

**Einfluss von NOD2-Varianten auf die Prävalenz der hepatischen Enzephalopathie
bei Leberzirrhose und Untersuchung der pathophysiologischen
Zusammenhänge**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Georg Hoss

Betreuer: Prof. Dr. med. Jonas Rosendahl, Halle (Saale)

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Ronellenfitsch, Halle (Saale)
apl. Prof. Dr. Sebastian Krug, Heidelberg

Datum der Verteidigung: 02.12.2024

Gender-Hinweis

Zur besseren Lesbarkeit wurde in der vorliegenden Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Die genutzten Personenbezeichnungen beziehen sich, sofern nicht anders kenntlich gemacht, gleichermaßen auf weibliche und männliche Personen, die an der Studie teilgenommen haben.

Referat

Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2 (NOD2) übernimmt als Mustererkennungsrezeptor wichtige Funktionen des Immunsystems. Mutationen des Proteins sind mit reduzierter Barrierefunktion der Darmschleimhaut und vermehrter bakterieller Translokation (BT) assoziiert. BT kann bei Patienten mit Leberzirrhose den Verlauf von Infektionen und hepatischer Enzephalopathie (HE) beeinflussen.

Das primäre Studienziel war die Untersuchung der Effekte von NOD2-Risikovarianten auf BT, systemische Inflammation und HE. Für die prospektive multizentrische Studie wurden die Daten von Patienten mit Leberzirrhose analysiert. Mögliche NOD2-Risikovarianten (p.R702W, p.G908R, c.3020insC, N289S und c.-958T>C) wurden anhand von Genanalysen (TagMan-PCR) überprüft. Zudem wurden die Blutproben der Probanden mittels entsprechender Biomarker auf Anzeichen von BT (Ammoniak, Lipopolysaccharid-bindendes Protein, humaner Toll-Like Rezeptor 4) und Inflammationen (Leukozyten, CRP) sowie Immunaktivierung (Interleukin-6, CD14) untersucht. Der Nachweis kognitiver Beeinträchtigungen aufgrund overt (OHE) oder covert hepatischer Enzephalopathie (CHE) erfolgte anhand klinisch-neurologischer Untersuchungen und spezieller Testverfahren.

Die durchgeführte Studie umfasste 172 Patienten [70 % männlichen Geschlechts; Durchschnittsalter 60 (IQB 54-66) Jahre; Model of End Stage Liver Disease (MELD) 12 (IQB 9-16)] mit zumeist dekompensierter Leberzirrhose (n = 148 $\hat{=}$ 86 %). 53 Teilnehmende wiesen NOD2-Risikovarianten auf ($\hat{=}$ 31 %). Die Prävalenz beider HE-Entitäten betrug 27 % (CHE) und 11 % (OHE). Auch unter Berücksichtigung des MELD-Scores, war der NOD2-Status irrelevant für die Prävalenz von HE, BT, Inflammation oder Immunaktivierung. Unabhängig von NOD2-Polymorphismen korrelierte HE mit erhöhten Spiegeln von Ammoniak [ohne HE: 40.3 (30.7-57.3); mit HE 53.1 (33.8-73.5) $\mu\text{mol/l}$; p = 0.038], CRP [ohne HE: 7,2 (2,7-16,7); mit HE 12,6 (4,5-29,7) mg/dl; p = 0.010] und CD14 [ohne HE 2592 (2275–3033); mit HE 2755 (2410-3456) ng/ml; p = 0,025].

Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass NOD2-Risikovarianten für diese Studienpopulation, in der ein Großteil der Leberzirrhosen dekompensiert waren, keinen signifikanten Einfluss auf HE, BT sowie Entzündungsreaktionen hatten. Unabhängig vom NOD2-Status war das Auftreten von HE mit erhöhten Serumkonzentrationen von Ammoniak, CRP und CD14 assoziiert.

Hoss, Georg: Einfluss von NOD2-Varianten auf die Prävalenz der hepatischen Enzephalopathie bei Leberzirrhose und Untersuchung der pathophysiologischen Zusammenhänge

Inhaltsverzeichnis	
1. Einleitung	1
1.1 Leberzirrhose	1
1.1.1 Auslösende Faktoren	1
1.1.2 Komplikationen der Leberzirrhose	2
1.1.3 Portale Hypertension	2
1.1.4 Aszites	4
1.1.5 Bakterielle Translokation und spontan bakterielle Peritonitis	4
1.1.6 Dekompensation und Prognose	5
1.2 Scores zur Prognoseeinschätzung	6
1.2.1 Child-Pugh-Score	6
1.2.2 Model of End Stage Liver Disease (MELD)-Score	7
1.3 Hepatische Enzephalopathie	8
1.3.1 Epidemiologie, klinische Präsentation und Bedeutung	8
1.4 Klassifikation der hepatischen Enzephalopathie	9
1.4.1 Nach Ätiologie und zeitlichem Verlauf	9
1.4.2 West-Haven-Klassifikation	10
1.4.3 Covert und overt hepatische Enzephalopathie	12
1.5 Pathophysiologie der hepatischen Enzephalopathie	12
1.6 Diagnostik der covert hepatischen Enzephalopathie (CHE)	13
1.7 NOD2	14
1.7.1 Pathogen-recognition-Rezeptoren (PRRs)	14
1.7.2 NOD2 und seine Bedeutung für das Immunsystem	15
1.7.3 Aufbau von NOD2	15
1.7.4 Genetische Polymorphismen von NOD2	15
1.8 Studienrationale	17
2. Zielstellung	17
3. Material und Methoden	18

3.1 Patientenkollektiv, Ein- und Ausschlusskriterien	18
3.2 Diagnostik overt hepatische Enzephalopathie (OHE)	18
3.3 Diagnostik covert hepatische Enzephalopathie (CHE)	19
3.3.1 Psychometrischer-Hepatische-Enzephalopathie-Score (PHES)-Test	19
3.3.2 Bestimmung der kritischen Flimmerfrequenz	20
3.3.3 Diagnosestellung der covert hepatischen Enzephalopathie	20
3.4 NOD2-Genotypisierung	21
3.5 Bewertung pathophysiologischer Mechanismen	21
3.6 Statistische Analyse (und Berechnung der Stichprobengröße)	22
4. Ergebnisse	23
4.1 Patientencharakteristika im Gesamtkollektiv	23
4.1.1 Alter und Geschlecht	23
4.1.2 Schweregrad der Leberzirrhose unter Berücksichtigung des MELD-Scores	23
4.1.3 Genese der Leberzirrhose	24
4.1.4 NOD2-Status	25
4.1.5 Weitere klinische und laborchemische Parameter	25
4.1.6 Prävalenz von CHE und OHE	26
4.1.7 Vorbestehende Komplikationen und prophylaktische Medikation	27
4.2 Vergleich der Patientencharakteristika in den NOD2-Subgruppen	27
4.2.1 Alter und Geschlecht in den NOD2-Subgruppen	27
4.2.2 Schweregrad der Leberzirrhose in den NOD2-Subgruppen unter Berücksichtigung des MELD-Scores	28
4.2.3 Genese der Leberzirrhose in den NOD2-Subgruppen	29
4.2.4 Weitere klinische und laborchemische Parameter in den NOD2-Subgruppen	29
4.2.5 Prävalenz von CHE und OHE in den NOD2-Subgruppen	31
4.2.6 Vorbestehende Komplikationen und prophylaktische Medikation in den NOD2-Subgruppen	31

4.3 Assoziationen zwischen NOD2-Risikovarianten und HE unter Berücksichtigung des MELD-Scores	32
4.3.1 Assoziationen zwischen HE und NOD2-Risikovarianten	32
4.3.2 Assoziationen zwischen dem MELD-Score und dem NOD2-Status	32
4.3.3 Assoziation zwischen dem MELD-Score und dem Auftreten von hepatischer Enzephalopathie unter Berücksichtigung verschiedener Definitionen	33
4.4 Assoziation zwischen hepatischer Enzephalopathie und möglichen pathophysiologischen Mechanismen	34
4.5 Assoziation zwischen NOD2-Risikovarianten und möglichen pathophysiologischen Mechanismen	36
5. Diskussion	37
5.1 Patientencharakteristika und Prävalenz	37
5.2 Studienlage zu den vorliegenden Untersuchungsergebnissen	38
5.3 Limitationen	40
5.4 Ausblick	41
6. Zusammenfassung	43
7. Literaturverzeichnis	46
8. Thesen	56

Selbständigkeitserklärung

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases
AIH	Autoimmunhepatitis
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BT	bakterielle Translokation
CARD15	caspase-activation and recruitment Gen 15
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CD14	Cluster of differentiation 14
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CFF	critical (kritische) Flimmerfrequenz
CHE	covert (verdeckte) hepatische Enzephalopathie
CRP	C-reaktives Protein
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
EASL	European Association for the Study of the Liver
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	hepatische Enzephalopathie
hTLR4	humaner Toll-Like Rezeptor 4
HZ	Hertz
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INCA	Impact of NOD2 genotype-guided antibiotic prevention on survival in patients with liver Cirrhosis and Ascites
INR	International Normalized Ratio
IQB	Interquartilbereich
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein

LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucine-rich repeat Domäne
MDP	Muramyldipeptid
MELD	Model of End Stage Liver Disease
MHE	minimal hepatische Enzephalopathie
NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NLR	NOD-like-Rezeptor
NOD2	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2
OHE	overt (offensichtliche) hepatische Enzephalopathie
ÖVB	Ösophagusvarizenblutung
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBC	primär billiäre Cholangitis
PHEs	Psychometrischer Hepatische Enzephalopathie-Score
PRR	Pathogen-recognition-Rezeptor
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
RV	Risikovariante
SBP	spontan bakterielle Peritonitis
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TIPS	transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Leberzirrhose

Die Leberzirrhose ist definiert als die Endstrecke chronisch entzündlicher Erkrankungen der Leber. Ätiologisch können toxische, entzündliche, Stoffwechsel- oder Gefäß-Erkrankungen zugrunde liegen (Häussinger et al., 2018). In Deutschland ist Alkoholabusus mit ca. 55 % für ein Großteil der Erkrankungen ursächlich, gefolgt von den chronischen Virushepatitiden B, C und D mit ca. 40% (Sevastianos und Dourakis, 2016). Aufgrund des vermehrten Konsums kaloriendichter Lebensmittel wird auch die nichtalkoholische Steatohepatitis, kurz NASH, zunehmend relevant. Entzündliche Erkrankungen, wie die Autoimmunhepatitis (AIH) oder begleitende Erkrankungen der Gallenblase, wie die primär biliäre Cholangitis (PBC) oder die primär sklerosierende Cholangitis (PSC), können eine Leberzirrhose zur Folge haben (Krawitt, 1996). Andere Stoffwechselerkrankungen wie Hämochromatose, Morbus Wilson, α 1-Antitrypsin-Mangel oder Mukoviszidose spielen eine untergeordnete Rolle. Kann die Ursache der Leberzirrhose, trotz umfangreicher Untersuchungen nicht geklärt werden, wird dies als kryptogen bezeichnet. Aufgrund besser werdender Diagnostik sinkt der Anteil kryptogener Leberzirrhosen allerdings zunehmend.

Mit steigender Inzidenz auf ca. 250/100.000, vor allem aufgrund des steigenden Alkoholkonsums aber auch der veränderten Ernährungsgewohnheiten, ist die Erkrankung für die westliche Medizin von zunehmender Bedeutung (Sörensen et al. 2003). Vor allem wegen ihres Lebensstils sind Männer im Vergleich zu Frauen doppelt so häufig betroffen.

1.1.1 Auslösende Faktoren

Wie bereits beschrieben sind in Deutschland Alkoholkonsum und Virushepatitiden für einen Großteil aller Leberzirrhosen verantwortlich. Zur besseren Übersicht werden in der folgenden Tabelle die häufigsten Ursachen nochmal kategorisch dargestellt. In den Kategorien werden toxische, entzündliche, stoffwechselbedingte und weitere Ursachen voneinander unterschieden.

