^3$ oder > 10 % unreife (stabförmige) Formen

Bei den Kontrollpatienten durfte kein SIRS nach den oben genannten Kriterien vorliegen. Darüber hinaus musste der Wert des C-reaktiven Proteins (CRP) normwertig sein:

- CRP im Serum < 5 mg/dl

Für alle Teilnehmer musste eine schriftliche Einverständniserklärung des Patienten oder eines gesetzlichen Betreuers vorliegen.

3.2.2 Ausschlusskriterien

Als Ausschlusskriterium galt die entzogene Zustimmung.

3.3 Studienablauf

Die Blutabnahme erfolgte 12–24 h nach Aufnahme auf die Intensivstation. Es wurden jeweils vier Serum-Röhrchen à 9 ml und 2,5 ml Blut in einem PAXgene-Röhrchen (PAXgene Blood RNA Tube und Vacutainer, Luer-Adapter) entnommen. Gleichzeitig erfolgte bei den SIRS-Patienten und bei den Patienten der Intensiv-Kontrolle die Erhebung der klinischen Daten, des APACHE-II-(Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II)-Scores, des MOD-(Multiple Organ Dysfunction)-Scores und des SOFA-(Sequential organ failure assessment)-Scores. Daneben wurden verfügbare Daten über aktuelle Diagnosen, frühere Diagnosen, die aktuelle Therapie (z. B. Antibiotikagabe), Einsatz von Kortikosteroiden und Katecholaminen, Beatmung, Nierenersatzverfahren und Gabe von Blut-/Gerinnungsfaktoren sowie den möglichen Infektfokus dokumentiert.

Bei den SIRS-Patienten wurde die Blutentnahme und Datenerhebung an zwei weiteren Zeitpunkten nach 72 h und 7 d wiederholt.

Für die gesunden Kontrollen wurde ein modifizierter Erhebungsbogen verwendet, der Vorerkrankungen, aktuelle Medikationen, Größe und Gewicht erfragte.

Ein Serum-Röhrchen wurde an das Zentrallabor zur Bestimmung von Parathormon, 1,25-Dihydroxycholecalciferol und 25-Hydroxycholecalciferol gegeben. Das PAXgene-Röhrchen wurde für mindestens 2 h bei Raumtemperatur belassen und dann bei -22 °C eingefroren. Die drei weiteren Serumröhrchen wurden für 10 min bei 3200 x g zentrifugiert. Ein Röhrchen wurde für die Alpha₁-Antitrypsin-Bestimmung im Kühlschrank gelagert.

Aus den restlichen Röhrchen wurde der Überstand auf 4–5 Eppendorf-Cups aliquotiert und bei -22 °C für die spätere Cathelicidin-LL-37-Bestimmung eingefroren.

3.4 APACHE-II-Score, SOFA-Score und MOD-Score

Die verwendeten Intensiv-Scores messen die Schwere von Organdysfunktionen, unabhängig von der Ursache (z. B. schwere Eingriffe, Traumata, systemische Entzündungsantwort) [66, 107, 148].

Der APACHE-II-Score erfasst die Temperatur, den mittleren arteriellen Blutdruck, die Herzfrequenz, die Atemfrequenz, die Oxygenierung, den pH, die Na⁺-Konzentration, die K⁺-Konzentration, das Kreatinin, den Hämatokrit, die Leukozyten und den Glasgow-Coma-Scale. Je nach Altersgruppe werden 0 (< 44 Jahre), 2 (45–54 Jahre), 3 (55–64 Jahre), 5 (65–74 Jahre) oder 6 (> 75 Jahre) Punkte hinzu addiert. Des Weiteren wird der operative Status (nicht operiert, Notfall-Operation oder Wahleingriff) und der Im-

munstatus bzw. eine vorher bekannte Organinsuffizienz (Leber, kardiovaskuläres System, Atmung, Niere und Immunschwäche) mit erfasst. Theoretisch kann so eine maximale Punktzahl von 67 Punkten erreicht werden [88].

Der MOD-Score erfasst die p_aO_2/FiO_2 -Ratio, das Kreatinin, das Bilirubin, die Druck-adjustierte Herzfrequenz (Herzfrequenz \times Zentralvenendruck / mittleren arteriellen Druck), die Thrombozytenzahl und den Glasgow-Coma-Scale, um die Organdysfunktion zu charakterisieren. Es sind maximal 24 Punkte möglich [107].

Der SOFA-Score erfasst die gleichen Parameter, aber statt der Druck-adjustierten Herzfrequenz wird der mittlere arterielle Blutdruck und die Dosis der eingesetzten Katecholamine Dopamin, Adrenalin oder Noradrenalin berücksichtigt. Die maximal erreichbare Punktzahl beträgt ebenfalls 24 Punkte [148, 149].

3.5 Bestimmung des 1,25-Dihydroxycholecalciferols

Die Bestimmung des 1,25-Dihydroxycholecalciferols erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums Marburg. Verwendet wurde das Testkit der Firma Immundiagnostik AG, Bensheim.

Die quantitative Bestimmung erfolgt durch Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Der monoklonale Antikörper erkennt das 1,25-Dihydroxycholecalciferol.

Der angegebene Referenzbereich bei gesunden Erwachsenen zwischen 20 Jahren und 50 Jahren liegt bei 17 pg/ml bis 53 pg/ml. Die Nachweisgrenze wird mit 4,8 pg/ml angegeben. Der laborinterne Referenzbereich liegt bei 25 ng/l bis 80 ng/l.

3.6 Bestimmung des 25-Hydroxycholecalciferols

Die Bestimmung des 25-Hydroxycholecalciferols erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums Marburg. Sie wurde mit einem Chromsystem-Reagenzienkit der Firma Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, München durchgeführt. Der laborinterne Referenzbereich liegt zwischen 10 μ g/l bis 50 μ g/l.

Die gemessenen Werte wurden nach den Kategorien „suffizient“ ≥ 30 ng/ml, „insuffizient“ 21 ng/ml bis 29 ng/ml und „defizient“ ≤ 20 ng/ml [nach [77]] bewertet.

3.7 Bestimmung des Alpha₁-Antitrypsins

Die Bestimmung des Alpha₁-Antitrypsins im Serum erfolgt nephelometrisch im Alpha₁-Antitrypsin-Labor (Pneumologie Marburg). Bei der immunologischen Reaktion binden spezifische Antikörper an Alpha₁-Antitrypsin. Die durch unterschiedliche Konzentrationen von Antikörper-Antigen-Komplexen variierende Streuung des Lichts wird gemessen und kann so zur Konzentrationsbestimmung des Alpha₁-Antitrypsins genutzt werden.

Verwendet wurden das Behring Nephelometer II, N Antiserum gegen Human- α_1 -Antitrypsin der Firma Dade Behring Marburg GmbH und die entsprechenden Standard- und Kontrollproben sowie Puffer und Diluens.

Der Referenzbereich wird mit 0,9 g/l bis 2 g/l angegeben.

3.8 Quantitative Bestimmung der Expression der Cathelicidin-LL-37-mRNA

Für die Expressionsanalyse von Cathelicidin-LL-37 wurde aus den Proben in einem ersten Schritt RNA isoliert, aus der dann cDNA (complementary Desoxyribonucleic acid) synthetisiert wurde. Mithilfe der daran anschließenden RT-PCR (Real-time Polymerase chain reaction) erfolgte eine quantitative Bestimmung der Expression der Cathelicidin-LL-37-mRNA.

Isolierung der RNA

Zur Isolierung der RNA wurde das PAXgene Blood RNA Kit von QIAGEN PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon (CH) verwendet. Die RNA-Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Entsprechend der Versuchsanleitung wurden die Röhrchen zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und dann erneut mit 4 ml RNase-freies Wasser gemischt. Nach Zentrifugation und Entfernung des Überstandes erfolgte die Zugabe von 350 μ l Resuspendierungspuffer.

Anschließend wurden 300 μ l Bindungspuffer und 40 μ l Proteinase K dazugegeben und für 10 min bei 55°C im Schüttelinkubator inkubiert. Das Lysat wurde anschließend in die PAXgene Homogenisier-Spinsäule überführt und mit 350 μ l Waschpuffer gewaschen.

10 μ l DNase und 70 μ l DNA-Verdaupuffer wurden in einem separaten Reaktionsgefäß vorsichtig gemischt. 80 μ l dieses Ansatzes wurden dann auf die Membran der Spinsäule pipettiert und anschließend 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgten zwei weitere Waschschritte mit 500 µl Waschpuffer 2. Danach wurde 40 µl Elutionspuffer hinzugegeben und zweimal eluiert. Das Eluat wurde bei 65 °C inkubiert und danach sofort auf Eis gekühlt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

Synthese der cDNA

Zur cDNA-Synthese wurde das First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas verwendet.

1 µg RNA wurde auf 10 µl mit Aqua dest. aufgefüllt und mit 1 µl Oligo-dT-(Desoxythymidin)-Primer gemischt. Die Ansätze wurden zunächst 5 min bei 72 °C, danach 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 7 µl Mastermix, bestehend aus 4 µl 5x Reaktionspuffer, 2 µl dNTP (Desoxyribonukleotidtriphosphate) und 1 µl RNase-Inhibitor, zu jeder Probe hinzugefügt und 5 min bei 37 °C inkubiert.

Danach wurde 2 µl des Enzyms reverse Transkriptase hinzugegeben, wobei die Temperatur nicht unter 20 °C sinken sollte. Es folgten 60 min Inkubation bei 37 °C und 10 min bei 72 °C. Anschließend wurden die Proben mit 180 µl Aqua dest. aufgefüllt und bei -80 °C für die weitere Verarbeitung eingefroren.

Die Negativkontrolle wurde mit 200 µl Aqua dest. anstelle der verdünnten Probenlösung durchgeführt.

RT-PCR für Cathelicidin-LL-37

Die RT-PCR wurde mit dem iCycler der Firma BIORAD durchgeführt. Als endogene Kontrolle wurde 18s ribosomale RNA verwendet.

Für die Ansätze wurde zunächst ein Mix hergestellt:

- 12,5 µl SYBRGreen,
- 0,5 µl Cathelicidin-LL-37 bzw. 18s Primer forward
- 0,5 µl Cathelicidin-LL-37 bzw. 18s Primer backward
- 6,5 µl Aqua dest.

20 µl Mix und 5 µl cDNA wurden gemischt und in den iCycler eingesetzt.

Folgende Cathelicin LL-37-Primer wurden verwendet:

- Forward Primer: 5' AGGCCACGATGGATGGGGA 3'
- Backward Primer: 5' CCTGGGTACAAGATTCCGCAAAAA 3'

RT-PCR-Protokoll

- 15 min bei 95 °C,
- 40 Zyklen mit: 40 Sekunden bei 95 °C,
 50 Sekunden bei 59 °C
 40 Sekunden bei 72 °C,
- 6 min bei 72 °C,
- 1 min bei 95 °C,
- 1 min bei 55 °C,
- Schmelzkurve ab 55 °C in 0,5 °C Schritten,
- danach wird die Temperatur bei 10 °C gehalten.

Es wurden jeweils doppelte Bestimmungen von Cathelicidin-LL-37, der Negativkontrolle und vom Housekeeping-Gene 18s RNA durchgeführt.

Die Auswertung und relative Quantifizierung erfolgte mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.

$$\Delta\text{Ct}_{\text{Probe}} = \text{Ct}_{\text{Probe}} - \text{Ct}_{\text{endogene Kontrolle}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Probe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kalibratorprobe}} \quad \text{mit } \Delta\text{Ct}_{\text{Kalibratorprobe}} = 0$$

(Ct = cycle threshold, PCR-Zyklus bei dem das Signal signifikant das Hintergrundsignal übersteigt)

$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ gibt dabei die Expression der mRNA in relativen Einheiten an.

3.9 Cathelicidin-LL-37-ELISA

Die Cathelicidin-LL-37-Protein-Konzentration der Proben wurde mittels ELISA bestimmt. Dazu wurde ein selbst entwickeltes Assay wie in [132] beschrieben mit Antikörpern der Firma Hycult und GE Healthcare durchgeführt.

3.10 Statistische Auswertung

Die Berechnung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte in absoluten Zahlen, Prozentangaben, Mittelwert \pm Standardabweichung. Beim Vergleich mehrerer Gruppen wurde der ANOVA-(Analysis of variance)-Test (Kruskal-Wallis Test für parameterfreie oder nicht-parametrische Verteilung) verwendet. Als Post-Test wurde der Dunn's Multiple Comparison Test benutzt. Bei normalverteilten Ergebnissen wurde die Bonferroni-Korrektur verwendet. Binäre Variablen wurden mit Hilfe des Chi-Testes untersucht.

Beim Vergleich von lediglich zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt.

Bei der Untersuchung von Zusammenhängen wurde der Spearman-Korrelationsfaktor benutzt.

Ein Ergebnis von $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

Die Einteilung der 25-Hydroxycholecalciferol und Cathelidin LL-37-Werte in vier Gruppen wurde durch die Bildung von Quartilen der gemessenen Werte vorgenommen.

Zur Berechnung und Darstellung wurde das Programm GraphPad Prism 5.0 (2007) von GraphPad Software Inc. sowie Microsoft Excel 2003 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Patienten

4.1.1 Patientencharakteristika

Es wurden 32 SIRS-Patienten, 16 Intensiv-Kontrollen und 16 gesunde Probanden eingeschlossen (Tabelle 1). Das Alter aller Patienten und Probanden lag im Mittel bei 61 Jahren \pm 14 Jahre. Der Altersunterschied zwischen SIRS-Patienten und der Intensiv-Kontrolle war nicht signifikant. Dagegen unterschieden sich die beiden Kontrollgruppen untereinander und auch die SIRS-Patienten und gesunde Kontrollen hinsichtlich des Alters signifikant.

Der Anteil der weiblichen Patienten lag in der SIRS-Gruppe bei 34,4 %, in der Gruppe der Intensiv-Kontrolle bei 37,5 % und in der gesunden Kontrolle bei 62,5 %. Die Geschlechtsverteilung in den drei Gruppen war nicht signifikant verschieden.

Der BMI konnte nur bei 14 SIRS-Patienten, 13 Patienten der Intensiv-Kontrolle und bei 15 Patienten der gesunden Kontrolle erhoben werden. Die Unterschiede zwischen den drei Gruppen waren dabei nicht signifikant.

Tabelle 1: Patientencharakteristik (Kruskal-Wallis-Test, Chi-Test bei binären Variablen)
MW \pm SD, n. s. = nicht signifikant

	SIRS-Patienten <i>n</i> = 32	Intensiv-Kontrolle <i>n</i> = 16	gesunde Kontrolle <i>n</i> = 16	p-Wert SIRS vs. Kontrolle Intensiv- station	p-Wert SIRS vs. gesunde Kontrolle	p-Wert Intensiv- Kontrolle vs. ge- sunde Kontrolle
Alter (Jahre)	64 \pm 14	66 \pm 12	51 \pm 12	n. s.	<i>p</i> < 0,05	
Geschlecht						
Weiblich	11 (34,4 %)	6 (37,5 %)	10 (62,5 %)	n. s.	n. s.	n. s.
Männlich	21 (65,5 %)	10 (62,5 %)	6 (37,5 %)	n. s.	n. s.	n. s.
BMI	27 \pm 6 (<i>n</i> = 14)	27 \pm 4 (<i>n</i> = 13)	24 \pm 3 (<i>n</i> = 15)	n. s.	n. s.	n. s.