Tabelle 1 Häufigste Ursachen der Leberzirrhose

Toxisch	Entzündlich	Stoffwechselbedingt	Weitere Ursachen
Alkohol	Virushepatitiden B, C und D	Hämochromatose	Budd-Chiari-Syndrom
NASH	Autoimmunhepatitis	Morbus Wilson	Cirrhose cardiaque
Medikamente	PBC, PSC	α 1-Antitrypsin-Mangel	Kryptogen

NASH = nichtalkoholische Steatohepatitis; PSC = Primär sklerosierende Cholangitis; PBC = Primär biliäre Cholangitis

1.1.2 Komplikationen der Leberzirrhose

Das Fortschreiten der Erkrankung zieht eine zunehmende Zerstörung der physiologischen Bindegewebs- und Gefäßstruktur der Leber nach sich. Aufgrund entzündlicher Prozesse werden Lebergewebe und Zentralvenen fibrotisch umgebaut und es entstehen sogenannte Regeneratknoten. Folgen des fortschreitenden Umbaus der ursprünglichen Parenchymstruktur durch nicht-funktionales Bindegewebe sind Leberinsuffizienz, portale Hypertension sowie die Ausbildung intrahepatischer Shunts zwischen Portalgefäßen und Lebervenen mit Minderperfusion der Leber. Funktionell führt dies zu Einschränkungen von Blutzirkulation, Entgiftungsfunktion und Syntheseleistung der Leber. Typische Komplikationen, die damit einhergehen, werden im Folgenden gesondert erläutert.

1.1.3 Portale Hypertension

Ein Großteil der Komplikationen einer Leberzirrhose treten als direkte oder indirekte Folge der portalen Hypertension auf. Beim gesunden Menschen ist ein Pfortaderdruck von < 5 mmHg physiologisch. Die portale Hypertension ist definiert als ein Druckanstieg > 10 mmHG. Hierbei ist mit der Ausbildung extrahepatischer Kollateralkreisläufe, sogenannter Varizen zu rechnen (R. Wiest et al., 2000). Mit zunehmendem Druck erhöht sich die Ruptur- und damit Blutungsgefahr der Varizen.

Ätiologisch lassen sich prä- von intra- und posthepatischen Blutabflussbehinderungen unterscheiden. Bei der Leberzirrhose liegt die Abflussbehinderung innerhalb des Organs, also intrahepatisch.

Tabelle 2 Ätiologie der portalen Hypertension

Prähepatisch	<ul style="list-style-type: none">• Pfortaderthrombose• Milzvenenthrombose
Intrahepatisch	<ul style="list-style-type: none">• Leberzirrhose (häufigste Ursache in Europa)• Schistosomiasis (häufigste Ursache weltweit)
Posthepatisch	<ul style="list-style-type: none">• Budd-Chiari-Syndrom• Cirrhose cardiaque• Rechtsherzinsuffizienz

Wendet man das Ohmsche Gesetz auf die Gefäßphysiologie an, lässt sich der Pfortaderdruck P aus dem Produkt des Blutflusses Q in der Portalvene und dem Strömungswiderstand R im Gefäßsystem der Leber berechnen ($\Delta P = Q \times R$) (Reiberger, 2012). Im Verlauf der chronischen Lebererkrankung reduzieren sich die Gesamtgefäßquerschnitte in der Leber und dies führt zu einer intrahepatischen Widerstandserhöhung gegen den portalen Blutfluss. Weiterhin kommt es zum sekundären Anstieg des Blutflusses im Splanchnikusgebiet. Somit sind sowohl die intrahepatische Widerstandserhöhung als auch eine Zunahme des Blutflusses im Splanchnikusgebiet maßgeblich für die Entstehung der portalen Hypertension.

Für die intrahepatische Widerstandserhöhung lassen sich mechanische von dynamischen Ursachen unterscheiden. Zu den mechanischen Veränderungen kommt es aufgrund des chronischen Entzündungsgeschehens und den damit verbundenen irreversiblen Umbauprozessen des Leberparenchyms mit Ausbildung fibrotischer Veränderungen sowie narbiger Regenartknoten.

Für die dynamischen Veränderungen sind ein Überschuss vasokonstriktiver sowie ein Mangel an vasodilatatorischen Mediatoren in den Leberkapillaren verantwortlich. Diese vasoaktiven Substanzen vermitteln über die Aktivierung der Myofibroblasten und des Sympathikotonus die intrahepatische Widerstandserhöhung. Dadurch staut sich das Blut im Pfortadersystem. Sekundär führen die Mediatoren zu einer Gefäßerweiterung im Splanchnikusgebiet (Moller et al., 2011). Die dynamische Widerstandserhöhung ist potenziell reversibel und daher interessant für mögliche pharmakologische Behandlungen (Bosch und Garcia-Pagan, 2000).

Direkte Folgen der portalen Hypertension sind die Entstehung von Aszites und extrahepatischer Umgehungskreisläufe. Letztere führen das Blut an der Leber vorbei, welche somit ihrer Entgiftungsfunktion nicht mehr nachkommen kann. Metabolite wie zum Beispiel Ammoniak akkumulieren im Organismus und können zu Komplikationen

wie hepatische Enzephalopathie und letztlich Leberausfallkoma führen (Riggio et al., 2005). Die Parenchymveränderungen haben eine reduzierte Synthesefunktion der Leber zur Folge. Davon ist auch die Herstellung von Gerinnungsfaktoren betroffen, was insbesondere bei Blutungen von Ösophagusvarizen ein zusätzliches Risiko darstellt (Saner et al., 2013).

1.1.4 Aszites

Unter Aszites versteht man eine pathologische Ansammlung freier Flüssigkeit in der Peritonealhöhle. Bei etwa 75 % aller Patienten ist eine Lebererkrankung ursächlich (Runyon BA, 2009). Ein zunehmender Pfortaderhochdruck hat den Austritt der Flüssigkeit zur Folge. Bauchwasser wird in der Regel als eines der ersten Anzeichen der Dekompensation einer Leberzirrhose bemerkt und macht weitere Diagnostik erforderlich (D'Amico et al., 1986). Betroffene können zusätzlich an ihren Extremitäten sogenannte periphere Ödeme ausbilden, welche auch unter anderem durch einen Eiweißmangel bedingt sein können. Eine gefährliche Komplikation des Aszites ist die spontan bakterielle Peritonitis (SBP).

1.1.5 Bakterielle Translokation und spontan bakterielle Peritonitis

Eine portale Hypertension macht auch eine bakterielle Translokation wahrscheinlicher (Wiest et al., 2000). Damit ist eine übermäßige Verlagerung von Darmbakterien beziehungsweise bakterieller Stoffwechselprodukte insbesondere in die Blutbahn und in die Peritonealhöhle zu verstehen. In diesen Körperregionen können Bakterienbestandteile toxisch wirken und endogene Infektionen auslösen. Bei gesunden Menschen kommt es im geringen Maße ebenfalls zur Übertragung von Darmbakterien, jedoch ohne Infektionen auszubilden.

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED), wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn, werden durch bakterielle Translokation begünstigt (Pommer, 2015). Patienten mit Leberzirrhose haben ebenfalls ein Risiko für vermehrte Bakterienbelastung. Faktoren sind ein Verlust der Barrierefunktion der Darmschleimhaut, eine reduzierte Darmmotilität sowie ein geschwächtes Immunsystem von Patienten. Da Aszites einen optimalen Nährboden für Bakterien darstellt, kann der Übergang von Darmbakterien in das Bauchwasser, zu einer spontan bakteriellen Peritonitis (SBP) führen. Diese Komplikation ist mit einer hohen Sterblichkeit assoziiert. Trotz adäquater Antibiotikabehandlung steigt die Ein-Jahres-Mortalität auf ca. 50 – 70 % (Musskopf et al, 2012). Im Jahr 2010 konnten Appenrodt et al. nachweisen, dass die Entstehung einer SBP häufig mit dem Vorliegen

von NOD2-Risikovarianten assoziiert ist (Appendrodt et al, 2010). Das Gen und seine weitere Bedeutung für Patienten mit Leberzirrhose werden im Verlauf der Arbeit noch besprochen.

1.1.6 Dekompensation und Prognose

Patienten mit Leberzirrhose haben häufig zunächst einen beschwerdearmen Krankheitsverlauf. Dies wird als kompensiertes Stadium bezeichnet und ohne weitere Verschlechterung der Leberfunktion, weisen Betroffene eine mediane Überlebenszeit von über 12 Jahren auf (Zipprich et al. 2012). Ohne Ursachenbewältigung und adäquate Therapie folgt in der Regel das rasche Fortschreiten der Leberinsuffizienz und der portalen Hypertonie. Mit Auftreten von Komplikationen und Folgeerscheinungen kommt es zur Dekompensation der Erkrankung. Klassische Komplikationen, welche den Beginn dieses dekompensierten Stadiums definieren, sind das Auftreten von Aszites, Ikterus, einer Ösophagusvarizenblutung (ÖVB) oder einer hepatischen Enzephalopathie. Der Übergang in dieses Stadium bedeutet eine deutlich Prognoseverschlechterung und die mediane Überlebenszeit reduziert sich auf weniger als 2 Jahre (ebd.). Als lebensverlängernde bzw. kurative Maßnahme sollte immer die Möglichkeit der Listung zur Lebertransplantation erwogen werden.

Erste klinische Auffälligkeiten sind in der Regel die Entstehung von Ikterus sowie Aszites und peripherer Ödeme. Die signifikante portale Hypertension, also ein Druckanstieg über 10 mmHG im Pfortaderkreislauf, kann konsekutiv die Bildung und Blutung von Varizen zur Folge haben. Die mangelnde Bildung von Gerinnungsfaktoren durch die insuffiziente Leber verstärkt die Blutungsgefahr. Eine Malnutrition kann zur damit verbundenen Kachexie führen; und eine hepatische Enzephalopathie letztlich zur weiteren klinischen Verschlechterung welche in ein Leberausfallkoma übergehen kann. Weitere Anzeichen für einen schweren Krankheitsverlauf sind Begleiterkrankungen von Nieren (Hepatorenales Syndrom) und/oder Lunge (Hepatopulmonales Syndrom) sowie Infektionen (zum Beispiel SBP bei Aszites) und Sepsis. Organassoziierte Tumorerkrankungen, wie das Hepatozelluläre Karzinom (HCC), das Cholangiozelluläre Karzinom (CCC) oder das Pankreaskarzinom sollten insbesondere bei Exazerbation eines vorbestehenden Ikterus differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden (D'Amico et al., 2006).

Jepsen et al. fanden in einer Studie von 2010 heraus, dass bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei 76 % aller Betroffenen mindestens eine der drei häufigsten Komplikationen (Aszites, HE, Varizenblutung) und somit eine Dekompensation vorlag.

55 % der Patienten litten an Aszites, 11 % an HE, 5 % an Varizenblutung und 4 % an kombinierten Komplikationen. Den schwerwiegendsten Krankheitsverlauf hatten Patienten, die entweder an einer isolierten HE oder an einer HE in Kombination mit anderen Komplikationen litten. Sie wiesen eine 1-Jahres-Mortalität von 64 % beziehungsweise eine 5-Jahres-Mortalität von 85 % auf (Jepsen et al., 2010).

1.2 Scores zur Prognoseeinschätzung

In den meisten Fällen wird die Verdachtsdiagnose der Leberzirrhose klinisch gestellt und infolgedessen werden weitere Untersuchungen eingeleitet. Für den klinischen Alltag haben sich die nachfolgenden Scores etabliert, um chronische Lebererkrankungen nach Schweregrad einzuteilen und somit eine Prognose abschätzen zu können. In den Einteilungen werden unter anderem die zuvor beschriebenen Komplikationen berücksichtigt.

1.2.1 Child-Pugh-Score

Neben der Einteilung des Schweregrads der Erkrankung ist der Child-Pugh-Score insbesondere zur Vorhersage der Langzeitprognose geeignet. Zur Prädiktion der Kurzzeitmortalität ist er unzureichend (Wittenburg et al., 2011). Der Score berücksichtigt insgesamt 5 Werte (Labor- und klinische Befunde), die auf eine eingeschränkte Leberfunktion hindeuten. Je nach Funktion werden pro Wert 1-3 Punkte vergeben und diese anschließend zusammengezählt. Der Gesamtwert kann also 5-15 Punkte betragen. Anhand der Punktzahl lassen sich drei Erkrankungsstadien unterteilen. Bei 5-6 Punkten spricht man von einer Child A Leberzirrhose, bei 7-9 Punkten von einer Child B und bei 10-15 Punkten von einer Child C (Häussinger et al., 2018).

Tabelle 3 Child-Pugh-Score

Punkte	1	2	3
Albuminkonzentration im Serum in g/dL	>3,5	2,8–3,5	<2,8
Bilirubinkonzentration im Serum in mg/dL	<2,0	2,0–3,0	>3,0
INR	< 1.7	1.7 – 2.3	> 2.3
Aszites (sonographisch)	kein	mäßig	massiv
Hepatische Enzephalopathie	keine	Grad I–II	Grad III–IV

Die Prognose der Leberzirrhose hängt vom Erkrankungsstadium ab. Geringere Punktzahlen sprechen für eine geringere Krankheitsbelastung und somit für eine bessere Prognose. Im kompensierten Stadium, also wenn noch keine klinischen Symptome aufgetreten sind, ist die Lebenserwartung zunächst nahezu unverändert. Mit dem Auftreten von Symptomen kommt es zur Dekompensation und zur deutlichen Verschlechterung. Im Stadium Child A ist die 1-Jahres-Überlebensrate kaum beeinträchtigt, im Stadium Child B liegt diese bei ca. 80% und ab dem Stadium Child C nur noch bei ca. 45% (D'Amico et al., 2006). Nach durchgemachter hepatischer Enzephalopathie lag die 5-Jahres-Mortalität bei 85 % (Jepsen et al., 2010). In der Regel werden Betroffene erst mit dem Auftreten von Komplikationen zur Untersuchung vorstellig. Daher liegt zumeist zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits eine Dekompensation und somit eine schlechte Prognose vor.

1.2.2 Model of End Stage Liver Disease (MELD)-Score

Ein weiterer Score zur Einteilung des Schweregrads chronischer Lebererkrankungen sowie zur Prognoseeinschätzung ist der Model of End Stage Liver Disease (MELD)-Score. Er stammt aus dem Jahr 2001 und ist valide für die Abschätzung der 3-Monats-Mortalität (Kamath et al., 2001). Er wird in vielen europäischen Ländern wie Deutschland sowie den USA, in der hier genannten oder einer leicht abgeänderten Form, zur Priorisierung von Organzuteilungen im Rahmen von Lebertransplantationen verwendet. Abhängig vom Score sollen Patienten mit unmittelbarem Sterberisiko vorrangig erkannt und versorgt werden (Freeman et al., 2002). Zu seiner Berechnung werden die

Laborparameter Serum-Bilirubin, Serum-Kreatinin und INR bestimmt und in folgender Formel eingefügt:

$$\text{MELD-Score} = 10 \times (0,957 \times \ln(\text{Kreatinin})) + 0,378 \times \ln(\text{Bilirubin}) + 1,12 \times \ln(\text{INR}) + 0,643$$

Der minimal einzusetzende Wert aller Variablen beträgt 1. Der maximal einzusetzende Kreatinin-Wert ist 4 mg/dl. Ist in der Woche vor Erhebung des MELD-Scores beim Probanden eine Dialyse durchgeführt worden, wird Kreatinin in der Formel auf seinen Maximalwert 4 mg/dl festgelegt (Bundesärztekammer, 2006). Die errechneten Ergebnisse reichen von mindestens 6 bis zu maximal 40 Punkten. Ein steigender MELD-Score geht mit zunehmender hepatischer Dysfunktion sowie 3-Monatsmortalität einher. Bei einem MELD-Score von 40 entspricht die 3-Monatsmortalität nahezu 100% (Freeman et al., 2002). Aufgrund eines Organspendermangels in Deutschland im Vergleich zu anderen Ländern, haben vorwiegend Patienten mit hohem MELD-Score (> 30) die Chance für eine Organtransplantation.

1.3 Hepatische Enzephalopathie

1.3.1 Epidemiologie, klinische Präsentation und Bedeutung

Eine weitere, häufig auftretende Komplikation der Leberzirrhose ist die hepatische Enzephalopathie (HE). Rund 80 % der Patienten, die aufgrund einer Leberzirrhose im Krankenhaus behandelt werden mussten, entwickelten im Verlauf auch eine hepatische Enzephalopathie. 48 % von ihnen litten unter der verdeckten bzw. coverten Form (CHE), während 36 % der Patienten offenkundige Symptome (OHE) aufwiesen (Labenz et al., 2017). Auf die genaue Unterscheidung zwischen CHE und OHE, sowie auf verschiedene Möglichkeiten der Klassifikation, wird in folgenden Abschnitten noch eingegangen. Das Kontinuum kognitiver Einschränkungen reicht von zunächst wenig auffällig und zunehmender Desorientierung und Verwirrtheit, über deutliche Störungen der Vigilanz mit inadäquatem Verhalten, bis hin zum Leberausfallkoma mit Todesfolge (Weissenborn, 1998). Im Vergleich zu anderen Komplikationen der Leberzirrhose geht die HE mit der höchsten Mortalitätsrate einher. Unbehandelt sterben 45 % der Patienten innerhalb eines Monats. Die Mortalitätsrate liegt nach einem Jahr bei 64 % und nach fünf Jahren bei 85 % (Jepsen et al., 2010). Aufgrund der hohen Prävalenz und prognostischen Bedeutung müssen Risikopatienten auf HE untersucht werden. Zur Verbesserung der Überlebenschancen sollte eine HE frühestmöglich diagnostiziert und therapiert werden. Im Verlauf sind regelmäßige Reevaluationen und gegebenenfalls Therapieanpassungen indiziert. Potenziell gilt die Erkrankung als reversibel. Allerdings

gibt es Daten, die Hinweise für anhaltende kognitive Beeinträchtigungen liefern, auch nachdem die HE abgeklungen ist (Umapathy et al., 2014).

1.4 Klassifikation der hepatischen Enzephalopathie

1.4.1 Nach Ätiologie und zeitlichem Verlauf

Die Ätiologie der HE ist multifaktoriell. Ammoniak entsteht beim Abbau von Proteinen, insbesondere im Darm, und ist aufgrund des neurotoxischen Potenzials von zentraler Bedeutung. Bei Betroffenen von Leberinsuffizienz kann es nicht mehr ausreichend entgiftet werden (Riggio et al., 2005). Es gibt Hinweise dafür, dass Inflammationen die intrazerebrale Ammoniakverteilung weiter negativ beeinflussen (Cichoz-Lach und Michalak, 2013). Neben Ammoniak müssen aber auch noch andere Faktoren für die Entstehung einer HE berücksichtigt werden (Jalan und Rose, 2022). Bakterien und bakterielle Stoffwechselprodukte können Entzündungen und im Verlauf eine HE begünstigen (Odeh et al., 2004). Patienten mit Leberzirrhose zeigten, im Rahmen systemischer Infektionen und SIRS, je nach Schwere des Entzündungsgeschehens, verdeckte bis offenkundige Beeinträchtigungen der Kognition im Sinne von CHE oder OHE (Merli et al., 2013).

Die internationale Arbeitsgruppe zur hepatischen Enzephalopathie klassifiziert die HE anhand der zugrundeliegenden Erkrankung (AASLD/EASL-Leitlinien, 2014). Es werden drei Ursachen unterschieden: Typ A (akutes Leberversagen), Typ B (portosystemischer Shunt ohne Lebererkrankung) und Typ C (Leberzirrhose). Die Ursache Leberzirrhose (Typ C) ist der häufigste Grund für die Manifestation einer HE (Kircheis et al., 2006) und auch Gegenstand dieser Arbeit.

Eine weitere Möglichkeit der Klassifikation berücksichtigt die Frequenz einer OHE im zeitlichen Verlauf. Mit episodisch, rezidivierend und persistierend auftretend werden drei Formen voneinander unterschieden. Im episodischen Verlauf darf der Patient innerhalb von sechs Monaten maximal eine Episode einer OHE haben und muss für den weiteren Zeitraum klinisch unauffällig bleiben. Tritt in den 6 Monaten eine weitere OHE auf, spricht man von einem rezidivierenden Verlauf. Patienten mit persistierender HE leiden fortlaufend an kognitiven Einschränkungen, was sowohl für Privat- als auch Berufsleben belastend ist (Vilstrup et al., 2014).

1.4.2 West-Haven-Klassifikation

Im klinischen Alltag erfolgt die Unterteilung der HE nach dem Schweregrad der Symptome mittels der West-Haven-Klassifikation in 5 Stadien. Betroffene leiden unter Veränderungen des Bewusstseins, der Persönlichkeit sowie der neurologischen Funktionen (Wiltfang et al., 1998). Die Bewusstseinslage reicht von zunehmender mentaler Verlangsamung und Schläfrigkeit bis zu Sopor und Koma. Die mentale Verlangsamung und Konzentrationsschwierigkeiten haben dann häufig Überforderungen und die Veränderungen der Persönlichkeit mit vermehrter Reizbarkeit und Aggressivität zur Folge. Bei Untersuchungen sind sie zu Ort und Zeit zunehmend desorientiert (Weissenborn, 1998). Außerdem weiten sich die neurologischen Störungen auf Bewegungsabläufe aus: Im Stadium I ist die Feinmotorik betroffen. Später kommt es zur Ab- oder Zunahme von Bewegungen mit erhöhtem Muskeltonus (Adams und Foley, 1953).

Tabelle 4 Stadieneinteilung nach den West-Haven-Kriterien

Stadium	Bewusstsein	Neuropsychiatrische Symptome	Neurologische Symptome
0 (MHE)	Unauffällig	Nur mittels psychometrischer Tests nachweisbar	Keine
I	Leichtgradig mentale Verlangsamung und Schläfrigkeit	Eu-/Dysphorie, Reizbarkeit und Angst, Konzentrationsschwäche	Gestörte Feinmotorik und Schreibvermögen, Fingertremor
II	Zunehmende Schläfrigkeit und Verwirrzustände, Apathie/ Lethargie	Beginnende Persönlichkeitsstörung, Desorientierung bzgl. Ort und Zeit	Flapping Tremor, Hypomimie, Bradykinese, Ataxie, Dysarthrie
III	Somnolenz, deutliche Verwirrung	Aggressivität, ausgeprägte Desorientierung bzgl. Ort und Zeit	Asterixis, Rigor, Krämpfe, Korneal- und Sehnenreflexe auslösbar
IV	Koma	-	Hirndruckzeichen, Reflexe erloschen

(modifiziert nach Conn und Bircher, 1993)

Rund 80 % der Patienten, die stationär wegen einer Leberzirrhose behandelt werden müssen, entwickeln auch eine hepatische Enzephalopathie (HE). Davon fallen nur 36 % mit manifesten Symptomen auf (Labenz et al., 2017). In den Stadien 0 und I sind die Einschränkungen der HE verdeckt (Stadium 0) beziehungsweise klinisch kaum auffällig (Stadium I). Aufgrund der geringen Ausprägungen wird das Stadium 0 als minimale HE (MHE) bezeichnet. Ab Stadium II lässt sich die manifest gewordene HE aufgrund der offensichtlichen klinisch-neurologischen Einschränkungen, wie die zunehmende Desorientierung oder der charakteristische Flapping Tremor (Asterixis), leicht ohne weitere Testverfahren als overt hepatische Enzephalopathie (OHE) diagnostizieren.

Bei der covert hepatischen Enzephalopathie (CHE), einschließlich der minimalen hepatischen Enzephalopathie (MHE), fehlen diese augenscheinlichen Symptome hingegen. Trotz des Frühstadiums der Erkrankung weisen Patienten kognitive Funktionseinschränkungen von Konzentration, Gedächtnis und Koordination auf, wodurch bereits ihre Lebensqualität im Alltag leidet (Groeneweg et al., 1998). Zunehmend können sie zu Frustration, Stürzen (Roman et al., 2011) und zur Fahruntüchtigkeit neigen (Schomerus et al. 1981). Eine adäquate Therapie mit entsprechenden Antibiotika und Lactulose kann zur Verbesserung der Darmflora, der kognitiven Funktionen und letztlich der Lebensqualität beitragen (Mulle et al, 2014). Andernfalls ist eine Exazerbation zur OHE wahrscheinlich. Unbehandelt verstarben Patienten, die neben anderen Komplikationen zusätzlich eine HE aufwiesen, mit einer Wahrscheinlichkeit von 45 % innerhalb eines Monats. Nach einem Jahr stieg die Mortalität auf 64 % und nach fünf Jahren auf 85 % (Jepsen et al., 2010). Die CHE sollte also schon frühzeitig mit Hilfe psychometrischer oder neurophysiologischer Tests, wie dem Psychometrischen Hepatische Enzephalopathie-Score (PHES) oder der Analyse der kritischen Flimmerfrequenz (CFF) diagnostiziert werden. Der PHES gilt hierfür als Goldstandard (Weissenborn, 2001). Allerdings wird für die vollständige Durchführung und anschließende Auswertung extra geschultes Personal benötigt. Pro Patienten kann die Untersuchungszeit 45 Minuten in Anspruch nehmen. Die CFF-Analyse ist mit 10 Minuten weniger zeitintensiv und korreliert mit psychometrischen Testergebnissen (Kircheis et al., 2002).