Bei den SIRS-Patienten war der häufigste Infektfokus das Abdomen, gefolgt von den Weichteilen und Atemwegen.

Wie in Tabelle 2 ersichtlich, traten bei den SIRS-Patienten und in der Intensiv-Kontrolle ähnliche Komorbiditäten auf. Es dominierten die arterielle Hypertonie, der Diabetes mellitus und die koronare Herzerkrankung (KHK). Bei den SIRS-Patienten wurde häufig auch eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) diagnostiziert. Bei der Intensiv-Kontrolle gab es keine Patienten mit Immunsuppression.

Tabelle 2: Patientencharakteristik (Mehrfachnennungen bei Komorbiditäten und Therapie)

	SIRS-Patienten n = 32	Intensiv-Kontrolle n = 16	gesunde Kontrolle n = 16
klinischer Fokus			
Atemwege	5	-	-
Abdomen	10	-	-
Weichteile	8	-	-
Urogenitaltrakt	4	-	-
sonstige (Katheter)	4	-	-
Unklar	1	-	-
Komorbiditäten			
arterielle Hypertonie	12	10	1
Diabetes mellitus	6	4	-
Koronare Herzerkrankung (KHK)	8	12	-
Herzinsuffizienz	3	1	-
Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)	7	2	-
Chron. Niereninsuffizienz	3	3	-
Neoplasma	3	3	-
Immunsuppression	4	-	-
Therapie an mind. einem der drei Zeitpunkte			
Beatmung	31	1	-
Katecholamine	29	1	-
Nierenersatzverfahren	13	-	-
Kortikosteroide	15	-	-

31 Patienten der SIRS-Gruppe benötigten an mindestens einem Erhebungszeitpunkt während des Beobachtungszeitraumes (7 d) eine invasive oder nicht-invasive Beatmung. Alle Patienten erhielten Antibiotika und 29 waren an mindestens einem Zeitpunkt Katecholamin-pflichtig. Nierenersatzverfahren wurden in 13, Kortikosteroide in 15 Fällen eingesetzt.

4.1.2 Labordaten und Intensivscores

Die Labordaten zum Zeitpunkt der Aufnahme der Patienten in die Studie sind in Tabelle 3 dargestellt.

Die Zahl der Leukozyten war bei den SIRS-Patienten und den Patienten der Intensiv-Kontrolle sowie zwischen den beiden Kontrollgruppen nicht signifikant verschieden. Dagegen unterschieden sich die SIRS-Patienten hinsichtlich der Leukozytenzahl signifikant von den Probanden der gesunden Kontrolle. Die Thrombozytenzahl zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen.

Signifikant verschieden waren auch die CRP-Werte der SIRS-Patienten und der beiden Kontrollgruppen. Die beiden Kontrollgruppen dagegen unterschieden sich nicht. In die Intensiv-Kontrolle wurden vier Patienten mit einem CRP > 5 mg/l eingeschlossen. Der CRP-Spiegel war durch eine Reanimation oder nach einer Intervention (z.B. perkutane transluminale Koronarangioplastie (PCTA)) angestiegen. Bei diesen Patienten konnte aber ein SIRS bzw. eine Infektion nach klinischen Kriterien sicher ausgeschlossen werden. Procalcitonin als Sepsis-Marker wurde nur bei den SIRS-Patienten erhoben.

Kreatinin und Bilirubin wurden nur bei den SIRS-Patienten und bei den Patienten der Intensiv-Kontrolle gemessen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte nicht detektiert werden.

Die Parathormon-Werte unterschieden sich signifikant zwischen den SIRS-Patienten einerseits und der Intensiv-Kontrolle bzw. gesunden Kontrolle andererseits.

Die Intensiv-Scores konnten nicht bei allen Patienten zu allen drei Zeitpunkten erhoben werden, da z.B. Patienten innerhalb der 7 d verstarben.

Der APACHE-II-Score lag in der Gruppe der SIRS-Patienten bei 27 ± 8 (MW \pm SD, Min 2, Max 42). Bei den Patienten der Intensiv-Kontrolle betrug er 8 ± 5 (MW \pm SD, Min 2, Max 18). Bei den Probanden der gesunden Kontrolle wurde der APACHE-II-Score nicht erhoben.

Bei der zweiten Messung nach 72 h war der APACHE-II-Score bei den SIRS-Patienten verglichen mit dem Ausgangswert geringfügig niedriger (22 ± 7 Punkte MW \pm SD) und bei der dritten Messung nach 7 d wieder geringfügig höher (24 ± 7 Punkte MW \pm SD).

Der MOD-Score betrug zum Untersuchungsbeginn bei den SIRS-Patienten 10 ± 4 Punkte (MW \pm SD) und schwankte im Verlauf kaum.

Der SOFA-Score lag am Tag der Aufnahme bei 13 ± 4 Punkten (MW \pm SD) und fiel bei der zweiten und dritten Messung leicht ab.

Die Unterschiede zwischen den SIRS-Patienten und den Patienten der Intensiv-Kontrolle war bei allen untersuchten Scores signifikant.

Tabelle 3: Laborchemische Daten und Intensivscores (Kruskal-Wallis-Test, Dunn's Multiple Comparison Test, Mann-Whitney-U-Test für Intensivscores)

MW \pm SD, n. s. = nicht signifikant, ZP 1 = Tag der Aufnahme, ZP 2 = nach 72 h, ZP 3 = nach 7 d

Laborchemische Daten zum Einschusszeitpunkt	SIRS-Patienten n = 32	Intensiv-Kontrolle n = 16	gesunde Kontrollen = 16	p-Wert SIRS vs Intensiv-Kontrolle	p-Wert SIRS vs. gesunde Kontrolle	p-Wert Intensiv-Kontrolle vs. gesunde Kontrolle
Leukozyten (G/l)	19,26 \pm 12,85	9,276 \pm 3,063	6,238 \pm 1,97	n. s.	p < 0,05	n. s.
Thrombozyten (G/l)	199,4 \pm 148,2	214,3 \pm 59,56	236,1 \pm 62	n. s.	n. s.	n. s.
CRP (mg/l)	243,7 \pm 133,5	6,219 \pm 6,753	2,906 \pm 1,625	p < 0,05	p < 0,05	n. s.
Procalcitonin (µg/l)	37,32 \pm 67,5	-	-	-	-	-
Kreatinin (mg/dl)	2,7 \pm 1,7	1,15 \pm 0,39	-	p = 0,0006	-	-
Bilirubin (mg/dl)	1,7 \pm 1,1	0,85 \pm 0,33	-	p = 0,0279	-	-
Parathormon (ng/l)	152,3 \pm 191,6	50,19 \pm 41,39	42,13 \pm 17,73	p < 0,05	p < 0,05	n. s.
Intensivscores						
APACHE II ZP 1 (n = 32)	27 \pm 8	8 \pm 5	-	p < 0,0001	-	-
APACHE II ZP 2 (n = 26)	22 \pm 7	-	-	-	-	-
APACHE II ZP 3 (n = 21)	24 \pm 7	-	-	-	-	-
MOD ZP 1 (n = 32)	10 \pm 4	1 \pm 1	-	p < 0,0001	-	-
MOD ZP 2 (n = 26)	9 \pm 4	-	-	-	-	-
MOD ZP 3 (n = 21)	9 \pm 4	-	-	-	-	-
SOFA ZP 1 (n = 32)	13 \pm 4	1 \pm 2	-	p < 0,0001	-	-
SOFA ZP 2 (n = 26)	11 \pm 4	-	-	-	-	-
SOFA ZP 3 (n = 21)	11 \pm 5	-	-	-	-	-

4.2 Patienten auf Intensivstationen sind Vitamin-D₃ defizient

Die Messung der 25-Hydroxycholecalciferol-Werte eignet sich, um den Versorgungszustand mit Vitamin D längerfristig zu beurteilen.

Es wurden 18 SIRS-Patienten in den Monaten November bis April und 14 SIRS-Patienten in den Monaten Mai bis Oktober eingeschlossen. Die Anzahl der Patienten der Intensiv-Kontrolle betrug in den Monaten November bis April sechs und in den Monaten Mai bis Oktober zehn. Die Probanden der gesunden Kontrollen wurden ausschließlich im Zeitraum von November bis März untersucht. Sowohl bei den SIRS-Patienten als auch bei den Patienten der Intensiv-Kontrolle gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den 25-Hydroxycholecalciferol-Werten im Sommer- oder Winterhalbjahr (Abbildung 2 und 3).

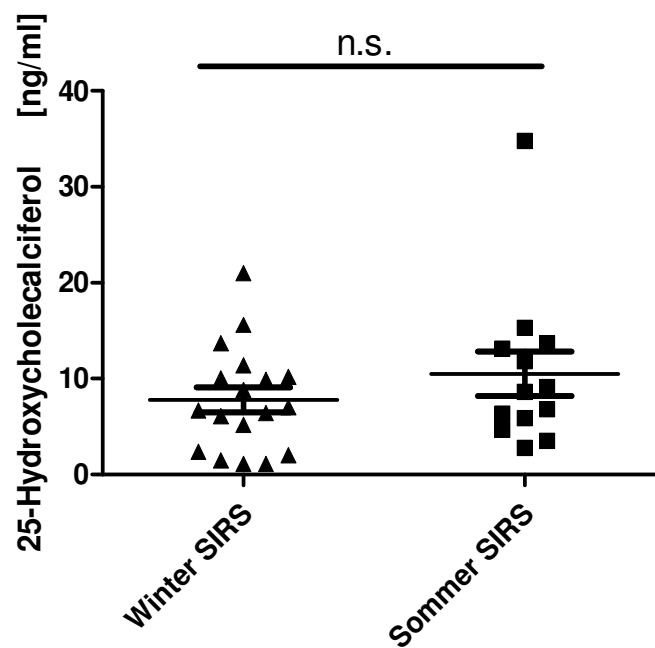


Abbildung 2: 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel bei SIRS-Patienten im Winter- (November bis April, $n = 18$) und Sommerhalbjahr (Mai bis Oktober, $n = 14$)
 $p = 0,4232$, n. s. = nicht signifikant, Streudiagramm, horizontale Linien MW \pm SD

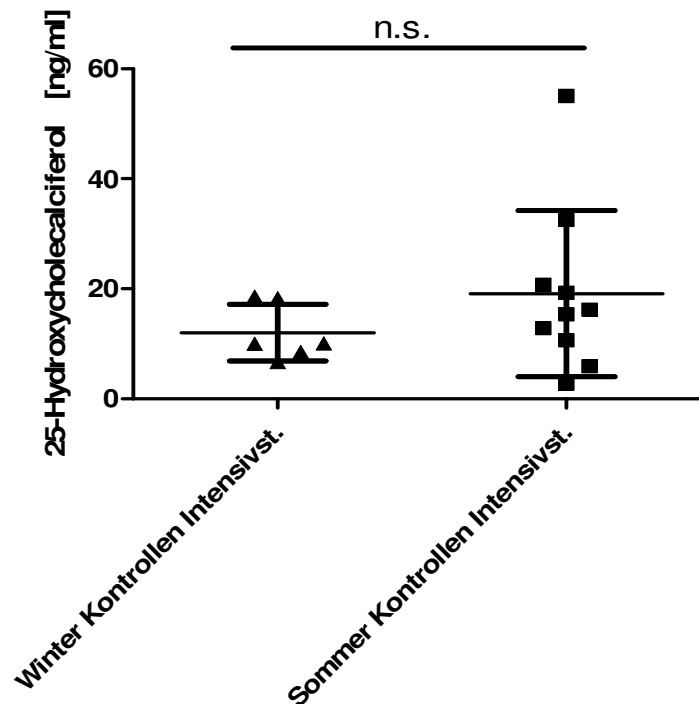


Abbildung 3: 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel bei Patienten der Intensiv-Kontrolle im Winter- (November bis April, $n = 6$) und Sommerhalbjahr (Mai bis Oktober, $n = 10$)
 $p = 0,3132$, n. s. = nicht signifikant, Streudiagramm, horizontale Linien MW \pm SD

90,6 % der SIRS-Patienten waren Vitamin-D₃-defizient. Auch 87,5 % der Patienten der Intensiv-Kontrolle hatten ein ausgeprägtes Vitamin-D₃-Defizit. Bei den gesunden Kontrollen hatten 71,4 % einen defizienten oder insuffizienten Vitamin-D₃-Spiegel und nur 28,6 % waren suffizient mit Vitamin D₃ versorgt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Anzahl (Anteil) von Vitamin-D-suffizienten, -insuffizienten und -defizienten Patienten in den Untersuchungsgruppen

	25-Hydroxycholecalciferol-Konzentration		
	≤ 20 ng/ml	21-29 ng/ml	≥ 30 ng/ml
SIRS-Patienten ($n = 32$)	29 (90,6 %)	1 (3,1 %)	2 (6,3 %)
Intensiv-Kontrolle ($n = 16$)	14 (87,5 %)		2 (12,5 %)
gesunde Kontrolle ($n = 14$)	5 (35,7 %)	5 (35,7 %)	4 (28,6 %)

4.3 SIRS-Patienten haben signifikant niedrigere Vitamin-D₃-Spiegel als Kontrollpatienten von Intensivstation

Die folgende Tabelle 5 gibt einen Überblick über die gemessenen Vitamin-D₃ Werte zum Zeitpunkt der Aufnahme.

Tabelle 5: 1,25-Dihydroxycholecalciferol- und 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle bzw. gesunden Kontrolle zum Zeitpunkt der Aufnahme
Angaben in MW ± SD

	SIRS-Patienten (n = 32)	Intensiv-Kontrolle (n = 16)	gesunde Kontrolle (n = 16)	p-Wert (ANOVA)
1,25-Dihydroxycholecalciferol [ng/l]	18,34 ± 21,18	31,13 ± 18,69	40,52 ± 15,43	$p < 0,0001$
25-Hydroxycholecalciferol [ng/ml]	8,921 ± 6,812	16,46 ± 12,58	24,04 ± 12,07	$p < 0,0001$

Bei drei SIRS-Patienten und einem Patienten der Intensiv-Kontrolle lagen keine validen 1,25-Dihydroxycholecalciferol-Werte zum Zeitpunkt der Aufnahme vor.

Während SIRS-Patienten im einen 1,25-Dihydroxycholecalciferol-Spiegel von 18,34 ± 21,18 ng/l (MW ± SD) zeigten, lag der Spiegel der Patienten der Intensiv-Kontrolle bei 31,13 ± 18,69 ng/l. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen war signifikant (Abbildung 4; $p < 0,05$). Ebenso unterschieden sich die SIRS-Patienten von den Probanden der gesunden Kontrolle (40,52 ± 15,43 ng/l) signifikant (Abbildung 4; $p < 0,001$). Dagegen bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen.