1.4.3 Covert und overt hepatische Enzephalopathie

Die International Society of Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) empfiehlt eine vereinfachte Einordnung für den Schweregrad der hepatischen Enzephalopathie. Entsprechend der Ausprägung soll die HE in covert und overt unterschieden werden. Orientiert an der West-Haven-Klassifikation, werden die minimale HE und Stadium I als verdeckte Form (CHE) und die Stadien II-IV als offensichtliche Form (OHE) zusammengefasst. Eine stricte Abgrenzung der verschiedenen Stadien voneinander sei oft nur schwer möglich. Klinische Auffälligkeiten der OHE, wie die Desorientierung zu Ort und Zeit oder pathognomonische Asterixis, sind hingegen objektiv (Bajaj, et al., 2011).

Die folgende Tabelle bietet nochmal eine Übersicht der vorgestellten Einteilungsmöglichkeiten der HE nach Ätiologie, Schweregrad und Häufigkeit des Auftretens im zeitlichen Verlauf.

Tabelle 5 Einteilung der hepatischen Enzephalopathie

Typ (Ätiologie)	WH-Kriterien	ISHEN-Kriterien	Zeitlicher Verlauf
A (Akutes Leberversagen)	MHE	Verdeckt (covert)	Episodisch
	I		
B (Bypass/ portosystemischer Shunt)	II	Offensichtlich (overt)	Rezidivierend
C (Cirrhosis/ Leberzirrhose)	III IV		Persistierend

WH = West-Haven; ISHEN = International Society of Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism

1.5 Pathophysiologie der hepatischen Enzephalopathie

Aufgrund zunehmender Insuffizienz und Ausbildung portosystemischer Umgehungskreisläufe, kann die Leber portales Blut nicht mehr ausreichend entgiften. Auch transjuguläre intrahepatische portosystemische Shunts (TIPS), die zur Reduktion portaler Hypertonie therapeutisch angelegt werden, leiten Blut aus dem Verdauungstrakt an der Pfortader vorbei. Infolgedessen akkumulieren toxische Metabolite im Organismus und können über die Blut-Hirn-Schranke in das zentrale Nervensystem gelangen. Als Neurotoxine können sie von Astrozyten aufgenommen werden und, aufgrund von Osmose, Gliödeme auslösen. Die Astrozytenanschwellung kann zur Ausbildung eines

Hirnödems beitragen. Entzündliche ZNS-Veränderungen und eine gestörte Astrozytenfunktion sind die Folge und gelten als wesentliche Ursache für die hepatische Enzephalopathie (Friedman und Keeffe, 2011; Hansen, 2013). Potenziell gilt die Erkrankung als reversibel. Allerdings liefern Daten Hinweise für die Persistenz der kognitiven Einschränkungen, auch nachdem die HE abgeklungen ist. Anhaltende Funktionseinschränkungen der Astrozyten gelten als wahrscheinlich (Umapathy et al., 2014).

Die Pathogenese der HE ist multifaktoriell. Ammoniak kommt als wichtigstem neurotoxischen Stoff eine zentrale Bedeutung zu (Jalan und Rose, 2022). Es entsteht beim Abbau von Proteinen insbesondere im Darm. Bei gesunden Menschen gelangen die Abbauprodukte über die Pfortader zur Leber und können letztlich verstoffwechselt und ausgeschieden werden. Gastrointestinale Blutungen bieten ein ideales Nährmedium für ammoniakbildende Bakterien. Eiweißreiche Ernährung und Obstipationen können diesen Prozess verstärken. Auch Infektionen, wie zum Beispiel eine SBP bei Aszites, können einen erhöhten Eiweißstoffwechsel zur Folge haben (Herold et al., 2020).

Manche Betroffene weisen allerdings unauffällige Ammoniakwerte auf oder es besteht kein Zusammenhang zwischen dem Ammoniakspiegel und dem Schweregrad der HE. Andere Neurotoxine, die ebenfalls Gliaschwellungen und zerebrale Entzündungsprozesse auslösen können, sind bakterielle Stoffwechselprodukte (z. B. Mercaptane und Phenole), inflammatorische Zytokine, Tumornekrosefaktoren und Benzodiazepine. Ein gestörter Wasser-Elektrolyt-Haushalt ($\text{Na}\downarrow$, $\text{K}\uparrow$) wirkt sich ebenfalls negativ aus (Häussinger et al., 2002). Jede Verschlechterung der Leberfunktion ist prognostisch ungünstig. Bei Neuauftreten oder Exazerbation einer HE müssen die auslösenden Faktoren gesucht, wenn möglich beseitigt und konsequent behandelt werden.

1.6 Diagnostik der covert hepatischen Enzephalopathie (CHE)

Aufgrund der hohen prognostischen Relevanz sollten bereits milde kognitive Defizite der covert hepatischen Enzephalopathie (CHE) mittels neuropsychometrischer Tests, wie dem Psychometrischen hepatische Enzephalopathie-Score (PHES) oder der Flimmerfrequenz mit Bestimmung der kritischen Flimmerfrequenzanalyse (CFF), erkannt werden (Hassanein et al., 2007). Die Testverfahren weisen sowohl hohe Sensitivität als auch Spezifität auf (Kircheis et al., 2014). Trotz hoher Prävalenz ist von einer hohen Dunkelziffer nicht erkannter Risikopatienten auszugehen, da in der unmittelbaren Patientenversorgung, unter anderem aufgrund knapper Ressourcen, die

notwendigen Tests nicht durchgeführt werden. Sowohl PHES als auch CFF werden in Kapitel 3 (s. 3.3.3, 3.3.4) noch ausführlich beschrieben.

1.7 NOD2

1.7.1 Pathogen-recognition-Rezeptoren (PRRs)

Pathogen-recognition-Rezeptoren (PRRs) sind verschiedene Proteine, die eine bedeutende Rolle für das angeborene Immunsystem spielen. Diese Mustererkennungsrezeptoren sind an Immunzellen gebunden und werden insbesondere von Monozyten (Ogura et al., 2001), dendritischen Zellen (Gutierrez et al., 2002) und intestinalen Epithelzellen (Hampe et al., 2001) produziert. Voneinander unterschieden werden oberflächliche und intrazelluläre PRRs. *Toll-like Rezeptoren* (TLRs) sind membranständige Rezeptoren und NOD-like-Rezeptoren (NLRs) kommen intrazellulär vor. PRRs sind wichtig für die Abwehr von Infektionen (Iwasaki und Medzhitov, 2010). Sie können unterschiedliche Bestandteile potenzieller Erreger, wie Bakterien, Viren, Pilze oder Protozoen erkennen und binden. Nach Bindung durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) erfolgt, über die Aktivierung verschiedener Signalwege, die Immunabwehr (Chen et al., 2009). Die nun folgenden Beispiele für PRRs dienen in Laboruntersuchungen der vorliegenden Studienpopulation unter anderem der Überwachung von bakterieller Translokation und Immunaktivierung.

Der humane Toll-like-Rezeptor 4 (hTLR4) gehört zur *Toll-like*-Rezeptorfamilie und seine Aktivierung führt, über den NF-kappa-B-Signalweg und einer entzündlichen Zytokinproduktion, zu einer Reaktion des angeborenen Immunsystems (Vaure und Liu, 2014).

CD14 (Cluster of Differentiation 14) ist als Mustererkennungsrezeptor vor allem auf Monozyten und Makrophagen zu finden. Im Zusammenspiel mit TLRs dient das Oberflächenprotein als Zielmolekül für das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) von gram-negativen Bakterien. Nach Bindung durch LPS vermittelt der CD14-Rezeptor, über die Ausschüttung von TNF- α und Interleukinen, die Immunreaktion (Rivest et al., 2000).

NOD2 (Nucleotide-binding oligomerization domain 2) gehört zur Gruppe der NOD-like-Rezeptoren (NLRs).

1.7.2 NOD2 und seine Bedeutung für das Immunsystem

Das Protein spielt als intrazellulärer Mustererkennungsrezeptor eine bedeutende Rolle für die Erkennung körperfremder Stoffe (Sabbah et al., 2009). Nach Detektion von Pathogenen erfolgt die Aktivierung proinflammatorischer Signalwege. NOD2 befindet sich im Zytoplasma von Immunzellen und wird primär von Monozyten exprimiert. Es hat besonders hohe Affinität zu Muramyl-dipeptid (MDP), welches sich in Zellwänden der meisten Bakterien befindet, und damit ist es insbesondere für das Binden von Bakterien und bakterieller Stoffwechselprodukte im Magen-Darm-Trakt von Bedeutung (Balasubramanian et al., 2017). Nach Bindung von NOD2 an MDP wird der NF-kappa-B-Signalweg aktiviert (Ogura et al., 2001). In Folge kommt es zur vermehrten Produktion und Transkription von Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und der Interleukine IL-6 und IL-18 (Shawcross et al., 2004). Aufgrund seiner bedeutenden Rolle für die Erkennung und Abwehr von Bakterien, ist es evident, dass Mutationen des NOD2-Gens mit erhöhtem Risiko für verschiedene Krankheiten assoziiert sind. Beispiele hierfür werden im Verlauf des Kapitels noch vorgestellt.

1.7.3 Aufbau von NOD2

NOD2 wird vom caspase-activation and recruitment Gen 15 (CARD15) kodiert und ist beim Menschen auf Chromosom 16 lokalisiert (Hugot et al., 1996). Es wird im gesamten Colon exprimiert. NOD2 ist im Wesentlichen aus drei Domänen aufgebaut.

Die zentrale NOD-Domäne (nuclear oligomerization domain) verbindet das C-terminale Ende und das N-terminale Ende miteinander. Am C-terminalen Ende befindet sich eine Leucine-rich repeat Domäne (LRR). Dieser leucinreiche Bereich kann MDP und somit bakterielle Zellwandbestandteile erkennen und binden (Al Nabhani et al., 2017)

Bei NOD2 sind am N-terminalen Ende zwei caspase-activation and recruitment Domänen (CARDs) lokalisiert. Diese vermitteln nach Interaktion von LRR und MDP die Aktivierung des NF-kappa-B-Signalwegs (Barnich et al., 2005).

1.7.4 Genetische Polymorphismen von NOD2

Genmutationen von CARD15 beziehungsweise von NOD2 stehen im Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen, wie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) (Radford-Smith und Pandeya, 2006), pulmonaler Sarkoidose (Sato et al., 2010) oder dem Blau-Syndrom (Kim et al., 2007). Ferner sind sie für schwere Graft-versus-Host-Reaktionen nach Gewebs- oder Organtransplantationen relevant. Sind sowohl Spender

als auch Empfänger Träger von NOD2-Risikovarianten, addiert sich das Risiko für Abstoßungsreaktionen (Zhao et al., 2015). Betroffene weisen eine veränderte LRR-Domäne auf, die weniger gut MDP erkennt und bindet, sodass die Aktivierung des NF-kappa-B-Signalwegs unzureichend ist. Infolgedessen unterbleibt häufig eine erforderliche Immunaktivierung und antimikrobielle Abwehr (Harputluoglu et al., 2016). Zudem gelten diese NOD2-Varianten als Risiko für eine reduzierte intestinale Schleimhautbarriere (Buhner et al., 2006). Aufgrund der Beeinträchtigungen kann es zu Veränderungen des Mikrobioms und zu einer verstärkten bakteriellen Translokation (BT) aus dem Darm in die Blutbahn kommen (Strober et al., 2014).

In der vorliegenden Studie wurden fünf NOD2-Polymorphismen untersucht (p.R702W, p.G908R, c.3020insC, N289S und c.-958T>C), die in der Normalbevölkerung am häufigsten vertreten sind. Beispielsweise konnten Varianten von p.R702W mit 3,5%, c3020insC mit 2 % und p.G908R 1,5 % nachgewiesen werden (Lek et al., 2016).

Wie bereits beschrieben sind NOD2-Risikovarianten unter anderem mit CED, wie Morbus Crohn, assoziiert (Hugot et al., 2001). Im Vergleich zu den Wildtyp-Allelen, ließen sich bei Betroffenen in Laboruntersuchungen, erhöhte Spiegel von bakteriellen Stoffwechselprodukten und Entzündungsmediatoren als Anzeichen vermehrter BT mit Entzündungsfolge feststellen (Gutierrez et al., 2014).

Übermäßige BT lässt sich auch bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites nachweisen (Benten et al., 2012) und auf dieser Grundlage kann sich die Komplikation einer spontan bakteriellen Peritonitis (SBP) entwickeln (Wiest und Garcia-Tsao, 2005). Ungefähr 30% der Patienten mit Leberzirrhose, die mit Aszites im Krankenhaus behandelt werden müssen, weisen eine SBP auf (Rimola et al., 2000). NOD2-Mutationen stellen ein zusätzliches Risiko für die Entstehung der SBP dar (Bruns et al., 2012). Leberzirrhotiker haben, insbesondere im dekompensierten Stadium, ein erhöhtes Risiko systemische Entzündungen zu entwickeln (Fernández et al., 2012). SBP und andere Infektionen bedeuten eine Verschlechterung der Prognose in Bezug auf die Lebenserwartung (Arvaniti et al. 2010).

Aufgrund der bisher bekannten Daten wird aktuell eine prospektive multizentrische Studie mit dem Titel „Einfluss einer NOD2-Genotyp-gesteuerten Antibiotikaprophylaxe auf das Überleben von Patienten mit Leberzirrhose und Aszites (INCA-Studie)“ durchgeführt. Eine mögliche unmittelbare Assoziation zwischen NOD2-Polymorphismen und hepatischer Enzephalopathie (HE) wurden bisher nicht untersucht. Aufgrund der geschilderten Zusammenhänge liegt die Vermutung nahe, dass die Effekte der NOD2-

Risikovarianten auf das Immunsystem eine vermehrte BT sowie Inflammation und auch das Auftreten von HE begünstigen können.

1.8 Studienrationale

Bakterielle Translokationen (BT) mit Entzündungsfolge spielen eine zentrale Rolle für die Entstehung von Komplikationen bei Patienten mit Leberzirrhose (Bernardi et al., 2015). In der Tat lassen sich bei Betroffenen erhöhte Spiegel von bakteriellen Stoffwechselprodukten und Entzündungsmediatoren feststellen (Gutierrez et al., 2014). Bestimmte NOD2-Varianten sind ein genetischer Risikofaktor für das Auftreten einer spontanen bakteriellen Peritonitis (SBP) (Bruns et al., 2012). Für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie (HE) sind, neben der neurotoxischen Wirkung von Ammoniak, Inflammationen und entzündungsfördernde Zytokine ebenfalls von Bedeutung (Jalan und Rose, 2022). Assoziationen zwischen dem Vorliegen der NOD2-Varianten und HE sind bisher nicht bekannt.

Die Hypothese war, dass bei Patienten mit Leberzirrhose und NOD2-Risikovarianten, im Vergleich zur Wildtyp-Variante, ebenfalls erhöhte Konzentrationen bakterieller Bestandteile sowie Entzündungsmediatoren vorliegen und als Resultat die Prävalenz von HE ebenfalls erhöht ist.

2. Zielstellung

Das primäre Ziel der Studie war die Untersuchung, ob zwischen dem Vorliegen bekannter NOD2-Risikovarianten (p.R702W, p.G908R, c.3020insC, N289S und c.-958T>C) und der Prävalenz der HE (overt und covert HE) signifikante Assoziationen bestehen.

Aufgrund der vermuteten Effekte von NOD2-Polymorphismen auf das Immunsystem und unter Berücksichtigung klassischer pathophysiologischer Mechanismen der HE wurden entsprechende Biomarker gezielt untersucht und zwischen den Subgruppen (NOD2-Risikovarianten vs. Wildtyp) verglichen:

1. Bakterielle Translokation (Ammoniak, Endotoxin und LBP)
2. Inflammationen (Leukozyten, CRP, IL-6, CD14, hTLR4).

3. Material und Methoden

Die Studie wurde als Multicenter-Studie an den Universitätsstandorten Halle, Homburg und Jena durchgeführt und als prospektive Querschnittsstudie im Zeitraum von Juli 2017 bis November 2020 geplant. Eingeschlossen wurden Patienten mit Leberzirrhose unabhängig von der Ätiologie, bei denen Genanalysen auf NOD2-Risikovarianten eine CHE-Testung durchgeführt wurden.

3.1 Patientenkollektiv, Ein- und Ausschlusskriterien

Patienten, die im genannten Untersuchungszeitraum aufgrund einer Leberzirrhose ambulant oder stationär behandelt werden mussten, wurden für die Aufnahme in die Studie in Betracht gezogen. Die Diagnostik der Leberzirrhose erfolgte in Zusammenschau der vorliegenden Untersuchungsbefunde. Hierzu wurden klinische, laborchemische, sonographische und histologische Parameter berücksichtigt. Für die Teilnahme an der Studie mussten die Patienten mindestens 18 Jahre alt sein und eine Einverständniserklärung unterzeichnen. Patienten, die zur Prophylaxe von SBP oder HE mit Antibiotika behandelt wurden, waren zugelassen.

Ausgeschlossen hingegen wurden Patienten, die aufgrund akuter Infektionen im Zeitraum von 14 Tagen vor Untersuchungsbeginn Antibiotika verabreicht bekamen. Weitere Ausschlusskriterien waren andere neurologische Erkrankungen als HE, welche ebenfalls mit kognitiven Beeinträchtigungen einhergehen. Davon betroffen waren zum Beispiel Patienten mit Demenz- und Parkinsonerkrankungen oder anderen nicht-hepatischen Enzephalopathien. Da auch Psychopharmaka kognitive Funktionen beeinflussen können, wurden Patienten mit psychiatrischen Erkrankungen, die mit Antidepressiva, Benzodiazepine oder Neuroleptika behandelt werden mussten, ebenfalls nicht berücksichtigt. Ferner schieden Patienten mit deutlichen Visuseinschränkungen, wie Farbblindheit oder Sehbehinderung, für die CFF-Testung und somit für die Studie aus.

3.2 Diagnostik overt hepatische Enzephalopathie (OHE)

Die Diagnose bzw. der Ausschluss der OHE erfolgte anhand einer ausführlichen klinisch-neurologischen Untersuchung. Hierzu wurde die zeitliche, räumliche und persönliche Orientierung des Patienten erfasst und das Vorhandensein des pathognomonischen Flapping Tremors (Asterixis) überprüft. Einige Patienten mit OHE erhielten zusätzliche Diagnostik.

3.3 Diagnostik covert hepatische Enzephalopathie (CHE)

Aufgrund fehlender diagnostischer Standards werden zur Feststellung von CHE verschiedene Untersuchungsmethoden angewendet. Insbesondere Analysen der CFF (kritische Flimmerfrequenz) und des PHES (Psychometrischer-Hepatische-Enzephalopathie-Score) sind besonders etabliert. Beide Diagnoseverfahren werden im Folgenden gesondert vorgestellt. In der vorliegenden Studienpopulation wurden alle Probanden mit CHE mittels CFF getestet. Eine Subgruppe erhielt zusätzlich eine PHES-Testung.

3.3.1 Psychometrischer-Hepatische-Enzephalopathie-Score (PHES)-Test

Der PHES-Test umfasst 5 psychometrische Verfahren, um covert hepatische Enzephalopathie (CHE) bei Patienten mit Leberzirrhose zu erkennen (Labenz et al., 2019). Für den klinischen Alltag sollen diese gut durchführbar, valide und auch kostengünstig sein. Weissenborn et al. konnten bei Patienten mit HE einen signifikanten Zusammenhang zwischen den PHES Untersuchungsergebnissen und metabolisch bedingten, zerebralen Veränderungen in MRT-Untersuchungen nachweisen (Weissenborn et al., 2007). Die Magnetresonanztomographie ist jedoch ein kostenintensiveres Verfahren und steht zur Diagnostik nicht regelhaft zur Verfügung.

Die Testbatterie des PHES setzt sich aus dem Zahlenverbindungstests A und B, dem "Kreise punktieren"-Test, dem Liniennachfahrentest und dem Zahlensymboltest zusammen. Die Ergebnisskala reicht jeweils von 1 bis -3 bei jedem Einzeltest. Das Gesamtergebnis ergibt sich aus Addition der jeweiligen Einzeltests. Der PHES bietet ebenfalls einen guten prognostischen Vorhersagewert bezüglich des Risikos für die Entstehung einer OHE beziehungsweise für Abschätzung der Mortalität von Patienten mit Leberzirrhose (Weissenborn et al., 2008). Zudem ist das Testverfahren für das Monitoring des Krankheitsverlaufs geeignet. In ihrer Studie konnten Sharma et al. bei einem Großteil der 110 Teilnehmer, unter adäquater Therapie mit Lactulose, im Verlauf signifikant verbesserte Testergebnisse nachweisen (Sharma et al., 2009).

Nach Deutschland wurde das Testverfahren auch in Italien, Indien, Spanien, Korea und Großbritannien eingeführt. Länderabhängig weist eine Gesamtpunktzahl von < -4 bis < -6 auf das Vorliegen einer CHE hin (Weissenborn, 2008). Die Testdurchführung erfolgt durch Fachpersonal und kann pro Patient 45 Minuten in Anspruch nehmen. Individuelle Unterschiede zwischen Patienten, wie z.B. der Bildungsstand, müssen bei Auswertung der Testergebnisse berücksichtigt werden.

3.3.2 Bestimmung der kritischen Flimmerfrequenz

Zur objektiven Bewertung sowie zur Verlaufskontrolle der covert hepatischen Enzephalopathie (CHE) wird die Flimmerfrequenzanalyse zur Bestimmung der kritischen Flimmerfrequenz (CFF) als weiteres sensitives Verfahren eingesetzt (Romero-Gomez et al., 2007). Mittels einer Spezialbrille wird dem Probanden mit so hoher Frequenz Licht präsentiert, dass es ihm zunächst als Dauerlicht erscheint. Sukzessive wird die Frequenz des Lichts so lange reduziert, bis der Proband das Flimmern wahrnehmen kann. Diese Frequenz wird als kritische Flimmerfrequenz bezeichnet und lässt auf die kognitive Funktion des Probanden schließen. Dieses Verfahren hat sich auch bei anderen neurologischen Erkrankungen, wie zum Beispiel Multiple Sklerose (Mason et al., 1982) oder Alzheimer Demenz (Cronin-Golomb et al., 1991), bewährt. Im Kontext der Leberzirrhose und Diagnostik der covert bzw. minimalen hepatischen Enzephalopathie wird in der Regel ein Cut-Off-Wert von 39 Hz verwendet.

Pathologische CFF Werte, bei fehlenden klinisch-neurologischen Symptomen im Sinne einer OHE, sprechen also für das Vorliegen einer CHE. Die Ergebnisse der CFF-Testung stehen im Zusammenhang mit dem Schweregrad des kortikalen Schadens. Größere Abweichungen von der Norm deuten somit auf schwerere kognitive Beeinträchtigungen hin. Die Untersuchungsergebnisse korrelieren mit dem PHES (Kircheis et al., 2002; Sharma et al., 2007). Die Durchführung und Interpretation der Untersuchung bedarf keiner speziellen Ausbildung. Nach kurzer Einweisung können pro Patienten in ca. 10 Minuten 10 Messungen durchgeführt werden. Aus der Summe der Einzelmessungen wird anschließend der Mittelwert errechnet. Aufgrund der Anforderungen ist der CFF für Patienten mit starken Visusbeeinträchtigungen nicht geeignet. Die Testungen in dieser Arbeit wurden mit dem Hepatonorm Analyzer (R&R Medi-Business, Freiburg, Deutschland) durchgeführt.

3.3.3 Diagnosestellung der covert hepatischen Enzephalopathie

Am Universitätsstandort Halle wurden zur Evaluation einer möglichen CHE bei allen Patienten sowohl Analysen von PHES als auch der CFF durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten unter gleichen Bedingungen in derselben Sitzung. Die Reihenfolge der Abläufe, der Untersuchungsraum und das Zeitfenster wurden nicht verändert. Da an den anderen Universitätsstandorten bei manchen Patienten keine PHES-Testungen durchgeführt wurden, wurde als Grundlage für diese Studie die CFF zur Diagnosestellung der CHE verwendet.

3.4 NOD2-Genotypisierung

Aus EDTA-antikoaguliertem Blut wurde unter Anwendung eines membranbasierten Extraktionskits (Qiagen, Hilden, Deutschland) genomische DNA nach Maßgabe des Herstellers isoliert. Die NOD2-Varianten rs2066844 (p.R702W), rs2066845 (p.G908R), rs2066847 (c.3020insC), rs72796367 (c.-958T>C) und rs5743271 (p.N289S) wurden mit Taqman-PCR-basierten allelischen Diskriminierungsassays (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA) genotypisiert. Die verwendeten Assays lauteten wie folgt: p.R702W: C__11717468_20; S.G908R: C__11717466_20; c.-958T>C: C__97921071_10; p.N289S: C__26935007_10. Für c.3020insC wurden die folgenden Primer- und Proben-Sequenzen speziell angefertigt: MGB_F CCAGGTTGTCCAATAACTGCATC; MGB_R CCTTACCAGA-CTTCCAGGATGGT; VIC TGCAGGCCCTTG; FAM CTGCAGGCCCTTG. Nach Einwilligungserklärung der Probanden wurde der NOD2-Status im Rahmen des Prescreenings der randomisierten kontrollierten Studie mit dem Titel „Einfluss einer NOD2-Genotyp-gesteuerten Antibiotikaphylaxe auf das Überleben von Patienten mit Leberzirrhose und Aszites (INCA-Studie)“ bestimmt. Differenziert wurden mögliche NOD2-Risikovarianten und der -Wildtyp (Casper et al., 2015). Die genetischen Untersuchungen erfolgten an der Universität des Saarlandes. Alle Untersucher, die die Genotypisierung durchführten, waren gegenüber den klinischen Daten verblindet.