Tabelle 6: 1,25-Dihydroxycholecalciferol-Spiegel der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle bzw. gesunden Kontrolle zum Zeitpunkt der Aufnahme
Angegeben sind Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung

1,25-Dihydroxycholecalciferol [ng/l]	SIRS-Patienten	Intensiv-Kontrolle	gesunde Kontrolle
Minimum	4,8	6,2	16,9
Maximum	99,3	65,9	84
Mittelwert und Standardabweichung	18,34 ± 21,18	31,13 ± 18,69	40,52 ± 15,43

Abbildung 4 stellt die Verteilung der 1,25-Dihydroxycholecalciferol-Spiegel in den Untersuchungsgruppen zum Zeitpunkt der Aufnahme noch einmal graphisch dar.

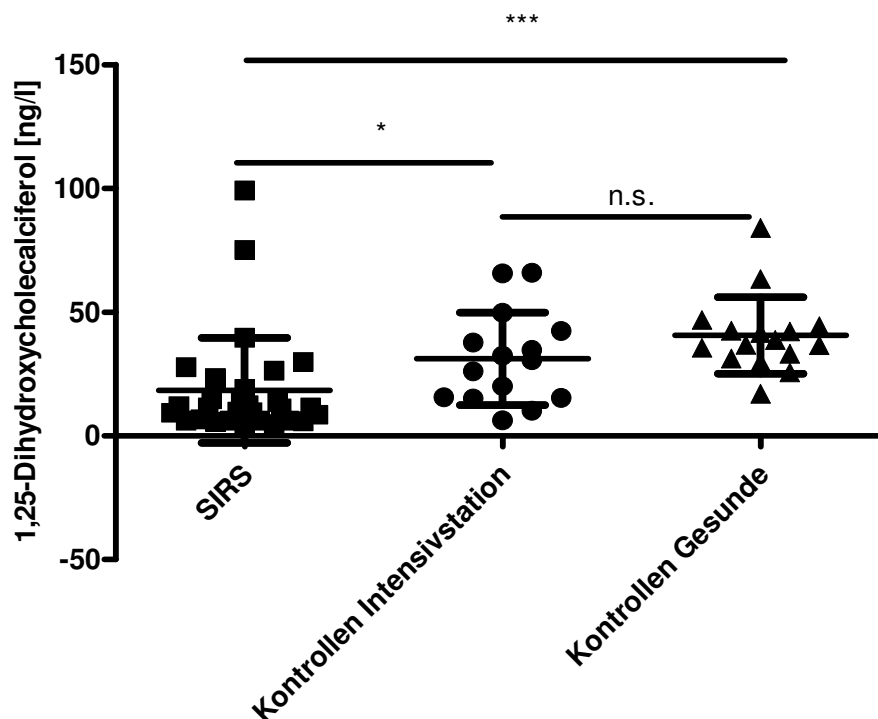


Abbildung 4: 1,25-Dihydroxycholecalciferol-Spiegel zum Zeitpunkt der Aufnahme bei SIRS-Patienten, Patienten der Intensiv-Kontrolle und der gesunden Kontrolle

* = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$. n. s. = nicht signifikant, Streudiagramm, horizontale Linien MW \pm SD

Bei der zweiten Messung (nach 72 h) konnte der 1,25-Dihydroxycholecalciferol-Spiegel nur bei 25 SIRS-Patienten (bedingt durch Sterbefälle und gestörte oder verunglückte Analysen) ermittelt werden. Bei der dritten Messung (7 d) standen die Daten von 23 Patienten zur Verfügung.

Der 1,25-Dihydroxycholecalciferol-Spiegel bei den SIRS-Patienten lag 72 h nach der Aufnahme bei $21,78 \pm 24,99$ ng/l und 7 d danach bei $16,94 \pm 14,91$ ng/l. Die Unterschiede zwischen den drei Messpunkten waren nicht signifikant.

Der 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel zum Zeitpunkt der Aufnahme lag für alle SIRS-Patienten ($n = 32$) und für alle Patienten der Intensiv-Kontrolle ($n = 16$) vor (Tabelle 6). Bei den SIRS-Patienten wurde ein Wert aus den Berechnungen herausgenommen, da er mehr als drei Standardabweichungen vom Mittelwert abwich ($60,4$ ng/ml). Bei den

Probanden der gesunden Kontrolle konnte in zwei Fällen aufgrund von Messstörungen kein Wert erhoben werden.

Der 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel lag bei den SIRS-Patienten bei $8,921 \pm 6,812$ ng/ml. Er unterschied sich damit signifikant von dem Spiegel der Patienten der Intensiv-Kontrolle ($16,46 \pm 12,58$ ng/ml; $p < 0,05$, Abbildung 5). Darüber hinaus bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den SIRS-Patienten und den Probanden der gesunden Kontrolle ($24,04 \pm 12,07$ ng/ml, $p < 0,001$, Abbildung 5). Die Werte der beiden Kontrollgruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Tabelle 7: 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle bzw. gesunden Kontrolle zum Zeitpunkt der Aufnahme

Angegeben sind Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung

25-Hydroxycholecalciferol [ng/ml]	SIRS-Patienten	Intensiv-Kontrolle	gesunde Kontrolle
Minimum	1,1	2,8	8,32
Maximum	34,8	55,1	49,9
Mittelwert und Standardabweichung	$8,921 \pm 6,812$	$16,46 \pm 12,58$	$24,04 \pm 12,07$

Abbildung 5 stellt die Verteilung der 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel in den Untersuchungsgruppen zum Zeitpunkt der Aufnahme noch einmal graphisch dar.

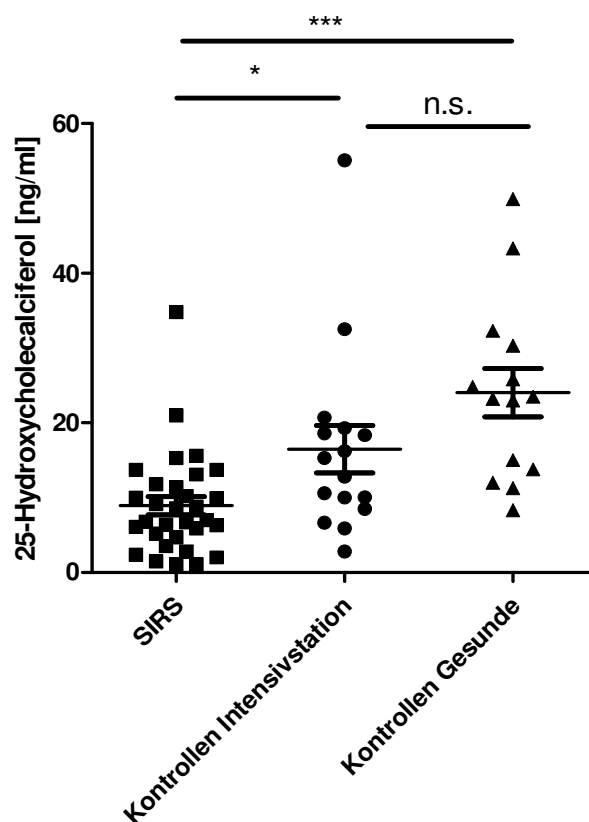


Abbildung 5: 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel zum Zeitpunkt der Aufnahme bei SIRS-Patienten, Patienten der Intensiv-Kontrolle und der gesunden Kontrolle
 * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$. n. s. = nicht signifikant, Streudiagramm, horizontale Linien MW \pm SD

Bei der zweiten Messung (nach 72 h) konnte nur bei 25 SIRS-Patienten der 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel ($9,061 \pm 5,977$ ng/ml) bestimmt werden. Bei der dritten Messung standen 24 SIRS-Patienten zur Verfügung ($11,11 \pm 7,71$ ng/ml). Die Unterschiede im Zeitverlauf waren nicht signifikant.

4.4 Das antimikrobielle Peptid Cathelicidin LL-37 ist bei SIRS-Patienten nicht signifikant erniedrigt

4.4.1 Relative Expression der Cathelicidin LL-37-mRNA

Die über RT-PCR bestimmte relative Expression der Cathelicidin LL-37-mRNA (siehe Kapitel 3.8) lag bei den SIRS-Patienten bei $109,1 \pm 38,26$ (MW \pm SD)). Das Minimum betrug 51,12 und das Maximum bei 222. Bei den Patienten der Intensiv-Kontrolle lagen die Werte durchschnittlich bei $107,3 \pm 39,89$ (Min 8,41, Max 167,7).

Die Probanden der gesunden Kontrolle zeigten eine Cathelicidin LL-37-mRNA-Expression von durchschnittlich $129,7 \pm 40,94$ (Min 81, Max 200,2). Auch wenn bei den Probanden der gesunden Kontrolle die relative Expression im Mittel leicht höher war, konnte zwischen den drei Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabelle 8 und Abbildung 6).

Tabelle 8: Übersicht über die Cathelicidin LL-37 mRNA Expression bei SIRS-Patienten, Patienten der Intensiv-Kontrolle und Probanden der gesunden Kontrolle.

n. s. = nicht signifikant

Angegeben sind Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung

LL-37-mRNA Relative Expression	SIRS	Intensiv-Kontrolle	gesunde Kontrolle
Minimum	51,12	8,41	81
Maximum	222	167,7	200,2
Mittelwert und Standardabweichung	$109,1 \pm 38,26$	$107,3 \pm 39,89$	$129,7 \pm 40,94$

Abbildung 6 stellt die relativen Cathelicidin LL-37-mRNA-Mengen in den Untersuchungsgruppen zum Zeitpunkt der Aufnahme noch einmal graphisch dar.

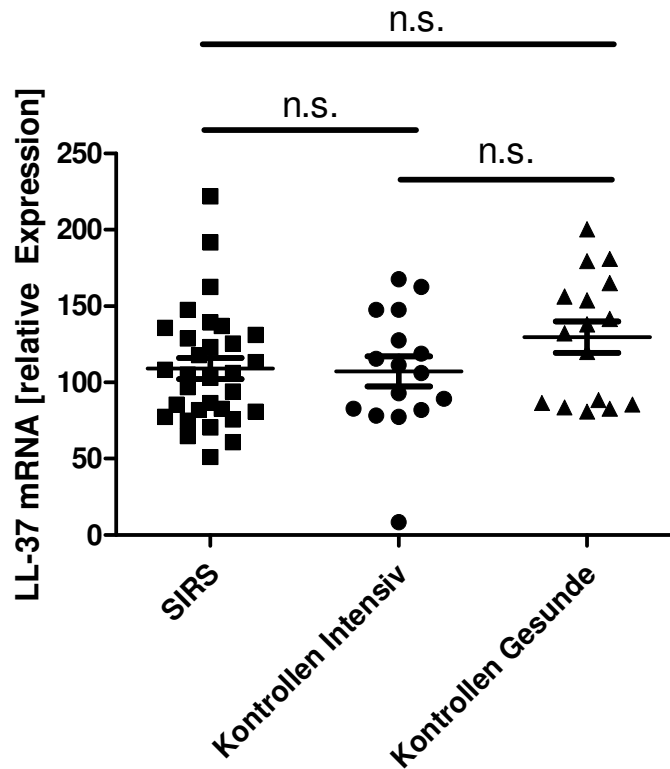


Abbildung 6: Relative Expression der Cathelicidin LL-37-mRNA zum Zeitpunkt der Aufnahme bei SIRS-Patienten, Patienten der Intensiv-Kontrolle und der gesunden Kontrolle

n. s. = nicht signifikant, Streudiagramm, horizontale Linien MW \pm SD

4.4.2 Cathelicidin LL-37-Serum-Spiegel

Die Cathelicidin LL-37-Serum-Spiegel konnten bei allen SIRS-Patienten, bei allen Patienten der Intensiv-Kontrolle sowie bei 13 Probanden der gesunden Kontrolle bestimmt werden.

Bei den SIRS-Patienten betrug der Wert durchschnittlich $12,39 \pm 9,775$ ng/ml (MW \pm SD, Min 4,437 ng/ml, Max 50,16 ng/ml).

Bei Patienten der Intensivkontrolle wurden durchschnittlich $5,504 \pm 1,427$ ng/ml (Min 3,861 ng/ml, Max 9,106 ng/ml) und bei Probanden der gesunden Kontrolle durchschnittlich $5,64 \pm 1,558$ ng/ml (Min 3,744 ng/ml, Max 8,989 ng/ml) gemessen (siehe Tabelle 9).

Der Unterschied zwischen den SIRS-Patienten einerseits und den Patienten der Intensivkontrolle ($p < 0,01$) sowie den Probanden der gesunden Kontrolle ($p < 0,001$) andererseits war statistisch signifikant (Abbildung 7). Die beiden Kontrollgruppen zeigten dagegen keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 9: Cathelicidin LL-37-Serumspiegel der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle bzw. gesunden Kontrolle zum Zeitpunkt der Aufnahme
Angabe sind Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung

Cathelicidin LL-37 im Serum [ng/ml]	SIRS-Patienten	Kontrollen von Intensiv-Kontrolle	gesunde Kontrolle
Minimum	4,437	3,861	3,744
Maximum	50,16	9,109	8,989
Mittelwert und Standardabweichung	12,39 ± 9,775	5,504 ± 1,427	5,64 ± 1,558

Abbildung 7 stellt die Cathelicidin LL-37-Serum-Spiegel in den Untersuchungsgruppen zum Zeitpunkt der Aufnahme noch einmal graphisch dar.

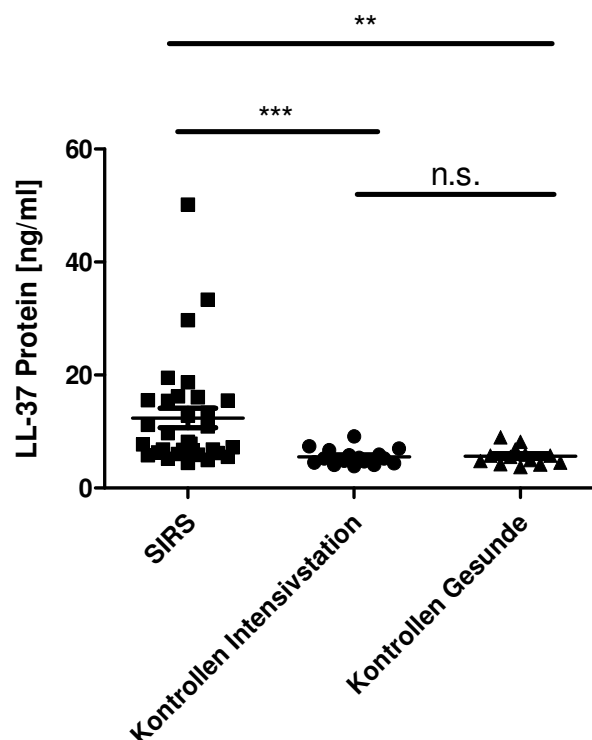


Abbildung 7: Cathelicidin-LL-37-Serum-Spiegel zum Zeitpunkt der Aufnahme bei SIRS-Patienten, bei Patienten der Intensiv-Kontrolle und bei Probanden der gesunden Kontrolle

** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, n. s. = nicht signifikant, Streudiagramm, horizontale Linien MW ± SD

Um die Frage zu klären, ob die Cathelicidin-LL-37-mRNA-Expression und die Cathelicidin-LL-37-Serum-Spiegel bei SIRS-Patienten korrelieren, wurde der Spearman-Test angewendet und eine Regressionsgerade durch die Punktwolke gelegt.

Abbildung 8 verdeutlicht, dass keine signifikante Korrelation vorliegt. Der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,1319$ (Konfidenzintervall (KI) $-0,3789$ bis $0,134$), $p = 0,3156$.

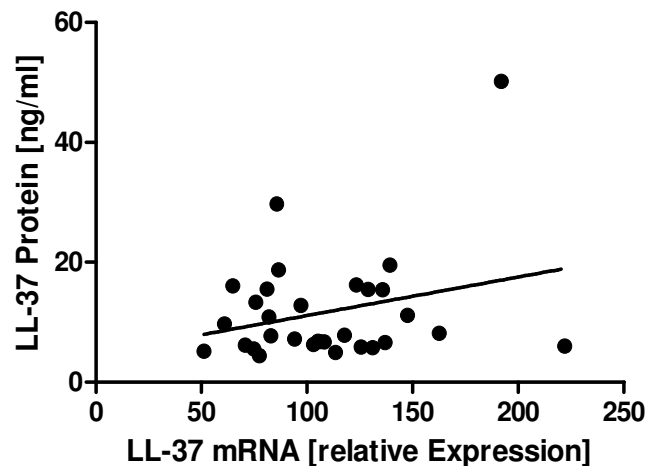


Abbildung 8: Korrelation zwischen der relativen Cathelicidin-LL-37-mRNA-Expression und dem Cathelicidin-LL-37-Serum-Spiegel bei SIRS-Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation.
Korrelationskoeffizient: $r = 0,1319$, $p = 0,3156$

4.5 Korrelation zwischen 25-Hydroxycholecalciferol und Cathelicidin-LL-37

Ein potenzieller Zusammenhang zwischen 25-Hydroxycholecalciferol-Serum-Spiegel einerseits und dem Cathelicidin-LL-37-Serum-Spiegel (Abbildung 9) bzw. der relativen Expression der Cathelicidin-LL-37-mRNA (Abbildung 10) andererseits bei den SIRS-Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation wurde mit Hilfe der Spearman-Korrelationsanalyse untersucht. Die Korrelationsanalyse der 25-Hydroxycholecalciferol- und Cathelicidin-LL-37-Serum-Spiegel ergab einen Spearman-Koeffizient von $r = -0,3856$ (KI $-0,5876$ bis $-0,1384$), $p = 0,0023$. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang in Form einer nicht als linear, sondern als monoton zu beschreibenden Funktion.

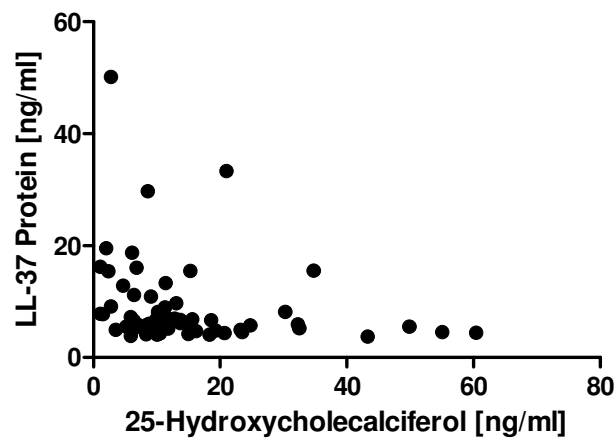


Abbildung 9: Korrelation von 25-Hydroxycholecalciferol [ng/ml] und Cathelicidin-LL-37-Serum-Spiegel [ng/ml] bei SIRS-Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation.

$r = -0,3856$, $p = 0,0023$

Dagegen konnte kein Zusammenhang zwischen der 25-Hydroxycholecalciferol-Serum-Konzentration und der Cathelicidin-LL-37-mRNA-Expression detektiert werden ($r = -0,02779$ (KI $-0,2827$ bis $0,2307$), $p = 0,8302$).

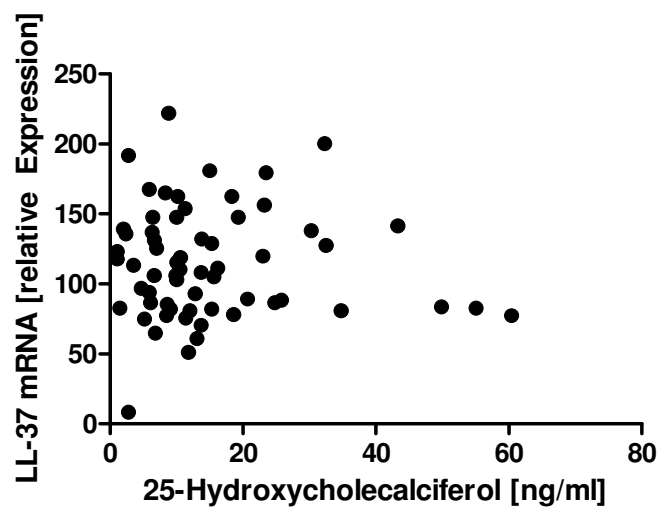


Abbildung 10: Korrelation von 25-Hydroxycholecalciferol [ng/ml] und relativer Expression der Cathelicidin-LL-37-mRNA

$r = -0,02779$, $p = 0,8302$

4.6 Alpha₁-Antitrypsin ist als Akute-Phase-Protein bei SIRS signifikant erhöht

Der Alpha₁-Antitrypsin-Spiegel konnte bei 30 der 32 SIRS-Patienten, bei allen Patienten der Intensiv-Kontrolle und bei allen Probanden der gesunden Kontrolle zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation bestimmt werden.

Die Alpha₁-Antitrypsin-Spiegel lagen bei den SIRS-Patienten durchschnittlich bei $234,1 \pm 91,7$ mg/l (MW \pm SD) bei den bei den Patienten der Intensiv-Kontrolle bei $116,3 \pm 32,52$ mg/l und bei den Probanden der gesunden Kontrolle bei $137,1 \pm 17,29$ mg/l (Tabelle 10). Patienten der SIRS-Gruppe hatten verglichen mit den beiden Kontrollgruppen signifikant höhere Alpha₁-Antitrypsin-Werte (Abbildung 11; Intensiv-Kontrolle: $p < 0,01$, gesunde Kontrolle: $p < 0,001$). Die beiden Kontrollgruppen unterschieden sich dagegen nicht signifikant.

Tabelle 10: Übersicht über die Alpha₁-Antitrypsin-Spiegel [mg/l] bei SIRS-Patienten, Patienten der Intensiv-Kontrolle und Probanden der gesunden Kontrolle, Angegeben sind Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung

Alpha ₁ -Antitrypsin [mg/l]	SIRS	Intensiv-Kontrolle	gesunde Kontrolle
Minimum	106	48,3	111
Maximum	412	155	169
Mittelwert und Standardabweichung	$234,1 \pm 91,7$	$116,3 \pm 32,52$	$137,1 \pm 17,29$

Abbildung 11 stellt die Alpha₁-Antitrypsin-Serum-Spiegel in den Untersuchungsgruppen zum Zeitpunkt der Aufnahme noch einmal graphisch dar.

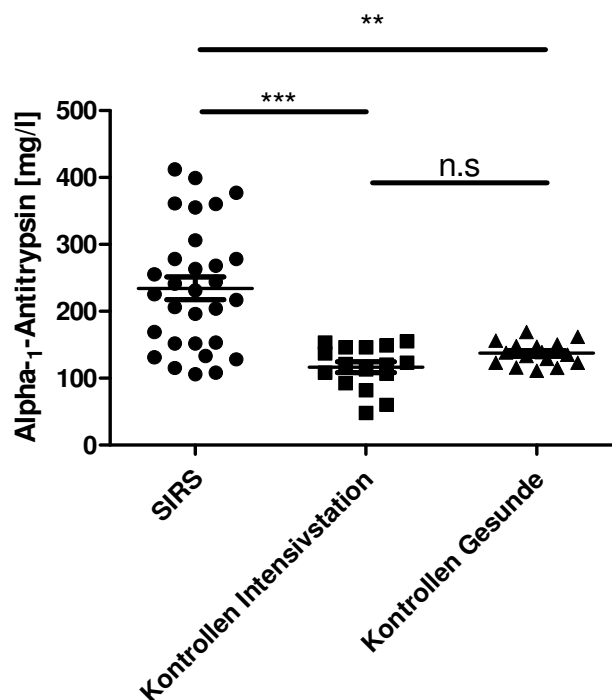


Abbildung 11: Alpha₁-Antitrypsin-Spiegel zum Zeitpunkt der Aufnahme bei SIRS-Patienten, bei Patienten der Intensiv-Kontrolle und bei Probanden der gesunden Kontrolle

** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, n. s. = nicht signifikant, Streudiagramm, horizontale Linien MW \pm SD

Im Verlauf der Beobachtung stieg der Alpha₁-Antitrypsin-Spiegel in der SIRS-Gruppe nach 72 h auf $260,3 \pm 85,68$ mg/l und fiel nach 7 d wieder auf $234,3 \pm 61,23$ mg/l ab. Diese Schwankungen waren nicht signifikant.

4.7 Zusammenhang zwischen 25-Hydroxycholecalciferol und APACHE-II-Score als Maß für die Schwere der Erkrankung

Die Patienten der Intensivstation (SIRS-Gruppe, Intensiv-Kontrolle) wurden anhand ihrer 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel zum Zeitpunkt der Aufnahme in vier Gruppen geteilt (siehe Kapitel 3.10). Anschließend wurde der APACHE-II-Score dieser vier Gruppen verglichen (Abbildung 12). Der Score war in der Gruppe mit den höchsten 25-Hydroxycholecalciferol-Werten mit durchschnittlich 16 ± 12 Punkte deutlich niedriger als in den übrigen Gruppen Gruppe 1: 25 ± 6 Punkte, Gruppe 2: 26 ± 10 Punkte, Gruppe 3: 22 ± 12 Punkte).

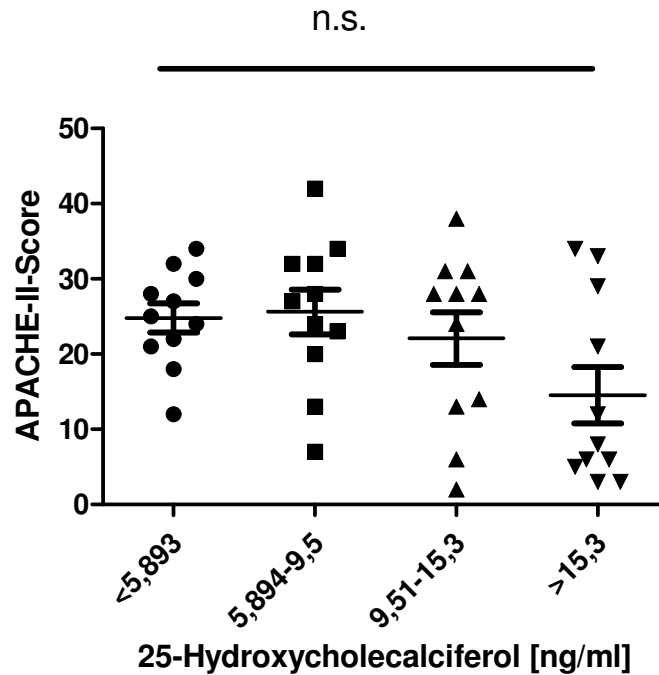


Abbildung 12: APACHE-II-Score der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle in Abhängigkeit von der 25-Hydroxycholecalciferol-Serum-Konzentration – Einteilung in vier Gruppen
 n. s. = nicht signifikant, Streudiagramm, horizontale Linien MW ± SD

Wenn die Einteilung nach Suffizienzklassen erfolgt, liegt der durchschnittliche APACHE-II-Score in der Klasse „defizient“ bei 22 ± 11 Punkten, in der Klasse „insuffizient“ bei 34 ± 0 Punkten und in der Klasse „suffizient“ bei 11 ± 9 Punkten. Der Unterschied zwischen diesen drei Klassen ist ebenfalls nicht signifikant (Abbildung 13).

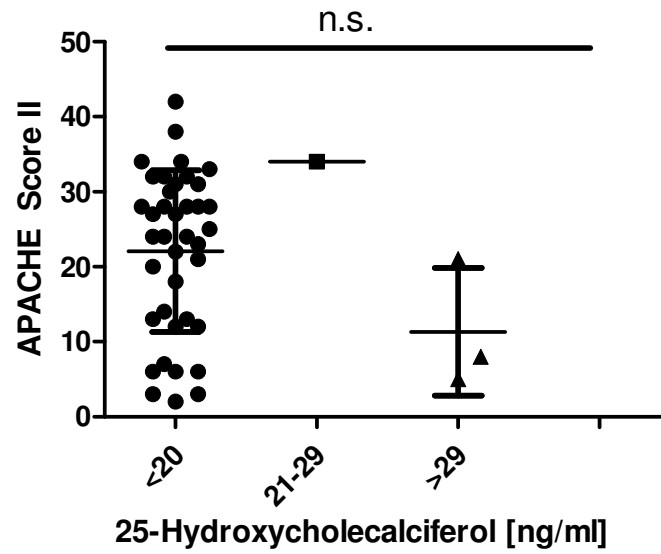


Abbildung 13: APACHE-II-Score der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle in Abhängigkeit von der 25-Hydroxycholecalciferol-Serum-Konzentration – Einteilung nach Suffizienzklassen („suffizient“ ≥ 30 ng/ml, „insuffizient“ 21–29 ng/ml und „defizient“ ≤ 20 ng/ml [nach [24]])
n. s.= nicht signifikant, Streudiagramm, horizontale Linien MW \pm SD

4.8 Zusammenhang zwischen Cathelicidin-LL-37 und APACHE-II-Score als Maß für die Schwere der Erkrankung

4.8.1 Cathelicidin-LL-37-mRNA

Die Patienten der SIRS-Gruppe und der Intensiv-Kontrolle wurden nach den gemessenen Cathelicidin-LL-37-mRNA-Werten in vier Gruppen eingeteilt. Die APACHE-II-Scores in den Gruppen unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 14, Gruppe 1: $19 \pm 9,92$, Gruppe 2: $21,36 \pm 12,44$, Gruppe 3: $23,10 \pm 12,41$, Gruppe 4: $22,64 \pm 9,49$).