Für die spätere Analyse wurden alle Patienten bei denen mindestens eine mögliche NOD2-Risikovariante detektiert wurde in die Gruppe „Risikovariante“ gruppiert. Die Patienten mit der Wildtyp-Variante wurden in die Subgruppe „Wildtyp“ eingeteilt.

3.5 Bewertung pathophysiologischer Mechanismen

Bei allen Studienteilnehmern erfolgten standardisierte Laboruntersuchungen mit Erfassung von Routineparameter insbesondere zur Beurteilung der Leber- und Nierenfunktion (siehe Tabelle 7 auf Seite 26). Darüber hinaus wurde als Anzeichen für eine systemische Inflammation die Leukozytenzahl, CRP, IL-6 sowie LBP bestimmt (Tabelle 8 auf Seite 26). Anhand der Parameter (IgG, CD14) wurde die Aktivität des Immunsystems und von bakteriellen Endotoxinen beziehungsweise bakterieller Translokationen (Ammoniak, hTLR4) überwacht. Die Analysen von IL-6 (Human Interleukin 6 ELISA, MyBiosource, San Diego, CA, USA; Katalognummer: MBS772136), IgG-Endotoxin-Antikörper (EndoCab® IgG ELISA, Hycult Biotech, Wayne, PA, USA; Katalognummer : HK504-IGG), LBP (Human LBP ELISA, Hycult Biotech; Katalognummer: HK315-01), sCD14 (ELISA, Hycult Biotech; Katalognummer: HK320-

02) und hTLR4 erfolgten durch externe, spezialisierte Labore. Die ersten vier Parameter wurden an der Universität Jena; hTLR4 wurde an Universität Wien untersucht. Um die Spiegel der TLR4-Liganden zu bestimmen, wurde ein Reporter-Gen-Assay mit TLR4-transfizierten HEK293-Zellen verwendet (InvivoGen, Toulouse, Frankreich). Hierzu wurden die Zellen über einen Zeitraum von 12 Stunden bis zu einer Dichte von 80 % in 20 µl Serum herangezogen. Der Farbumschlag des Mediums, der die Konzentration der Liganden anzeigt, wurde bei 635 nm bestimmt.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der MELD-Score zur Beurteilung des Schweregrads der Leberzirrhose berücksichtigt. Um den Einfluss von NOD2-Risikovarianten besser beurteilen zu können, wurden vor Untersuchungsbeginn vier MELD-Kategorien definiert (gerundet 6-10, 10-20, 20-30 und >30 Punkte). Höhere Scores zeugen von zunehmender hepatischer Dysfunktion und machen das Auftreten klassischer Komplikationen wahrscheinlicher. Die Entstehung und Prävalenz einer CHE wird ebenfalls maßgeblich vom Schweregrad der Leberfunktionsstörung beeinflusst.

3.6 Statistische Analyse (und Berechnung der Stichprobengröße)

Die Erfassung und Analyse der Daten erfolgte mit IBM SPSS Statistics, Version 27. Die Daten werden als Mediane mit Interquartilbereich (IQB) dargestellt. Kategoriale Daten werden als Anteile in Prozent und kontinuierliche Variablen werden mit Medianen und IQB dargestellt. Zur Durchführung wurden nichtparametrische statistische Tests verwendet. Für den Vergleich verschiedener Gruppen wurden ANOVA oder Mann-Whitney-Wilcoxon-Tests angewendet. Die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen kontinuierlichen Variablen erfolgte anhand des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman. Um den möglichen Zusammenhang zwischen einer nachgewiesenen NOD2-Risikovariante und dem Auftreten einer OHE oder CHE zu bewerten, wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Dies geschah unter Berücksichtigung des MELD-Scores. Die Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki und den GCP-Regeln (good clinical practice der Europäischen Union) erhoben. Vor Studienbeginn erfolgte die Genehmigung durch die Ethikkommission (Institutional Review Board) (Halle 2017-85; Homburg: 271/11; Jena 4728-03/16 & 3683-02/3). Zudem mussten alle Teilnehmer vor Aufnahme in die Studie ihre schriftliche Einverständniserklärung erteilen.

4. Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika im Gesamtkollektiv

4.1.1 Alter und Geschlecht

In die Studie wurden in dem Zeitraum von Juli 2017 bis November 2020 insgesamt 172 Patienten eingeschlossen, die die notwendigen Kriterien für die Teilnahme erfüllten. Wie erwartet war der Großteil von ihnen männlichen Geschlechts ($n=121 \triangleq 70\%$). Die Altersspanne der Teilnehmer reichte von 22 bis zu 80 Jahren. Das mediane Alter der Studienpopulation betrug 60 Lebensjahre (IQB 54-66). Die folgende Abbildung zeigt, dass es sich bei der Population in etwa um eine Gauß-Verteilung handelt.

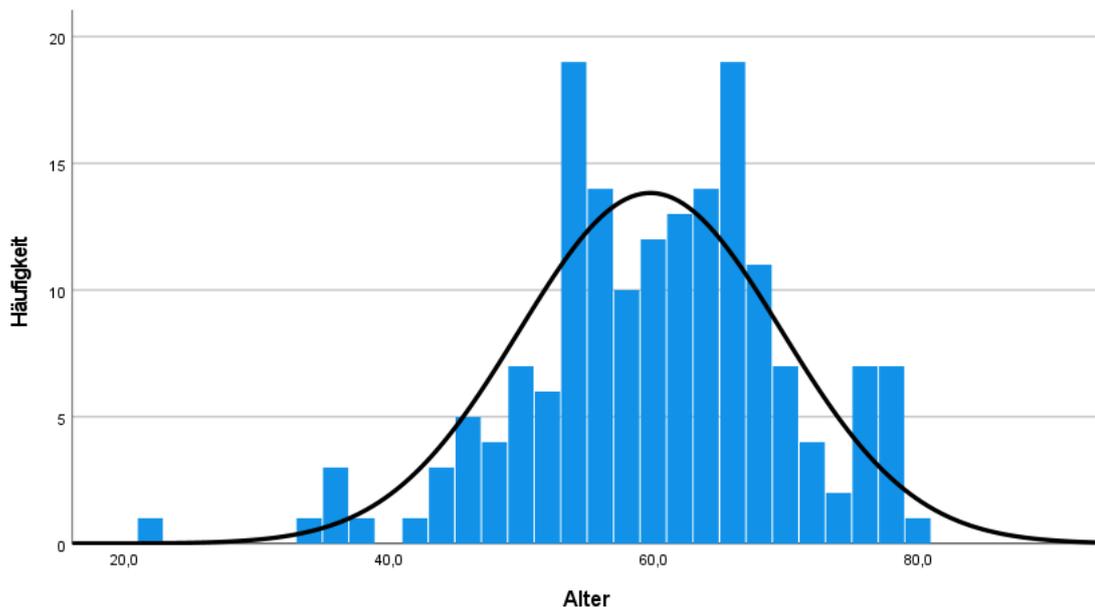


Abbildung 1 Altersverteilung in der Studienpopulation mit Normalverteilungskurve

4.1.2 Schweregrad der Leberzirrhose unter Berücksichtigung des MELD-Scores

Der MELD-Score wurde bei allen Probanden ermittelt und die Studienpopulation bildete alle Schweregrade der Leberzirrhose ab. Die mediane Punktzahl betrug 12 (IQB 9-16) und die Verteilung auf die vordefinierten MELD-Kategorien war folgendermaßen. Patienten mit 10-20 Punkten waren am häufigsten vertreten ($n=89 \triangleq 52\%$), gefolgt von Patienten mit 6-10 Punkten ($n=54 \triangleq 32\%$). Patienten in schwersten Erkrankungsstadien mit 20-30 Punkten ($n=25 \triangleq 15\%$) und > 30 Punkten ($n=3 \triangleq 1,8\%$) waren seltener repräsentiert. Bei den meisten Patienten befand sich die Leberzirrhose bereits im dekompensierten Stadium ($n=148 \triangleq 86\%$), was bedeutet, dass bei ihnen bereits

typische Komplikationen aufgetreten waren. Diese werden in Kapitel 4.1.7 noch gesondert dargestellt.

Tabelle 6 Verteilung der Studienteilnehmer gemäß den MELD-Kategorien n (%)

MELD-Score Median (IQB)	MELD-Kategorien			
	6-10	10-20	20-30	>30
12 (9-16)	54 (32 %)	89 (52 %)	25 (15 %)	3 (1,8 %)

4.1.3 Genese der Leberzirrhose

Wie erwartet, lag bei der Mehrzahl der Patienten eine alkoholassoziierte Leberzirrhose vor ($n=112 \triangleq 65\%$). Andere Erkrankungen waren seltener ursächlich und diese werden nach absteigender Häufigkeit aufgezählt: Virushepatitiden ($n=14 \triangleq 8\%$), NASH ($n=12 \triangleq 7\%$), autoimmun ($n=9 \triangleq 5\%$), PBC & PSC ($n=7 \triangleq 4\%$) und Hämochromatose ($n=4 \triangleq 2\%$). In 14 Fällen ($\triangleq 8\%$) war die Ursache der Leberzirrhose nicht eindeutig zu bestimmen und sie wurde als kryptogen klassifiziert. Das folgende Kreisdiagramm dient zur Veranschaulichung der Daten.

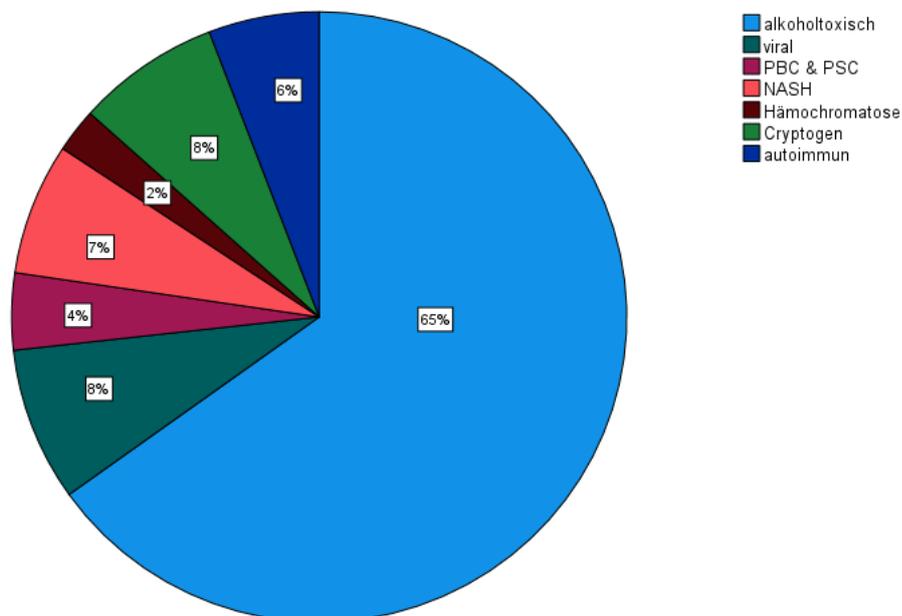


Abbildung 2 Genese der Leberzirrhose in der Studienpopulation

4.1.4 NOD2-Status

Nach Überprüfung des NOD2-Status wies der Großteil der 172 Studienteilnehmer die Wildtyp-Variante auf (n=119), was rund 69 % entspricht. Bei 53 Patienten konnte eine der untersuchten NOD2-Risikovarianten nachgewiesen werden (n=53 \pm 31 %). Mit jeweils 12 % waren die Mutationen p.R702W und c.3020insC am häufigsten vertreten. Die Varianten c.-958T>C, N289S und p.G908R ließen sich seltener nachweisen.

Da das homozygote Vorliegen von NOD2-Risikovarianten selten war (n=6), wurden in der folgenden Analyse homo- und heterozygote Genträger zusammen gruppiert und analysiert.