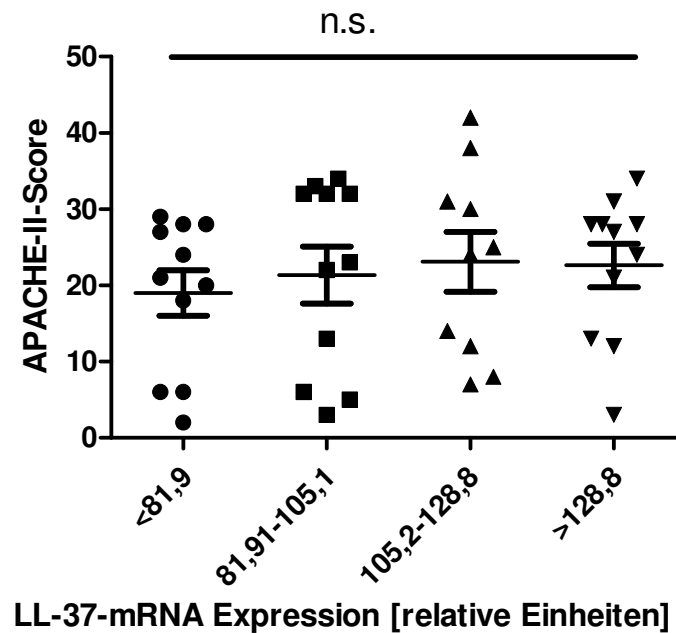


Abbildung 14: APACHE-II-Score der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle in Abhängigkeit von der Cathelicidin-LL-37-mRNA-Expression – Einteilung in vier Gruppen

n. s. = nicht signifikant, Streudiagramm, horizontale Linien MW ± SD

4.8.2 Cathelicidin-LL-37-Serum-Spiegel

Die Patienten der SIRS-Gruppe und der Intensiv-Kontrolle wurden nach den gemessenen Cathelicidin-LL-37-Serum-Spiegeln in vier Gruppen eingeteilt. Die APACHE-II-Scores in den Gruppen unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 15, Gruppe 1: $14,64 \pm 10,76$, , Gruppe 2: $25,73 \pm 12,32$, Gruppe 3: $23,27 \pm 8,15$, Gruppe 4: $22,55 \pm 9,125$). Auch zwischen diesen Gruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied beobachten.

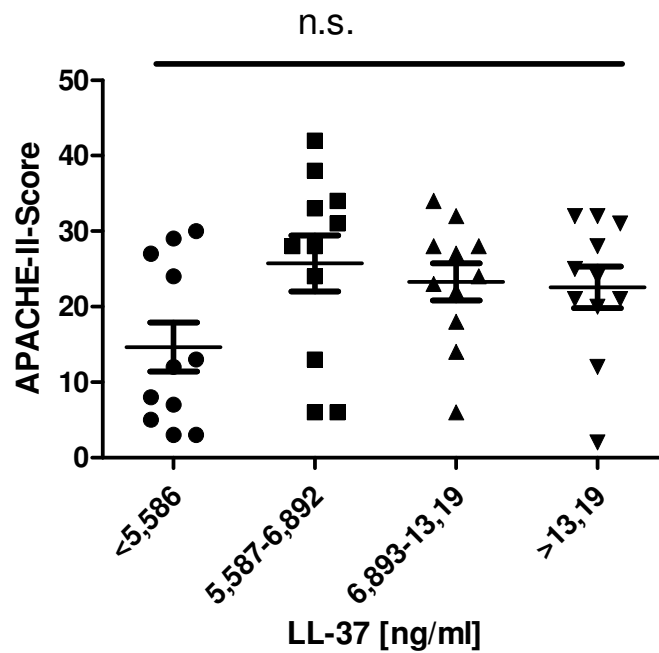


Abbildung 15: APACHE-II-Score der SIRS-Patienten und der Patienten der Intensiv-Kontrolle in Abhängigkeit vom Cathelicidin-LL-37-Serum-Spiegel – Einteilung in vier Gruppen

n. s. = nicht signifikant, Box-Plot Darstellung von MW und SD

5 Diskussion

5.1 Vitamin-D-Insuffizienz und SIRS

Ein Hauptbefund dieser Arbeit ist, dass eine Vitamin-D-Insuffizienz bei Patienten auf Intensivstationen weit verbreitet ist und kritisch kranke Patienten signifikant niedrigere Spiegel haben als gesunde Probanden und hospitalisierte Patienten.

90,6 % der SIRS-Patienten und 87,5 % der Kontroll-Patienten von Intensivstationen waren in der vorliegenden Studie Vitamin-D₃-defizient (25-Hydroxycholecalciferol < 20 ng/ml). Lee et al., die den Vitamin-D-Spiegel kritisch kranker Patienten maßen, kamen zu ähnlichen Ergebnissen. In ihrer Studie waren nur 7 % der Intensivpatienten mit einem suffizienten Vitamin-D-Spiegel versorgt [93].

Auch unter den gesunden Probanden (gesunde Kontrolle) war eine Vitamin-D-Insuffizienz und -Defizienz weit verbreitet. Nur 28,6 % der gesunden Probanden waren suffizient mit Vitamin-D versorgt. Der mittlere 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel der Gesunden lag mit 24,04 ng/ml deutlich unter dem Mittelwert des „3rd National Health and Nutrition Examination Survey“ (29 ng/ml) [63].

Die 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel waren im Winter- und Sommerhalbjahr bei den untersuchten SIRS-Patienten und bei den Intensivpatienten ohne SIRS nicht signifikant unterschiedlich. In beiden Halbjahren wurden ähnlich viele Patienten in die Studie eingeschlossen. Eine Beeinflussung der Messwerte durch die Jahreszeit ist also unwahrscheinlich. Bei der Bewertung der Ergebnisse sollte aber berücksichtigt werden, dass die Anzahl der Patienten in den Gruppen recht klein war. Gesunde Probanden wurden nur im Winterhalbjahr eingeschlossen. Daher lassen die vorliegenden Ergebnisse keine Schlüsse über einen eventuellen jahreszeitlich bedingten Vitamin-D-Spiegel-Unterschied bei der gesunden Bevölkerung zu. Möglicherweise wurden aber in der gesunden Kontrolle niedrigere Werte gemessen, als wenn auch im Sommer gesunde Probanden untersucht worden wären.

Im Serum der SIRS-Patienten wurde im Mittel $8,921 \pm 6,812$ ng/ml 25-Hydroxycholecalciferol gefunden, bei den Patienten der Intensiv-Kontrolle $16,46 \pm 12,58$ ng/ml und bei den gesunden Probanden $24,04 \pm 12,07$ ng/ml. Lee et al. maßen in ihrer Studienpopulation durchschnittlich 16 ± 9 ng/ml [93].

In der vorliegenden Analyse bestätigte sich die Annahme, dass SIRS-Patienten einen signifikant niedrigeren Vitamin-D-Spiegel aufweisen als Intensivpatienten ohne SIRS und gesunde Kontrollen. Diese Unterschiede waren sowohl für 1,25-Dihydroxycholecalciferol als auch für 25-Hydroxycholecalciferol festzustellen. In einer

Studie von Jeng et al. mit vergleichbarer Studienpopulation bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den SIRS-Patienten und Intensivpatienten ohne SIRS, sondern nur zwischen SIRS-Patienten und gesunden Probanden [83].

Eine hohe Zufuhr von Flüssigkeit in zeitlichem Zusammenhang mit der Messung von 25-Hydroxycholecalciferol kann zu einer Unterschätzung des Vitamin-D-Spiegels führen [90]. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 7 d gab es bei den verschiedenen Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den gemessenen Werten, sodass eine falsch niedrige Schätzung unwahrscheinlich ist. Da es zu keinem wesentlichen Verlust von 25-Hydroxycholecalciferol oder 1,25-Dihydroxycholecalciferol im Untersuchungszeitraum kam, ist davon auszugehen, dass das Defizit nicht in den wenigen Tagen des Krankenhausaufenthaltes erworben wurde. Der 1,25-Dihydroxycholecalciferol-Spiegel ist aufgrund des ständig stattfindenden Auf- und Abbaus beträchtlichen Schwankungen unterworfen. 25-Hydroxycholecalciferol hat dagegen eine Halbwertszeit von ein bis zwei Monaten und sollte sich daher innerhalb eines kurzen Zeitraumes nicht wesentlich verändern [147].

Diese Überlegungen sprechen insgesamt dafür, dass es wenig wahrscheinlich ist, dass die akute Erkrankung, eine veränderte Ernährung während der Erkrankung, das mangelnde Sonnenlicht während des Krankenhausaufenthaltes oder der Einfluss von Medikamenten zu einem deutlichen Abfall des Vitamin-D-Spiegels geführt haben. Im Rahmen der Studie wurde allerdings kein Vitamin-D-Bindendes Protein (VDB) gemessen. Bei einem VDB-Mangel kommt es zu einem Verlust von Vitamin D über die Niere und so zu einem verminderten Serumspiegel. Weiter kann VDB während einer akuten Erkrankung durch Bereitstellung von Vitamin D einem Vitamin-D-Mangel entgegen wirken [95, 157]. Jeng et al. beobachteten eine signifikant niedrigere VDB bei Sepsis-Patienten und vermuteten eine Assoziation mit dem Auftreten der Sepsis. Dieser mögliche Zusammenhang ist bislang nicht weiter untersucht worden.

Nguyen et. al. identifizierten den 1,25-Dihydroxycholecalciferol- und nicht den 25-Hydroxycholecalciferol-Spiegel erstmals als prognostischen Faktor für das Outcome von Sepsis-Patienten. Trotz der hohen Beeinflussung des Spiegels durch die Nierenfunktion und die periphere 1α -Hydroxylase maßen sie der aktiven Form des Vitamin D_3 eine höhere prognostische Wertigkeit zu [117].

Es ist davon auszugehen, dass chronisch kranke und ältere Menschen einen niedrigeren Vitamin-D-Spiegel (z. B. durch verminderte Sonneneinstrahlung, verminderte körperliche Aktivität) besitzen und dass diese Gruppe von Menschen häufiger von schweren Infektionen mit ungünstigem Ausgang betroffen ist. Daher sollte der Einfluss des Alters auf den prognostischen Wert von Vitamin D_3 für das Sepsis-Outcome analysiert

werden. Alvarez-Rodriguez et al. konnten zeigen, dass Alter und Vitamin-D-Spiegel negativ miteinander korrelieren [12]. Diese Befunde klären jedoch nicht den in der vorliegenden Studie detektierten Unterschied zwischen SIRS-Patienten und Intensivpatienten ohne SIRS, die hinsichtlich Alter, Komorbiditäten und BMI (ein höherer BMI ist mit niedrigem Vitamin-D-Spiegel assoziiert [31]) keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Ein Vitamin-D-Mangel ist insgesamt mit einer erhöhten Gesamtmortalität assoziiert [52, 109]. Epidemiologische Studien zeigen weiterhin einen Zusammenhang zwischen Vitamin-D-Mangel und dem Auftreten von Sepsis [69].

Das Vorhandensein von VDR auf vielen Zellen des Immunsystems deutet auf ein hohes immunmodulatorisches Potential von Vitamin D hin. Vitamin D ist bei Makrophagen und dendritischen Zellen in der Lage, die Differenzierung und Phagozytose zu fördern und das Expressionsprofil der Zytokine zu verändern [36]. Beispielsweise werden TLR2 und TLR4 unter dem Einfluss von Vitamin D vermindert exprimiert und die TNF α -Bildung reduziert [57]. Weiterhin ist die gesteigerte Cathelicidin-LL-37-Synthese nach Stimulation mit Vitamin D ein wichtiger Mechanismus zur Beeinflussung der angeborenen Immunantwort [65].

Aufgrund des niedrigen Vitamin-D-Spiegels können SIRS-Patienten die oben beschriebenen Mechanismen der angeborenen Immunantwort nicht suffizient nutzen.

Weiterführende Studien sollten die Kausalkette zwischen einem Vitamin-D-Mangel und einer veränderten Immunantwort klären, um geeignete Therapiemaßnahmen einleiten zu können.

5.2 Cathelicidin-LL-37 und SIRS

Cathelicidin-LL-37 hat für die angeborene Immunantwort eine große Bedeutung. Neben direkten antimikrobiellen Eigenschaften und der Möglichkeit zur Neutralisierung von LPS ist das Peptid auch in der Lage, die Zytokinausschüttung von Neutrophilen zu verändern [11]. Die Gabe von Cathelicidin-LL-37 in einem Sepsis-Modell konnte die Mortalität senken [145]. Die Stimulation mit 1,25-Dihydroxycholecalciferol führte *in vitro* zu einer vermehrten Bildung von Cathelicidin-LL-37 [102] und bei einer Vitamin-D-Defizienz kommt es zu einer verminderten antibakteriellen Aktivität gegenüber Mykobakterien [103].

Die Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit war, dass bei SIRS-Patienten nicht nur Vitamin D, sondern auch das Cathelicidin-LL-37 erniedrigt ist. Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden.

In der vorliegenden Studie lag die Cathelicidin-LL-37-Serumkonzentration bei den gesunden Probanden bei $5,64 \pm 1,558$ ng/ml. In der Literatur wird derzeit kein allgemeingültiger Normbereich genannt.

Sørensen et al. maßen bei der Etablierung eines ELISA im Plasma $1,18$ µg/ml (= 1180 ng/ml) Cathelicidin-LL-37 [137]. Gombart et al. 2007 detektierten im Mittel 619 ± 329 ng/ml Cathelicidin-LL-37 [64] und Bhan et al. 698 ng/ml [28]. Nur Alvarez-Rodriguez et al. und Havelka et al. erzielten bei gesunden Probanden mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie annähernd vergleichbare Werte (Min 10 ng/ml bzw. Max $38,45$ ng/ml) [12, 106].

Die großen Unterschiede sind messtechnisch zu begründen, da in den Studien unterschiedliche, nicht standardisierte Assays verwendet wurden. Insbesondere die Gewinnung, Aufbewahrung und Verarbeitung der Proben haben einen großen Einfluss auf die gemessenen Konzentrationen. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete ELISA wurde für Material aus Zellkulturen entwickelt. Daher ist es möglich, dass die Messergebnisse durch andere Serumbestandteile beeinflusst wurden. Die interne Vergleichbarkeit der drei Patientengruppen der vorliegenden Studie bleibt durch solche Überlegungen jedoch unbeeinflusst.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Jeng et al. ist Cathelicidin-LL-37 in der vorliegenden Untersuchung weder auf Proteinebene noch auf mRNA-Ebene bei SIRS-Patienten erniedrigt, sondern auf Proteinebene sogar signifikant erhöht. Die relative mRNA-Expression lag bei den SIRS-Patienten mit $109,1 \pm 38,26$ etwas niedriger als bei den gesunden Kontrollen mit $129,7 \pm 40,94$. Insgesamt konnte zwischen den Gruppen aber kein signifikanter Unterschied bemerkt werden.

Denkbar ist, dass die Cathelicidin-Konzentration während der akuten Entzündungsreaktion durch die Ausschüttung von Cathelicidin-LL-37 aus Neutrophilen erhöht ist und dieser Teil der Immunantwort bei SIRS-Patienten regelrecht funktioniert. Durch die gestörte Barrierefunktion der Schleimhäute könnten Mikroorganismen eintreten und so dort die Cathelicidin-Produktion stimulieren [53].

Analog zu der hier beobachteten Erhöhung des Cathelicidin-LL-37 wurden erhöhte Level antimikrobieller Peptide in Lavageflüssigkeit und im Blut von Pneumonie- und Sepsis-Patienten detektiert [27, 32, 78, 132, 144].

Die Expression der mRNA war bei Intensivpatienten (SIRS und Kontrollen) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen tendenziell, jedoch nicht signifikant erniedrigt.

Die Annahme, dass ein niedriger Vitamin-D-Spiegel zu einer geringen Cathelicidin-LL-37-Expression führt, traf nicht zu. Bei der Bewertung der Aussagekraft dieser Ergeb-

nisse sollte aber berücksichtigt werden, dass die vorliegenden Ergebnisse die Stabilität der Cathelicidin-LL-37-mRNA nicht berücksichtigen. Daher ist es nicht möglich zu unterscheiden, ob die gemessene mRNA-Menge die akute Entzündungsreaktion oder einen länger zurückliegenden Zeitraum widerspiegelt.

Barbeiro et al. beobachteten eine Verminderung der Cathelicidin-LL-37-mRNA-Expression während eines septischen Schocks, jedoch nicht während einer schweren Sepsis. Die Protein-Konzentration war bei beiden Gruppen im Vergleich zu Gesunden erniedrigt. Ein Zusammenhang mit dem Vitamin-D-Spiegel bestand in ihren Untersuchungen nicht [24].

Book et al., die die mRNA-Expression des antimikrobiellen Peptides hBD2 in Blutzellen von Patienten mit Sepsis untersuchten, beobachteten keinen Unterschied zwischen Sepsis-Patienten und Kontrollen. Stimulierten sie die Proben jedoch *ex vivo* mit Endotoxin, zeigten Sepsis-Patienten eine signifikant erniedrigte mRNA-Expression [32].

Die Korrelationsanalyse der Cathelicidin-LL-37-mRNA-Expression und des Cathelicidin-LL-37-Proteinspiegels zeigte, dass mit steigender mRNA-Expression die Menge an Protein im Blut tendenziell steigt. Die fehlende Signifikanz für diesen Zusammenhang kann möglicherweise durch die relativ niedrige Fallzahl erklärt werden. Auch Adams et al. fanden keine Korrelation zwischen der Cathelicidin-LL-37-mRNA-Expression und den Proteinspiegeln [5].

In der vorliegenden Studie bestand zwischen 25-Hydroxycholecalciferol und Cathelicidin-LL-37 eine negative Korrelation. Abweichend von der Annahme, dass die Cathelicidin-LL-37-Konzentration bei niedrigen Vitamin-D-Spiegeln auch niedrig ist (wie von Jeng et al. beobachtet), traten die höchsten Cathelicidin-LL-37-Spiegel in Proben mit niedrigen Vitamin-D-Spiegeln auf. Wie schon oben beschrieben, wird das Cathelicidin-LL-37 bei Sepsis vermutlich vermehrt aus Neutrophilen freigesetzt. Die vorliegenden Ergebnisse lassen keinerlei Schlüsse zur Bioverfügbarkeit des ausgeschütteten Cathelicidin-LL-37 zu. Das Protein bindet an Apolipoprotein A-I [145], das bei Akute-Phase-Reaktionen vermehrt aus high-density-lipoprotein (HDL) freigesetzt wird [29].

Barbeiro et al. vermuteten, dass die erhöhten Cathelicidin-LL-37-Spiegel während einer schweren Sepsis aufgrund der pro-inflammatorischen Eigenschaften des Peptids weitere Schädigungen verursachen und zur Schwere der Erkrankung beitragen [24].

Alvarez-Rodriguez et al. konnten bei gesunden Patienten mit steigendem Alter eine Abnahme des Cathelicidin-Spiegels beobachten, der mit den gemessenen Vitamin-D-Spiegeln korrelierte [12].

Andere Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen den Cathelicidin- und Vitamin-D-Spiegeln feststellen [5, 64, 106, 154]. Eine mögliche Erklärung für diese Befunde ist, dass der Vitamin-D-Mangel zu weit verbreitet ist. Daher werden nahezu keine Patienten mit suffizienten Vitamin-D-Spiegeln und daraus potenziell höheren Cathelicidin-LL-37-Ausgangslevel eingeschlossen.

Dixon et al. fanden bei gesunden Probanden mit einem Vitamin-D-Spiegel > 32 ng/ml eine hohe Korrelation mit dem Cathelicidin-LL-37-Spiegel. Mit steigendem Vitamin-D-Spiegel stieg auch der Cathelicidin-LL-37-Spiegel. Bei Probanden mit einem Vitamin-D-Spiegel < 32 ng/ml war keine solche Korrelation zu beobachten. Mit 20 Probanden handelt es sich aber um eine kleine Studie mit eingeschränkter Aussagekraft [51].

Die stärkste Korrelation beobachteten Gombart et al. zwischen der Zahl der weißen Blutkörperchen und der Cathelicidin-LL-37-Konzentration [64].

5.3 Alpha₁-Antitrypsin und SIRS

Alpha₁-Antitrypsin zeigte sich bei SIRS-Patienten signifikant erhöht. Es kommt also nicht zu einem Verbrauch sondern zu einer gesteigerten Produktion und Abgabe als Akute-Phase-Protein aus Neutrophilen. Bossink et al. konnten zeigen, dass Alpha₁-Antitrypsin als ein prädiktiver Marker für bakterielle Infektionen dienen kann [35]. Im Gegensatz zu dem hier beobachteten Anstieg im Verlauf der Erkrankung, beobachteten sie einen leichten Abfall im Zeitverlauf.

5.4 Zusammenhang zwischen Serumparameter und Schweregrad der Erkrankung

Zu Beginn der vorliegenden Studie wurde angenommen, dass Patienten, die unter einem Vitamin-D-Mangel leiden, schwerer erkranken als suffizient mit Vitamin D versorgte Patienten. Um diese Hypothese zu untersuchen wurde bei den Patienten der APACHE-II-Score erhoben, der annähernd die Schwere der Sepsis beschreibt.

Die vorliegende Analyse ergab keinen Zusammenhang zwischen dem APACHE-II-Score und dem Vitamin-D-Spiegel. Tendenziell waren Patienten mit einem höheren Spiegel weniger schwer erkrankt als Patienten mit einem sehr niedrigen Vitamin-D-Spiegel. Auch bei dieser Analyse konnten aufgrund der hohen Inzidenz des Vitamin-D-Defizites fast ausschließlich Vitamin-D-insuffiziente oder -defiziente Patienten miteinander verglichen werden. Arnson et al. fanden ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen APACHE-II-Score und Vitamin-D-Spiegel, beobachteten aber einen Unterschied in der mittleren Überlebenszeit bei Vitamin-D-suffizienten bzw. -defizienten Patienten auf der Intensivstation [16].

Moromizato et al. untersuchten das Auftreten von Sepsis bei Patienten, die auf eine Intensivstation aufgenommen wurden und bei denen zuvor aus anderen Gründen der Vitamin-D-Spiegel gemessen wurde. Vitamin-D-defiziente Patienten entwickelten häufiger eine Sepsis und hatten ein höheres Mortalitätsrisiko [113].

Zwischen dem APACHE-II-Score und der Cathelicidin-LL-37-Proteinkonzentration bzw. Cathelicidin-LL-37-mRNA-Expression bestand ebenfalls kein Zusammenhang. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Berkestedt et. al, die eine Korrelation des SOFA-Scores mit α -Defensinen beobachteten, jedoch nicht mit Cathelicidin-LL-37 [27].

5.5 Schlussfolgerung

Zur Analyse der Bedeutung des Vitamin D im Rahmen einer Sepsis sind weitere Studien erforderlich. Primär ist die Etablierung einer evidenzbasierten Definition für eine Vitamin-D-Defizienz unverzichtbar. Daneben sind weitere, große prospektive Studien durchzuführen, die sich mit dem Vitamin-D-Mangel und seinen Konsequenzen bzw. mit seiner Eignung als prognostischer Marker befassen. Aufbauend auf den Ergebnissen solcher Studien könnten dann Interventionsstudien durchgeführt werden.

Zurzeit laufen zwei große Studien (VITAL, VIDAL), die die Auswirkung einer Vitamin-D-Substitution (2000 I.U. bzw. 3200 I.U. pro Tag) bei gesunden, älteren Erwachsenen auf primäre Endpunkte wie Krebs, Herz-Kreislaufkrankungen und Schlaganfall sowie sekundäre Endpunkte wie Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen und Infektionen untersuchen. Die Ergebnisse werden erst in den nächsten Jahren erwartet [84, 86].

Sinnvoll wären auch Outcome-Analysen einer Vitamin-D-Substitution speziell bei Sepsis-Patienten oder klinische Studien zur präventiven Gabe an hospitalisierte Patienten, um das eventuell veränderte Auftreten von Infektionen zu untersuchen.

Derzeit gibt es lediglich vereinzelt präklinische und klinische Analysen zu dieser Thematik.

In-vitro-Daten zeigen, dass Vitamin-D-Analoga (TX527) die T-Zell-Proliferation inhibieren, die Zytokinausschüttung beeinflussen und die Migration von T-Zellen zu den Entzündungsherden fördern [18]. Bei Mäusen konnte die 1,25-Dihydroxycholecalciferol-Gabe die Schwere der Thrombozytopenie bei einer disseminierten intravasaler Gerinnung (DICT) vermindern [110]. Kleinere Studien konnten durch die Gabe von Vitamin D und/oder Calcium bei kritisch kranken (nicht notwendigerweise Sepsiserkrankungen) Patienten keine Verbesserung des Outcomes erzielen [94, 116]. In einer Metaanalyse von Chowdhury et al. zeigte sich durch Vitamin-D-Supplementation eine verringerte Gesamtmortalität [42].

Van den Berghe et al. erreichten mit einer Hochdosis-Vitamin-D-Substitution bei Intensivpatienten einen deutlichen Rückgang von inflammatorischen Markern wie CRP und IL-6 im Vergleich zu niedrig dosierten Vitamin-D-Gaben [26]. Bhan et al. behandelten gesunde Probanden mit 50000 I.U. (international units) Vitamin D täglich. Im Vergleich zu den Werten vor der Behandlung konnte ein Anstieg des Cathelicidins beobachtet werden. Dieser Effekt war umso größer, je größer das Vitamin-D-Defizit zunächst war [28].

Auch der mögliche Einsatz von Cathelicidinen im klinischen Alltag sollte näher untersucht werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Sepsis-Patienten im Vergleich zu anderen Intensiv-Patienten und gesunden Kontrollen signifikant erniedrigte Vitamin-D-Spiegel, aber erhöhte Cathelicidin-LL-37-Spiegel aufweisen. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Schwere der Erkrankung und Vitamin-D bzw. Cathelicidin-LL-37-Spiegel ließ sich nicht feststellen.

6 Zusammenfassung

Die Sepsis ist trotz der Fortschritte der modernen Medizin noch immer mit einer hohen Morbidität und Mortalität behaftet. Durch das Einwirken von Pathogenen auf den Organismus kommt es zu einem komplexen Wechselspiel pro- und anti-inflammatorischer Mechanismen, um die Homöostase des Organismus wiederherzustellen. Im Zuge dessen kann es zu Endothel- und Endorganschäden, Dysregulation der Gerinnung, Thromben und Gewebischämie kommen. Bislang steht neben der antibiotischen Therapie bzw. Fokussanierung nur eine symptomatische Sepsis-Therapie zur Verfügung. Durch die Identifikation von protektiven Faktoren, die eine schwere Verlaufsform verhindern und kausale Therapieansätze, die nicht nur Pathogene eliminieren, sondern auch das nachfolgende Immungeschehen beeinflussen, könnte das Outcome verbessert werden.

Vitamin D hat eine große Bedeutung für das angeborene und erworbene Immunsystem. Mindestens 28 % der gesunden Bevölkerung sind von einem Vitamin-D-Mangel betroffen. Man geht bei einem Spiegel von < 20 ng/ml von einem Defizit aus. Erst > 30 ng/ml spricht man von einer suffizienten Versorgung.

Vitamin D reguliert die Expression von antimikrobiellen Peptiden wie Cathelicidine, die ebenfalls eine Rolle bei der angeborenen Immunabwehr spielen.

Der Alpha₁-Antitrypsin-Spiegel ist im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion bei SIRS signifikant erhöht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Serumkonzentration von 25-Hydroxycholecalciferol, Cathelicidin-LL-37 (zusätzlich auch Expressionsstudien auf mRNA-Ebene)- und von Alpha₁-Antitrypsins bei SIRS bzw. Sepsis zu untersuchen und so mögliche protektive Faktoren und prognostische Marker zu identifizieren.

Dazu wurden Blutentnahmen bei SIRS-Patienten und Intensivpatienten ohne SIRS (Intensiv-Kontrolle) sowie bei gesunden Kontrollen durchgeführt und daraus die Parameter bestimmt. Weiterhin wurden bei den Intensivpatienten der APACHE-II-Score, SOFA-Score und MODS-Score erhoben, um die Schwere der Erkrankung einzuschätzen.

Die SIRS-Patienten zeigten eine ausgeprägte Vitamin-D-Defizienz und signifikant niedrigere Spiegel ($8,921 \pm 6,812$ ng/ml) als Patienten der Intensiv-Kontrolle und als gesunde Probanden. Auch unter den gesunden Kontrollen waren nur 28% suffizient mit Vitamin D versorgt.

Entgegen der Annahme, dass SIRS-Patienten einen erniedrigten Cathelicin LL-37-Spiegel aufweisen, wurden verglichen mit den Patienten der Intensivkontrolle und mit gesunden Probanden signifikant erhöhte Werte ($12,39 \pm 9,775$ ng/ml) gemessen. Auf mRNA-Ebene war dieser Unterschied nicht zu detektieren, daher ist eine im Rahmen von Entzündungsprozessen stattfindende Degranulierung von Neutrophilen eine mögliche Ursache für die Erhöhung der Cathelicidin-LL-37-Spiegel. Es bestand eine negative Korrelation zwischen den Vitamin-D- und Cathelicidin-LL-37-Spiegeln. Ein messbarer Zusammenhang zwischen der Schwere der Sepsis und dem Vitamin-D-Spiegel bzw. dem Cathelicidin-LL-37-Spiegel ließ sich nicht beobachten. Darüber hinaus zeigten die SIRS-Patienten signifikant erhöhte Alpha₁-Antitrypsin-Spiegel.

Die vorliegenden Ergebnisse erlauben keine Aussagen zu den Mechanismen der beobachteten Veränderungen. Ob sich Vitamin-D- und/oder Cathelicidin LL-37 als prognostische Faktoren eignen, muss in weiterführenden Studien mit größerer Probandenzahl untersucht werden.

7 Summary

Despite many efforts in modern medicine, systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis are still linked to high morbidity and mortality. The entry of pathogens into the organism results in a complex interplay between pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms to restore homeostasis, potentially leading to endothelial damage, organ failure, dysregulation of coagulation, thrombosis and ischemia of different tissues.

Besides antibiotic therapy and source control measures only symptomatic therapy-methods are available. Identification of protective factors that prevent a severe course of the disease and new therapeutic strategies that do not only eliminate pathogens but support the balance between pro-inflammatory and immunosuppressive phases could improve the outcome.

Vitamin D has a great importance for the innate and adaptive immune system. Vitamin D deficiency is a widespread problem. 28% of the healthy population are affected. Deficiency is defined as vitamin D levels <20 ng/ml. The minimum level which is considered sufficient should be above 30 ng/ml.