In der folgenden Grafik sind diese Ergebnisse übersichtlich dargestellt.

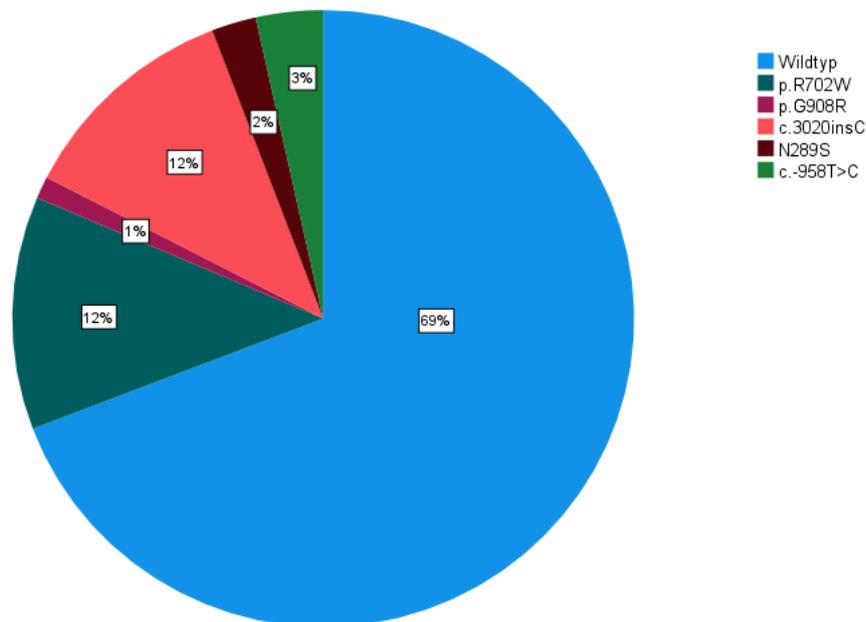


Abbildung 3 NOD2-Status in der Studienpopulation

4.1.5 Weitere klinische und laborchemische Parameter

Vor der CHE-Testung wurde den Probanden zur Labordiagnostik Blut aus peripheren Venen entnommen. In Tabelle 7 sind die medianen Werte aller Probanden mit Interquartilbereich (IQB) für den MELD-Score sowie für das Standardlabor, welches für die Studie erfasst wurde, aufgeführt. Unter anderem wurden mit Bilirubin, Kreatinin und INR die erforderlichen Parameter zur Berechnung des aktuellen MELD-Scores bestimmt. Der mediane MELD-Score betrug 12 (IQR 9-16). Die Studiendaten ergaben,

dass zum Untersuchungszeitpunkt bei den meisten Patienten die Erkrankung bereits dekompensiert vorlag (n = 148 $\hat{=}$ 86 %).

Tabelle 8 gibt Auskunft über die medianen Werte von Ammoniak sowie von Markern für Inflammation in der gesamten Studienpopulation. Hierfür wurden die Werte von bakteriellen Endotoxinen und Immunaktivierung berücksichtigt.

Tabelle 7 Mediane mit IQB von MELD-Score und Standardlabor

MELD	Hämoglobin (mmol/l)	THRO (Gpt/l)	INR	PTT (sec)	Bilirubin (μ mol/l)	Albumin (g/dl)
12 (9-16)	7,3 (5,9-8,3)	118 (82-175)	1,3 (1,1-1,5)	33 (29-37)	22 (14-44)	33 (29-39)
AST (μ kat/l)	ALT (μ kat/l)	GGT (μ kat/l)	AP (μ kat/l)	Natrium (mmol/l)	Kalium (mmol/l)	Kreatinin (μ mol/l)
0,58 (0,73-1,19)	0,48 (0,34-0,7)	2,1 (1,1-4,2)	1,5 (1-2,1)	138 (135-141)	4,1 (3,9-4,4)	84 (66-117)

Tabelle 8 Mediane mit IQB von Ammoniak und Marker für Inflammation

Ammoniak (μ mol/l)	Leukozyten (gpt/l)	CRP (mg/l)	IL-6 (pg/ml)	LBP (ng/ml)	IgG (gmu/ml)	CD14 (ng/ml)	hTLR4 (od)
44 (33-60)	6,0 (4,4-8,0)	8,9 (3-8,3)	18,2 (10,7-55,9)	17106 (12223-23260)	141 (81-240)	2648 (2308-3089)	0,55 (0,34-0,9)

4.1.6 Prävalenz von CHE und OHE

In der gesamten Studienpopulation lag die mediane CFF bei 44 Hz (IQB 39-51) und die mediane Gesamtpunktzahl des PHES bei -4 (IQB -9-0). 19 Studienteilnehmer ($\hat{=}$ 11 %) wiesen zum Untersuchungszeitpunkt eine OHE auf und bei 45 weiteren Probanden ($\hat{=}$ 26 %) war eine solche in der Vorgeschichte mindestens schon einmal aufgetreten. Bemerkenswerterweise variierte die Prävalenz der CHE deutlich in Abhängigkeit vom verwendeten Test: CFF n = 44/165 (27 %) vs. PHES n = 63/136 (46 %).

4.1.7 Vorbestehende Komplikationen und prophylaktische Medikation

Als häufigste Komplikationen der portalen Hypertonie konnten Aszites (n=125 \pm rund 73 %) und Ösophagusvarizen nachgewiesen werden (n=120 \pm 71 %). Bei 35 Patienten war es in der Vorgeschichte bereits zu Varizenblutungen gekommen (20 %).

Bereits vor Studienbeginn wurden viele Patienten aufgrund ihrer Leberzirrhose prophylaktisch behandelt. Betablocker wurden zur Behandlung der portalen Hypertonie am häufigsten verwendet (n=100 \pm 58 %). Um Ammoniak zu reduzieren, wurden zur Stuhlregulation Lactulose (n=92 \pm 54 %) sowie Antibiotika eingesetzt (n=34 \pm 20 %). Bei 24 Patienten war aufgrund von rezidivierendem Aszites oder Ösophagusvarizenblutungen ein transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt (TIPS) angelegt worden (\pm 14%).

Tabelle 9 Komplikationen und Prophylaxe bei Leberzirrhose n (%)

Varizen	Z.n. ÖVB	Aszites	TIPS	Lactulose	Prophylaktische Antibiotika	Betablocker
120 (71 %)	35 (20 %)	125 (73 %)	24 (14 %)	92 (54 %)	34 (20 %)	100 (58 %)

4.2 Vergleich der Patientencharakteristika in den NOD2-Subgruppen

4.2.1 Alter und Geschlecht in den NOD2-Subgruppen

Nach Überprüfung des NOD2-Status ließen sich zwei Subgruppen (Wildtyp und Risikovarianten) voneinander unterscheiden, auf die sich in diesem Kapitel bezogen wird. Alle Patienten bei denen mindestens eine NOD2-Risikovariante detektiert wurde, wurden in die Gruppe „Risikovariante“ gruppiert. Die Patienten mit der Wildtyp-Variante wurden in die Subgruppe „Wildtyp“ eingeteilt. Das mediane Alter war in beiden Vergleichsgruppen mit 60 Jahren (IQB 53 - 66) beziehungsweise mit 62 Jahren (IQB 54-66) ähnlich und lieferte keinen Hinweis für eine frühzeitigere Erkrankung von Patienten mit NOD2-Risikovarianten. Männlichen Geschlechts waren in der Gruppe mit der Wildtyp-Variante 70 % (n = 83/119) und in der Gruppe mit NOD2-Risikovarianten 72 % (n = 38/53). Zwischen den Vergleichsgruppen ergaben sich weder für das mediane Alter (p = 0.354) noch für das Geschlecht (p = 0.796) statistisch signifikante Unterschiede.

Tabelle 10 Alter und Geschlecht in den NOD2-Subgruppen

	Wildtyp-Variante	Risikovarianten	p-Wert
Altersmedian (IQB)	60 (53-66)	62 (54-66)	0.354
Geschlecht n (%)			0.796
- Männlich	83 (70 %)	38 (72 %)	
- Weiblich	38 (30 %)	15 (28 %)	

4.2.2 Schweregrad der Leberzirrhose in den NOD2-Subgruppen unter Berücksichtigung des MELD-Scores

In der Wildtyp-Gruppe (WT) waren alle vordefinierten MELD-Kategorien vertreten. Es nahmen insgesamt nur 3 Patienten mit schwersten Erkrankungsstadium und einem MELD-Score > 30 Punkte an der Studie teil. In der Risikovarianten-Gruppe (RV) waren sie nicht vertreten (WT = 3 vs. RV = 0). In beiden Subgruppen waren Patienten mit 10-20 Punkten am häufigsten vertreten (WT = 50 % vs. RV = 57 %), gefolgt von Patienten mit 6-10 Punkten (WT = 33 % vs. 28 %). Auch die Verteilung von Patienten mit einem Score von 20-30 fiel ähnlich aus (WT = 14 % vs. RV = 15 %). Zum Untersuchungszeitpunkt lag bei einem Großteil der Patienten (n = 148 \triangleq 86 %) die Leberzirrhose bereits im dekompensierten Stadium vor. Ein statistischer Zusammenhang zwischen dem MELD-Score und dem Vorliegen von NOD2-Risikovarianten konnte nicht beobachtet werden (p = 0.588).

Tabelle 11 Schweregrad der Leberzirrhose in den NOD2-Subgruppen

	NOD2-Wildtyp	NOD2-Risikovarianten	p-Wert
MELD-Score Median (IQB)	12 (9-16)	13 (10-16)	0.748
MELD-Kategorien			0.588
- 6-10	39 (33 %)	15 (28 %)	
- 10-20	59 (50 %)	30 (57 %)	
- 20-30	17 (14 %)	8 (15 %)	
- >30	3 (1,8%)	0	

4.2.3 Genese der Leberzirrhose in den NOD2-Subgruppen

In beiden Vergleichsgruppen war Alkoholabusus ähnlich häufig für die Entstehung der Leberzirrhose ursächlich (WT: 66 % vs. RV: 63 %). Auch die anderen Ursachen, die seltener für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich waren, zeigten sich gleichmäßig verteilt. Die statistische Analyse lieferte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Ätiologie zwischen beiden Gruppen ($p = 0.327$).

Tabelle 12 Genese der Leberzirrhose in den NOD2-Subgruppen

Genese d. Leberzirrhose	NOD2-Wildtyp	NOD2-Risikovarianten	p-Wert
- Äthyltoxisch	79 (66 %)	33 (63 %)	0.327
- Viral	9 (8 %)	5 (9 %)	
- NASH	7 (6 %)	5 (9 %)	
- Autoimmun	9 (8 %)	0	
- PBC + PSC	3 (2 %)	4 (8 %)	
- Hämochromatose	3 (2 %)	1 (2 %)	
- Kryptogen	9 (8 %)	5 (9 %)	

4.2.4 Weitere klinische und laborchemische Parameter in den NOD2-Subgruppen

In diesem Abschnitt wurden die Laborwerte in den NOD2-Subgruppen miteinander verglichen. Die Analyse umfasste neben zahlreichen anderen Werten, unter anderem die Spiegel von Ammoniak sowie weiterer Parameter, die auf ein Entzündungsgeschehen hindeuteten. In den gesamten Basischarakteristika zeigten sich, mit Ausnahme des Kaliumwertes ($p = 0.047$), der fett hervorgehoben wurde, keine statistisch signifikanten Unterschiede. Eine detaillierte Auflistung mit Medianen, Interquartilbereichen und p-Werten ist in Tabelle 13 ersichtlich.