Vitamin D is also important for the regulation of the expression of antimicrobial peptides as cathelicidins that play a role in innate immune response.

The aim of this study was to examine serum levels of vitamin D (25-Hydroxycholecalciferol), Cathelicidin-LL-37 (protein and mRNA-level) and alpha₁-antitrypsin during SIRS and to identify potential protective factors and prognostic markers.

For this purpose, blood samples were taken from SIRS patients and control patients from the intensive care unit as well as from healthy controls. Serum levels were measured and clinical data, particularly APACHE-II-Score, SOFA-Score and MODS-Score were collected to define the severity of sepsis.

The main finding was that SIRS patients are vitamin D deficient and have significant lower vitamin D levels than controls from the intensive care unit and healthy controls. Even among the healthy controls, only 28% had sufficient vitamin D levels.

Contrary to the hypothesis that Cathelicidin-LL-37 is decreased during SIRS, increased levels ($12,39 \pm 9,775$ ng/ml) were measured compared to controls from the intensive care unit and healthy controls. This difference could not be detected on mRNA-level so that a physiological degranulation of neutrophils during the inflammatory process might be a reason for the increased Cathelicidin-LL-37-level. Because of the increased level

of Cathelicidin-LL-37, a negative correlation was observed between the vitamin D and Cathelicidin-LL-37 levels.

No measurable correlation between the severity of sepsis and the vitamin D level, respectively the Cathelicidin-LL-37 level was found. SIRS-patients had significant higher alpha₁-antitrypsin-levels.

This study cannot answer questions about the mechanisms of the observations. Whether vitamin D levels and/or Cathelicidin-LL-37 levels could be used as prognostic markers has to be answered in further studies.

Literaturverzeichnis

1. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, Yoshiki S, Suda T. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:4990–4994.
2. ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*. 1992;20:864–74.
3. Ackermann D. Die Hyperkalzämie im Verlauf der Sarkoidose – Fallbeispiel, Prävalenz, Pathophysiologie und Therapiemöglichkeiten. *Therapeutische Umschau*. 2007;64:281–286.
4. Adams JS, Liu PT, Chun R, Modlin RL, Hewison M. Vitamin D in Defense of the Human Immune Response. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1117:94–105.
5. Adams JS, Ren S, Liu PT, Chun RF, Lagishetty V, Gombart AF, Borregaard N, Modlin RL, Hewison M. Vitamin D-Directed Rheostatic Regulation of Monocyte Antibacterial Responses. *The Journal of Immunology*. 2009;182:4289–4295.
6. Adorini L. Immunomodulatory effects of vitamin D receptor ligands in autoimmune diseases. *International immunopharmacology*. 2002;2:1017–1028.
7. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jörnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*. 2000;96:3086–3093.
8. Agerberth B, Grunewald J, Castanos-Velez E, Olsson B, Jörnvall H, Wigzell H, Eklund A, Gudmundsson GH. Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;160:283–290.
9. Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92:195–199.
10. Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P. Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes & Control*. 2000;11:847–852.

11. Alalwani SM, Sierigk J, Herr C, Pinkenburg O, Gallo R, Vogelmeier C, Bals R. The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. *European Journal of Immunology*. 2010;40:1118–1126.
12. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Garcia-Unzueta M, Amado JA, Cacho PM, Martinez-Taboada VM. Age and low levels of circulating vitamin D are associated with impaired innate immune function. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;91:829–838.
13. Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo M, Mazzeo D, Di Lucia P, Lang R, Sinigaglia F, Panina-Bordignon P. Inhibition of IL-12 production by 1, 25-dihydroxyvitamin D 3. *J Clin Invest*. 1998;101:252–262.
14. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*. 2001;29:1303–1310.
15. Annane D, Bellissant E, Cavaillon J-M. Septic shock. *The Lancet*. 2005;365:63–78.
16. Arnson Y, Gringauz I, Itzhaky D, Amital H. Vitamin D deficiency is associated with poor outcomes and increased mortality in severely ill patients. *QJM*. 2012;105:633–639.
17. Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of Internal Medicine*. 2007;167:1730–1737.
18. Baeke F, Korf H, Overbergh L, Verstuyf A, Thorrez L, Van Lommel L, Waer M, Schuit F, Gysemans C, Mathieu C. The Vitamin D Analog, TX527, Promotes a Human CD4+CD25highCD127low Regulatory T Cell Profile and Induces a Migratory Signature Specific for Homing to Sites of Inflammation. *The Journal of Immunology*. 2011;186:132–142.
19. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95:9541–9546.
20. Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, Accurso F, Wilson JM. Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001;25:21–25.

21. Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, Wilson JM. Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;103:1113–1117.
22. Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infection and immunity*. 1999;67:6084–6089.
23. Bals R, Wilson JM. Cathelicidins - a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2003;60:711–720.
24. Barbeiro DF, Barbeiro HV, Zampieri FG, César Machado MC, Torggler Filho F, Gomes Cunha DM, Goulart AC, Velasco IT, Monteiro da Cruz Neto L, Possolo de Souza H, Pinheiro da Silva F. Cathelicidin-LL-37 bloodstream surveillance is down regulated during septic shock. *Microbes and Infection*. 2013;15:342–346.
25. Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H, Reinhart K. Sepsis: Aktuelle Aspekte zu Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. *Der Anaesthetist*. 2006;55:835–845.
26. Van den Berghe G, Van Roosbroeck D, Vanhove P, Wouters PJ, De Pourcq L, Bouillon R. Bone Turnover in Prolonged Critical Illness: Effect of Vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003;88:4623–4632.
27. Berkestedt I, Herwald H, Ljunggren L, Nelson A, Bodelsson M. Elevated Plasma Levels of Antimicrobial Polypeptides in Patients with Severe Sepsis. *Journal of Innate Immunity*. 2010;2:478–482.
28. Bhan I, Camargo CA, Wenger J, Ricciardi C, Ye J, Borregaard N, Thadhani R. Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and human cathelicidin in healthy adults. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;127:1302–1304.e1.
29. Blackburn WD, Dohlman JG, Venkatachalapathi YV, Pillion DJ, Koopman WJ, Segrest JP, Anantharamaiah GM. Apolipoprotein AI decreases neutrophil degranulation and superoxide production. *Journal of lipid research*. 1991;32:1911–1918.
30. Bland R, Zehnder D, Hewison M. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 [alpha]-hydroxylase along the nephron: new insights into renal vitamin D metabolism. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2000;9:17–22.

31. Bolland MJ, Grey AB, Ames RW, Mason BH, Horne AM, Gamble GD, Reid IR. The effects of seasonal variation of 25-hydroxyvitamin D and fat mass on a diagnosis of vitamin D sufficiency. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;86:959–964.
32. Book M, Chen Q, Lehmann LE, Klaschik S, Weber S, Schewe J-C, Luepertz M, Hoefft A, Stuber F. Inducibility of the endogenous antibiotic peptide beta-defensin 2 is impaired in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2007;11:R19.
33. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD, Kreisel D, Krupnick AS, Srivastava A, Swanson PE, Green JM, Hotchkiss RS. Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. *JAMA*. 2011;306:2594.
34. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HFJ, O'Garra A. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Has a Direct Effect on Naive CD4⁺ T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. *The Journal of Immunology*. 2001;167:4974–4980.
35. Bossink AW, Groeneveld AJ, Thijs LG. Prediction of microbial infection and mortality in medical patients with fever: plasma procalcitonin, neutrophilic elastase- α 1-antitrypsin, and lactoferrin compared with clinical variables. *Clinical infectious diseases*. 1999;29:398–407.
36. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr. Rev.* 2008;29:726–776.
37. Brown KL, Cosseau C, Gardy JL, Hancock REW. Complexities of targeting innate immunity to treat infection. *Trends in Immunology*. 2007;28:260–266.
38. Burton MF, Steel PG. The chemistry and biology of LL-37. *Natural Product Reports*. 2009;26:1572.
39. Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1, 25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80:1717S–1720S.
40. Carrell RW. alpha 1-Antitrypsin: molecular pathology, leukocytes, and tissue damage. *Journal of Clinical Investigation*. 1986;78:1427.
41. Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, Fabra R, Heinrich PC. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS letters*. 1989;242:237–239.

42. Chowdhury R, Kunutsor S, Vitezova A, Oliver-Williams C, Chowdhury S, Kiefte-de-Jong JC, Khan H, Baena CP, Prabhakaran D, Hoshen MB, Feldman BS, Pan A, Johnson L, Crowe F, Hu FB, Franco OH. Vitamin D and risk of cause specific death: systematic review and meta-analysis of observational cohort and randomised intervention studies. *BMJ*. 2014;348:g1903–g1903.
43. Christakos S, Dhawan P, Liu Y, Peng X, Porta A. New insights into the mechanisms of vitamin D action. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003;88:695–705.
44. Cippitelli M, Santoni A. Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene. *Eur. J. Immunol*. 1998;28:3017–3030.
45. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Bergnach C, Orlando F, Silvestri C, Mocchegiani F, Licci A, Skerlavaj B, Rocchi M, Saba V, Zanetti M, Scalise G. LL-37 Protects Rats against Lethal Sepsis Caused by Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50:1672–1679.
46. Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS letters*. 1995;368:173–176.
47. Czermak BJ, Sarma V, Pierson CL, Warner RL, Huber-Lang M, Bless NM, Schmal H, Friedl HP, Ward PA. Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nature medicine*. 1999;5:788–792.
48. Davidson DJ, Currie AJ, Reid GS, Bowdish DM, MacDonald KL, Ma RC, Hancock RE, Speert DP. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *The Journal of Immunology*. 2004;172:1146–1156.
49. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *The FASEB Journal*. 2001;15:2579–2585.
50. Díaz J, Arribas JM, Vallina E, Maradona JA, Hevia C, Blanco F. [Acute-phase reactants in sepsis]. *Rev Clin Esp*. 1992;191:473–477.
51. Dixon BM, Barker T, McKinnon T, Cuomo J, Frei B, Borregaard N, Gombart AF. Positive correlation between circulating cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18/LL-37) and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy adults. *BMC research notes*. 2012;5:575.
52. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, Kinkeldei J, Boehm BO, Weihrauch G, Maerz W. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Archives of internal medicine*. 2008;168:1340–1349.

53. Dombrowski Y, Peric M, Koglin S, Ruzicka T, Schaubert J. Control of cutaneous antimicrobial peptides by vitamin D3. *Archives of Dermatological Research*. 2010;302:401–408.
54. Ducloux D, Courivaud C, Bamoulid J, Kazory A, Dumoulin G, Chalopin J-M. Pre-transplant Serum Vitamin D Levels and Risk of Cancer After Renal Transplantation: *Transplantation*. 2008;85:1755–1759.
55. Dusso AS. Vitamin D. *AJP: Renal Physiology*. 2005;289:F8–F28.
56. Engel C, Brunkhorst FM, Bone H-G, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Medicine*. 2007;33:606–618.
57. Equils O, Naiki Y, Shapiro AM, Michelsen K, Lu D, Adams J, Jordan S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits lipopolysaccharide-induced immune activation in human endothelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 2006;143:58–64.
58. Flynn L, Zimmerman LH, McNorton K, Dolman M, Tyburski J, Baylor A, Wilson R, Dolman H. Effects of vitamin D deficiency in critically ill surgical patients. *The American Journal of Surgery*. 2012;203:379–382.
59. Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2008;3:16.
60. Frohm M. The Expression of the Gene Coding for the Antibacterial Peptide LL-37 Is Induced in Human Keratinocytes during Inflammatory Disorders. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:15258–15263.
61. Fukumoto K, Nagaoka I, Yamataka A, Kobayashi H, Yanai T, Kato Y, Miyano T. Effect of antibacterial cathelicidin peptide CAP18/LL-37 on sepsis in neonatal rats. *Pediatric Surgery International*. 2005;21:20–24.
62. Garland CF, Garland FC, Gorham ED. Calcium and vitamin D: their potential roles in colon and breast cancer prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;889:107–119.

63. Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Archives of internal medicine*. 2009;169:384–390.
64. Gombart AF, Bhan I, Borregaard N, Tamez H, Camargo, Jr. CA, Koeffler HP, Thadhani R. Low Plasma Level of Cathelicidin Antimicrobial Peptide (hCAP18) Predicts Increased Infectious Disease Mortality in Patients Undergoing Hemodialysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;48:418–424.
65. Gombart AF. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *The FASEB Journal*. 2005;19:1067–1077.
66. Graf J, Janssens U. Scoring-Systeme in der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung der Sepsis? diagnostische und therapeutische Implikationen. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*. 2004;41:476–487.
67. Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Alternative Medicine Review*. 2005;10.
68. Grant WB. An estimate of premature cancer mortality in the U.S. due to inadequate doses of solar ultraviolet-B radiation. *Cancer*. 2002;94:1867–1875.
69. Grant WB. Solar ultraviolet-B irradiance and vitamin D may reduce the risk of septicemia. *Dermato-Endocrinology*. 2009;1:25–30.
70. Hagel S, Brunkhorst F. Sepsis. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*. 2011;48:57–73.
71. Hansdottir S, Monick MM, Hinde SL, Lovan N, Look DC, Hunninghake GW. Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense. *The Journal of Immunology*. 2008;181:7090–7099.
72. Hauber HP, Zabel P. Pathophysiologie und Keimspektrum der Sepsis. *Der Internist*. 2009;50:779–787.
73. Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS. Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 α -hydroxylase. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2004;215:31–38.
74. Hirsch T, Metzger M, Niederbichler A, Steinau H-U, Eriksson E, Steinstraesser L. Role of host defense peptides of the innate immune response in sepsis: *Shock*. 2007;1.
75. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;87:1080S–1086S.

76. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Vol 81. Elsevier; 2006:353–373.
77. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2007;357:266–281.
78. Hoover DR, Ihi T, Nakazato M, Mukae H, Matsukura S. Elevated concentrations of human neutrophil peptides in plasma, blood, and body fluids from patients with infections. *Clinical infectious diseases*. 1997;25:1134–1140.
79. Howell MD, Novak N, Bieber T, Pastore S, Girolomoni G, Boguniewicz M, Streib J, Wong C, Gallo RL, Leung DY. Interleukin-10 downregulates anti-microbial peptide expression in atopic dermatitis. *Journal of investigative dermatology*. 2005;125:738–745.
80. Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis. *Der Anaesthetist*. 2004;53:10–28.
81. Hutchinson MS, Grimnes G, Joakimsen RM, Figenschau Y, Jorde R. Low serum 25-hydroxyvitamin D levels are associated with increased all-cause mortality risk in a general population: the Tromso study. *European Journal of Endocrinology*. 2010;162:935–942.
82. Jean-Baptiste E. Cellular Mechanisms in Sepsis. *Journal of Intensive Care Medicine*. 2007;22:63–72.
83. Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE, Blumberg HM, Martin GS, Ziegler TR, Tangpricha V. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *Journal of Translational Medicine*. 2009;7:28.
84. JoAnn Manson, Julie Buring. VITAL The VITamin D and OmegA-3-TriaL. Available at: www.vitalstudy.org.
85. Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt KD, Agerberth B. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:3718–3724.
86. Julian Peto. Feasibility study for a large randomised controlled trial measuring the effect of oral vitamin D on morbidity and mortality in men and women aged 65-84.
87. Kempker JA, Han JE, Tangpricha V, Ziegler TR, Martin GS. Vitamin D and sepsis: An emerging relationship. *Dermato-Endocrinology*. 2012;4:101–108.

88. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit. Care Med.* 1985;13:818–829.
89. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, Issbrücker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *Journal of Clinical Investigation.* 2003;111:1665–1672.
90. Krishnan A, Ochola J, Mundy J, Jones M, Kruger P, Duncan E, Venkatesh B. Acute fluid shifts influence the assessment of serum vitamin D status in critically ill patients. *Crit Care.* 2010;14:R216.
91. Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infection and immunity.* 1995;63:1291–1297.
92. Larrick JW, Lee J, Ma S, Li X, Francke U, Wright SC, Balint RF. Structural, functional analysis and localization of the human CAP18 gene. *FEBS Letters.* 1996;398:74–80.
93. Lee P, Eisman JA, Center JR. Vitamin D deficiency in critically ill patients. *N. Engl. J. Med.* 2009;360:1912–1914.
94. Lee P, Nair P, Eisman JA, Center JR. Vitamin D deficiency in the intensive care unit: an invisible accomplice to morbidity and mortality? *Intensive Care Medicine.* 2009;35:2028–2032.
95. Lee P. Vitamin D metabolism and deficiency in critical illness. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2011;25:769–781.
96. Levin M, Quint PA, Goldstein B, Barton P, Bradley JS, Shemie SD, Yeh T, Kim SS, Cafaro DP, Scannon PJ. Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI₂₁) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: a randomised trial. *The Lancet.* 2000;356:961–967.
97. Leyssens C, Verlinden L, Verstuyf A. The future of vitamin D analogs. *Frontiers in Physiology.* 2014;5.
98. Li H, Stampfer MJ, Hollis JBW, Mucci LA, Gaziano JM, Hunter D, Giovannucci EL, Ma J. A prospective study of plasma vitamin D metabolites, vitamin D receptor polymorphisms, and prostate cancer. *PLoS Medicine.* 2007;4:e103.
99. Lips P. Vitamin D physiology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 2006;92:4–8.

100. Liu E, Meigs JB, Pittas AG, McKeown NM, Economos CD, Booth SL, Jacques PF. Plasma 25-Hydroxyvitamin D Is Associated with Markers of the Insulin Resistant Phenotype in Nondiabetic Adults. *Journal of Nutrition*. 2008;139:329–334.
101. Liu PT, Krutzik SR, Modlin RL. Therapeutic implications of the TLR and VDR partnership. *Trends in Molecular Medicine*. 2007;13:117–124.
102. Liu PT, Stenger S, Tang DH, Modlin RL. Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. *The Journal of Immunology*. 2007;179:2060–2063.
103. Liu PT. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. *Science*. 2006;311:1770–1773.
104. Mahon BD, Wittke A, Weaver V, Cantorna MT. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003;89:922–932.
105. Malloy PJ, Feldman D. Genetic Disorders and Defects in Vitamin D Action. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2010;39:333–346.
106. Mandic Havelka A, Yektaei-Karin E, Hultenby K, Sørensen O, Lundahl J, Berggren V, Marchini G. Maternal plasma level of antimicrobial peptide LL37 is a major determinant factor of neonatal plasma LL37 level: Maternal transfer of immune component. *Acta Paediatrica*. 2010;99:836–841.
107. Marshall JC, Cook DJM, Christou NVM, Bernard GR, Sprung CLMJ, Sibbald WJ. Multiple Organ Dysfunction Score: A reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Critical Care Medicine October 1995*. 1995;23:1638–1652.
108. Martí-Carvajal AJ, Solà I, Gluud C, Lathyris D, Cardona AF. Human recombinant protein C for severe sepsis and septic shock in adult and paediatric patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;12:CD004388.
109. Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B. 25-hydroxyvitamin d levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med*. 2008;168:1629–1637.
110. Møller S, Laigaard F, Olgaard K, Hemmingsen C. Effect of 1, 25-dihydroxy-vitamin D3 in experimental sepsis. *International journal of medical sciences*. 2007;4:190.
111. Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistolic J. Modulation of the TLR-mediated inflammatory re-

- response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *The Journal of Immunology*. 2006;176:2455–2464.
112. Mookherjee N, Hancock REW. Cationic host defence peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007;64:922–933.
113. Moromizato T, Litonjua AA, Braun AB, Gibbons FK, Giovannucci E, Christopher KB. Association of Low Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Sepsis in the Critically Ill: *Critical Care Medicine*. 2014;42:97–107.
114. Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, Heumann D. Cathelicidin Family of Antibacterial Peptides CAP18 and CAP11 Inhibit the Expression of TNF- by Blocking the Binding of LPS to CD14+ Cells. *The Journal of Immunology*. 2001;167:3329–3338.
115. Ng K, Meyerhardt JA, Wu K, Feskanich D, Hollis BW, Giovannucci EL, Fuchs CS. Circulating 25-Hydroxyvitamin D Levels and Survival in Patients With Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26:2984–2991.
116. Li-Ng M, Aloia JF, Pollack S, Cunha BA, Mikhail M, Yeh J, Barbari N. A randomized controlled trial of vitamin D3 supplementation for the prevention of symptomatic upper respiratory tract infections. *Epidemiology and Infection*. 2009;137:1396.
117. Nguyen HB, Eshete B, Lau KHW, Sai A, Villarín M, Baylink D. Serum 1,25-Dihydroxyvitamin D: An Outcome Prognosticator in Human Sepsis Caldwell CC, ed. *PLoS ONE*. 2013;8:e64348.
118. Nguyen HB, Rivers EP, Abrahamian FM, Moran GJ, Abraham E, Trzeciak S, Huang DT, Osborn T, Stevens D, Talan DA. Severe Sepsis and Septic Shock: Review of the Literature and Emergency Department Management Guidelines. *Annals of Emergency Medicine*. 2006;48:54.e1.
119. Nilsson MF, Sandstedt B, Sørensen O, Weber G, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infection and immunity*. 1999;67:2561–2566.
120. Niyonsaba F, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Epithelial cell-derived antibacterial peptides human beta-defensins and cathelicidin: multifunctional activities on mast cells. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*. 2003;2:224–231.

121. Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, Hirata M, Matsuda H, Ogawa H, Nagaoka I. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology*. 2002;106:20–26.
122. Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human β -defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D2 production from mast cells. *European journal of immunology*. 2001;31:1066–1075.
123. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *New England Journal of Medicine*. 2002;347:1151–1160.
124. Oren Z, Lerman J, Gudmundsson G, Agerberth B, Shai Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem. J*. 1999;341:501–513.
125. Palomer X, González-Clemente JM, Blanco-Vaca F, Mauricio D. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2008;10:185–197.
126. Penna G, Adorini L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Inhibits Differentiation, Maturation, Activation, and Survival of Dendritic Cells Leading to Impaired Alloreactive T Cell Activation. *The Journal of Immunology*. 2000;164:2405–2411.
127. Peters BM, Shirtliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS pathogens*. 2010;6:e1001067.
128. Pramanik R, Asplin JR, Lindeman C, Favus MJ, Bai S, Coe FL. Lipopolysaccharide negatively modulates vitamin D action by down-regulating expression of vitamin D-induced VDR in human monocytic THP-1 cells. *Cellular Immunology*. 2004;232:137–143.
129. Rosenfeld Y, Papo N, Shai Y. Endotoxin (Lipopolysaccharide) Neutralization by Innate Immunity Host-Defense Peptides: Peptide properties and plausible modes of action. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281:1636–1643.
130. Russell JA. Management of sepsis. *N. Engl. J. Med*. 2006;355:1699–1713.
131. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, Ploder M, Tamandl D, Friedl J, Zügel U, Steinmeyer A, Pollak A, Roth E. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *European journal of immunology*. 2006;36:361–370.

132. Schaller-Bals S, Schulze A, Bals R. Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;165:992–995.
133. Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, Büchau AS, Liu PT, Kiken D, Helfrich YR, Kang S, Elalieh HZ, Steinmeyer A, Zügel U, Bikle DD, Modlin RL, Gallo RL. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117:803–811.
134. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *The Journal of Immunology*. 2002;169:3883–3891.
135. Sly LM. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃-induced Monocyte Antimycobacterial Activity Is Regulated by Phosphatidylinositol 3-Kinase and Mediated by the NADPH-dependent Phagocyte Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:35482–35493.
136. Sørensen O, Arnljots K, Cowland JB, Bainton DF, Borregaard N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood*. 1997;90:2796–2803.
137. Sørensen O, Cowland JB, Askaa J, Borregaard N. An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *Journal of immunological methods*. 1997;206:53–59.
138. Sørensen OE. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*. 2001;97:3951–3959.
139. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, Weiss YG, Benbenishty J, Kalenka A, Forst H, Laterre P-F, Reinhart K, Cuthbertson BH, Payen D, Briegel J, CORTICUS Study Group. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N. Engl. J. Med*. 2008;358:111–124.
140. Stoffels K, Overbergh L, Giuliotti A, Verlinden L, Bouillon R, Mathieu C. Immune Regulation of 25-Hydroxyvitamin-D₃-1 α -Hydroxylase in Human Monocytes. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2005;21:37–47.
141. Suri M, Thirupuram S, Sharma VK. Diagnostic and prognostic utility of C-reactive protein, alpha-1-antitrypsin and alpha-2-macroglobulin in neonatal sepsis: a comparative account. *Indian Pediatr*. 1991;28:1159–1164.

142. Sutton ALM, MacDonald PN. Vitamin D: More Than a “Bone-a-Fide” Hormone. *Molecular Endocrinology*. 2003;17:777–791.
143. Tanaka H, Abe E, Miyaura C, Kuribayashi T, Konno K, Nishii Y, Suda T la. 1 alpha, 25-Dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukaemia cell line (HL-60). *Biochem. j.* 1982;204:713–719.
144. Tecle T, Tripathi S, Hartshorn KL. Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity. *Innate Immunity*. 2010;16:151–159.
145. Torossian AMD, Gurschi E, Bals RMD, Vassiliou TMD, Wulf HFMD, Bauhofer APD. Effects of the Antimicrobial Peptide LL-37 and Hyperthermic Preconditioning in Septic Rats. *Anesthesiology September 2007*. 2007;107:437–441.
146. Tretli S, Hernes E, Berg JP, Hestvik UE, Robsahm TE. Association between serum 25(OH)D and death from prostate cancer. *British Journal of Cancer*. 2009;100:450–454.
147. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;69:842–856.
148. Vincent J-L, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. *Critical Care Medicine November 1998*. 1998;26:1793–1800.
149. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996;22:707–710.
150. Wah J, Wellek A, Frankenberger M, Unterberger P, Welsch U, Bals R. Antimicrobial peptides are present in immune and host defense cells of the human respiratory and gastrointestinal tracts. *Cell and Tissue Research*. 2006;324:449–456.
151. Wang G. Structures of Human Host Defense Cathelicidin-LL-37 and Its Smallest Antimicrobial Peptide KR-12 in Lipid Micelles. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283:32637–32643.
152. Wang G. Human Antimicrobial Peptides and Proteins. *Pharmaceuticals*. 2014;7:545–594.

153. Wang H, Zhu S, Zhou R, Li W, Sama AE. Therapeutic potential of HMGB1-targeting agents in sepsis. *Expert reviews in molecular medicine*. 2008;10:e32.
154. Watkins RR, Yamshchikov AV, Lemonovich TL, Salata RA. The role of vitamin D deficiency in sepsis and potential therapeutic implications. *Journal of Infection*. 2011;63:321–326.
155. Yang D, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. LL-37, the neutrophil granule–and epithelial cell–derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor–like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192:1069–1074.
156. Yim S, Dhawan P, Ragunath C, Christakos S, Diamond G. Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2007;6:403–410.
157. Yousefzadeh P, Shapses SA, Wang X. Vitamin D Binding Protein Impact on 25-Hydroxyvitamin D Levels under Different Physiologic and Pathologic Conditions. *International Journal of Endocrinology*. 2014;2014:1–6.
158. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS letters*. 1995;374:1–5.
159. Zehnder D, Bland R, Chana RS, Wheeler DC, Howie AJ, Williams MC, Stewart PM, Hewison M. Synthesis of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: a novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2002;13:621–629.
160. Zehnder D, Bland R, Williams MC, Mc Ninch RW, Howie AJ, Stewart PM, Hewison M. Extrarenal Expression of 25-Hydroxyvitamin D. *Studies*. 3:22–28.

Verzeichnis akademischer Lehrer

Adamkiewicz, Aigner, Albert, Aumüller, Bals, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Baumann, Becker, Benes, Berger, Binkowski, Boekhoff, Bolm, Braune, Büch, Burghard, Cetin, Christiansen, Cordes, Czubayko, Daut, Del Rey, Dinges, Dodel, Donner-Banzhoff, Duda, Eggert, Ehlenz, Fensterer, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Funck, Gerdes, Giebing, Gress, Grundmann, Grzeschik, Hadji, Hamer, Hellwig, Hemmeter, Hertl, Hielscher, Hoffmann, Hofmann, Hoyer, Jacke, Jackisch, Jackowski-Dohrmann, Jeck, Jerrentrup, Kaminskj, Kann, Kerzel, Kill, Kim-Berger, Kircher, Kirn, Klose, Konder, Koolman, Kösters, Kraft, Krieg, Kroll, Kuhnen, Lemansky, Leonhardt, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Lübbe, Lüehrs, Maisner, Mandrek, Martin, Meier, Meißner, Metz, Mittag, Moll, Möller, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumann, Neumüller, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Plant, Printz, Reif, Renz, Richter, Roelle, Rohlf, Röhms, Rosenow, Rothmund, Schade, Schäfer, Schepelmann, Schmidt, Schmitz, Schnabel, Schneider, Schrader, Schulte, Schulze, Schunk, Seifart, Seitz, Sommer, Sönnichsen, Steiniger, Steinkamp, Stiller, Sure, Tackenberg, Tibesku, Vogelmeier, Vogt, Von Bassewitz, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Weske, Westerman, Wrocklage, Wulf, Zemlin

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. R. Bals für die Bereitstellung des Themas und für seine Betreuung und Unterstützung während der Arbeit zu dieser Dissertation!

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Timm Greulich für seine Betreuung und sein Engagement, vor allem auch im klinischen Bereich, im „Alltag“ auf den teilnehmenden Intensivstationen und für die kritische Durchsicht der Ergebnisse und die wertvollen Anregungen.

Den Kollegen und Kolleginnen der AG Bals, Nadja Baumgartl, Thomas Damm, Dr. Christian Herr, Viktor Kotke und Annette Püchner danke ich für ihre Hilfe bei den Messungen, die geduldige Beantwortung meiner Fragen und nicht zuletzt für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die netten Gespräche zwischendurch. Ein Dank geht auch an Akira Hattesohl.

Meinem Mann und meinen Eltern danke ich für ihre fortwährende Unterstützung!

Danke auch an Wiebke Kaiser für die nun schon langjährige Freundschaft, die am Tag der Einschreibung in Marburg begann!