Tabelle 13 Vergleich der Laborparameter in den NOD2-Subgruppen

	NOD2-Wildtyp	NOD2-Risikovarianten	p-Wert
Hämoglobin (mmol/l)	7,3 (5,9-8,4)	7,3 (6,0-8,3)	0,902
Thrombozyten (gpt/l)	126 (85-185)	101 (75-155)	0,144
INR	1,30 (1,17-1,50)	1,30 (1,12-1,51)	0,427
PTT (sec)	33 (30-37)	34 (29-39)	0,990
Bilirubin (µmol/l)	22,1 (13,5-44,4)	24,0 (15,7-46,7)	0,500
Albumin (g/dl)	33 (29-39)	33 (29-39)	0,992
AST (µkat/l)	0,72 (0,55-1,19)	0,73 (0,60-1,18)	0,565
ALT (µkat/l)	0,45 (0,34-0,67)	0,50 (0,33-0,72)	0,837
GGT (µkat/l)	2,1 (1,1-4,2)	2,1 (1,1-4,5)	0,962
AP (µkat/l)	2,0 (1,5-3,0)	2,3 (1,6-3,4)	0,265
Natrium (mmol/l)	139 (135-141)	138 (135-142)	0,992
Kalium (mmol/l)	4,1 (3,9-4,4)	4,3 (3,9-4,7)	0,047
Kreatinin (µmol/l)	80 (66-115)	88 (65-123)	0,434
Ammoniak (µmol/l)	44 (34-61)	42 (30-59)	0,461
Leukozyten (gpt/l)	6,4 (4,40-8,40)	5,6 (4,4-7,0)	0,299
CRP (mg/l)	8,7 (2,7-18,1)	9,7 (3,7-18,5)	0,772
IL-6 (pg/ml)	18,2 (10,6-67,2)	18,3 (10,9-33,8)	0,249
LBP (ng/ml)	17053 (12528-21398)	17183 (11858-24794)	0,683
IgG (gmu/ml)	130,3 (80,9-212,9)	147,4 (82,5-319,3)	0,560
CD14 (ng/ml)	2626 (2308-3073)	2724 (2229-3100)	0,576
hTLR4 (od)	0,545 (0,370-0,918)	0,537 (0,325-0,830)	0,918

4.2.5 Prävalenz von CHE und OHE in den NOD2-Subgruppen

Das Verhältnis von Nicht-HE zu HE war unabhängig von der Untersuchungsmethode bei Patienten sowohl mit Wildtyp-Allelen als auch mit NOD2-Risikovarianten sehr ähnlich. Es konnte statistisch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer hepatischen Enzephalopathie und dem Vorliegen oder Fehlen von NOD2-Risikovarianten festgestellt werden.

Tabelle 14 Prävalenz von CHE und OHE in den NOD2-Subgruppen

	NOD2-Wildtyp	NOD2-Risikovarianten	p-Wert
Akute OHE n (%)	13 (11%)	6 (11%)	0,939
CFF in Hz (IQB)	43 (39-51)	44 (39-52)	0,917
PHES (IQB)	-4 (-10- 0)	-3 (-8- 0)	0,280
Abgelaufene OHE n (%)	31 (26%)	14 (26%)	0,984
CHE laut CFF n (%)	32 (27%)	12 (26%)	0,917
CHE laut PHES n (%)	46 (49%)	17 (40%)	0,280

4.2.6 Vorbestehende Komplikationen und prophylaktische Medikation in den NOD2-Subgruppen

In den Subgruppen wurden Patienten verglichen, die bereits vor Studienaufnahme Komplikationen aufwiesen und/oder prophylaktische Behandlungen erhalten hatten. Mit Ausnahme von Ösophagusvarizenblutungen, zu denen es in der der Vorgeschichte mancher Studienteilnehmer gekommen war, ließen sich andere Komplikationen betreffend keine signifikanten Unterschiede feststellen. Auch bei Patienten, die aufgrund ihrer Erkrankung bereits vorbehandelt waren, verhielt es sich unabhängig von Wildtyp- oder NOD2-Risikovarianten, ähnlich.

Tabelle 15 Komplikationen und Prophylaxe in den NOD2-Subgruppen

	NOD2-Wildtyp	NOD2-Risikovarianten	p-Wert
Ösophagusvarizen n (%)	85 (71%)	35 (66%)	0,381
Abgelaufene Varizenblutung n (%)	20 (17%)	15 (28%)	0,084
Aszites n (%)			0,811
- Kein	34 (29%)	13 (25%)	
- Diuretisch eingestellt	44 (37%)	22 (42%)	
- Therapierefraktär	41 (34%)	18 (34%)	
TIPS n (%)	16 (13%)	8 (15%)	0,773
Lactulose n (%)	66 (55%)	27 (51%)	0,704
Antibiotika n (%)	22 (18%)	12 (23%)	0,301
Betablocker n (%)	69 (58%)	31 (58%)	0,950

4.3 Assoziationen zwischen NOD2-Risikovarianten und HE unter Berücksichtigung des MELD-Scores

4.3.1 Assoziationen zwischen HE und NOD2-Risikovarianten

Da die meisten Studienteilnehmer eine Analyse der kritischen Flimmerfrequenz erhielten, wurde diese zur Beurteilung des Verhältnisses HE/Nicht-HE bei Patienten mit NOD2-Risikovarianten gegenüber dem Wildtyp berücksichtigt. Der Vergleich der beiden Subgruppen erbrachte keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Tabelle 16 Assoziationen zwischen HE und NOD2-Risikovarianten gemäß CFF

NOD2-Status	Gesamt	Keine HE	CHE + OHE gemäß CFF	p-Wert
Wildtyp n (%)	119 (69 %)	81 (68 %)	38 (32 %)	p=0,634
Risikovarianten n (%)	53 (31 %)	38 (72 %)	15 (28 %)	

4.3.2 Assoziationen zwischen dem MELD-Score und dem NOD2-Status

Unter Berücksichtigung des prozentualen Anteils der Subgruppen am gesamten Patientenkollektiv, erbrachte der Vergleich der vordefinierten Kategorien des MELD-Scores keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Tabelle 17 Assoziationen zwischen dem MELD-Score und dem NOD2-Status

MELD-Score	Gesamt	NOD2-WT	NOD2-RV	p-Wert
6-10	54	39 (72 %)	15 (28 %)	p=0,588
10-20	89	59 (66 %)	30 (34 %)	
20-30	25	17 (68 %)	8 (32 %)	
>30	3	3 (100 %)	0	

4.3.3 Assoziation zwischen dem MELD-Score und dem Auftreten von hepatischer Enzephalopathie unter Berücksichtigung verschiedener Definitionen

Da bei den meisten Studienteilnehmern eine Analyse der kritischen Flimmerfrequenz erfolgte, wurde diese zur Diagnostik der hepatischen Enzephalopathie berücksichtigt. Wie erwartet waren höhere MELD-Scores mit häufigerem Auftreten von HE (CHE + OHE, OHE, CHE) assoziiert.

Tabelle 18 Assoziationen zwischen MELD-Score und HE (OHE + CHE, OHE, CHE)

MELD-Score Kategorien	Keine HE	OHE + CHE gemäß CFF	Total	p-Wert
6-10	45 (83%)	9 (17%)	54	0,001
10-20	59 (66%)	30 (34%)	89	
20-30	13 (52%)	12 (48%)	25	
>= 30	1 (33%)	2 (67%)	3	
	Keine HE	OHE gesondert		
6-10	51 (94%)	3 (6%)	54	0,027
10-20	79 (89%)	10 (11%)	89	
20-30	20 (80%)	5 (20%)	25	
>= 30	2 (67%)	1 (33%)	3	
	Keine HE	CHE gesondert gemäß CFF		
6-10	44 (86%)	7 (14%)	51	0,003
10-20	60 (71%)	25 (29%)	85	
20-30	15 (60%)	10 (40%)	25	
>= 30	1 (33%)	2 (67%)	3	

4.4 Assoziation zwischen hepatischer Enzephalopathie und möglichen pathophysiologischen Mechanismen

In der folgenden Tabelle wurden die Basischarakteristika der Studienteilnehmer mit diagnostizierter HE mit denen ohne kognitive Auffälligkeiten verglichen. Zur besseren Übersicht wurden signifikante Unterschiede durch Fettdruck hervorgehoben. Erwartungsgemäß war die Leberinsuffizienz bei Betroffenen von HE weiter fortgeschritten. Als Anzeichen fielen die MELD-Scores prognostisch ungünstiger aus. Zudem waren die Parameter von Ammoniak, Bilirubin und INR erhöht. Bemerkenswerterweise war Hämoglobin im Vergleich erniedrigt. Die Serumkonzentrationen von Albumin und Natrium waren ebenfalls reduziert. Mit Ausnahme des Hämoglobins, fielen alle weiteren Parameter, die ebenfalls mit dem Auftreten von HE assoziiert sind (Albumin, Ammoniak, CRP, Natrium und CD14), erwartungskonform aus. Erhöhte Spiegel von CRP und CD14 lieferten Hinweise für vermehrte Entzündungsreaktionen. Bei Leukozyten, IL-6, LBP, Endotoxin oder hTLR4 konnten dagegen keine relevanten Unterschiede festgestellt werden. Um unabhängige Variablen zu identifizieren, die mit dem Auftreten von HE im Zusammenhang stehen (OHE und CHE, identifiziert durch CFF), wurde eine multivariate Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Serumspiegel von Ammoniak [RR 1,025 (1,007-1,043)] und CD14 [RR 1,001 (1,000-1,002)] unabhängig voneinander mit HE assoziiert. Anhand der Analyse ließen sich keine eindeutigen Wechselwirkungen zwischen Ammoniak und CD14 feststellen.

Tabelle 19 Vergleich der Patienten mit und ohne HE (OHE + CHE gemäß CFF)

	Keine HE	HE (OHE + CHE gemäß CFF)	p-Wert
Männer n (%)	87 (73%)	34 (64%)	0,235
Alter median (IQR)	62 (54-66)	58 (53-65)	0,432
MELD-Score median (IQR)	11 (9-15)	15 (11-20)	0,001
Abgelaufene OHE n (%)	27 (23%)	18 (34%)	0,128
Ösophagusvarizen n (%)	88 (75%)	32 (62%)	0,086
Z.n. OVB n (%)	29 (24%)	6 (11%)	0,05
Aszites n (%)	88 (74%)	37 (70%)	0,541
Abx Prophylaxe n (%)	17 (14%)	18 (34%)	0,019
Hb (mmol/L) median (IQR)	7,4 (6,1-8,5)	6,5 (5,6-7,9)	0,025
INR median (IQR)	1,26 (1,13-1,47)	1,36 (1,21-1,56)	0,019
Bilirubin (µmol/l) median (IQR)	21,0 (13,3-34,1)	28,6 (16,6-67,5)	0,009
Albumin (g/dL) median (IQR)	34 (29-40)	31 (26-36)	0,003
AST (µkat/l) median (IQR)	0,70 (0,55-1,09)	0,80 (0,60-1,57)	0,040
ALT (µkat/l) median (IQR)	0,45 (0,32-0,68)	0,52 (0,38-0,75)	0,202
GGT (µkat/l) median (IQR)	2,10 (1,10-3,81)	2,05 (1,07-5,33)	0,594
AP (µkat/l) median (IQR)	2,00 (1,49-3,01)	2,12 (1,76-3,12)	0,185
Ammoniak (umol/L) median (IQR)	40,3 (30,7-57,3)	53,1 (33,8-73,5)	0,038
Kreatinin (µmol/l) median (IQR)	86 (66-114)	80 (65-138)	0,788
CRP (mg/l) median (IQR)	7,2 (2,7-16,7)	12,6 (4,5-29,7)	0,010
IL-6 (pg/ml) median (IQR)	18,0 (9,8-60,9)	21,8 (11,6-45,7)	0,561
LBP (ng/ml) median (IQR)	16345 (12120-22415)	18642 (12743 – 24152)	0,331
IgG Ab Endotoxin (GMU/ml) median (IQR)	142,1 (80,5-235,3)	128,1 (84,8-274,6)	0,778
sCD14 (ng/ml) median (IQR)	2592 (2275 - 3033)	2755 (2410-3456)	0,025
hTLR4 (OD) median (IQR)	0,518 (0,340-0,915)	0,572 (0,366-0,854)	0,331

4.5 Assoziation zwischen NOD2-Risikovarianten und möglichen pathophysiologischen Mechanismen

Da in der Studienpopulation nur sechs homozygote Träger von NOD2-Risikovarianten vertreten waren, wurden diese mit den heterozygoten Trägern dieser Polymorphismen in einer Gruppe zusammengefasst. Die Basischarakteristika und Laborwerte dieser Gruppe und der Kontrollgruppe, in der alle Patienten mit Wildtyp-Allelen aufgeführt waren, wurden miteinander verglichen. Außerdem wurden der Schweregrad sowie typische Komplikationen der Leberzirrhose berücksichtigt. In beiden Subgruppen konnte weder für die Basischarakteristika noch für die Erkrankungsstadien oder Komplikationen signifikante Unterschiede festgestellt werden. Das gleiche Ergebnis erbrachte der Vergleich von Entzündungsmediatoren wie Leukozyten, CRP und IL-6. Zur Überprüfung möglicher Unterschiede bei bakterieller Translokation oder der Immunantwort wurden entsprechende Biomarker verglichen. Die Resultate von Endotoxin oder LBP als Zeichen von BT und von CD14 oder hTLR4 als Zeichen der Immunantwort fielen ebenfalls unauffällig aus. Die verglichenen Parameter sind ab Kapitel 4.2 ff. tabellarisch gegenübergestellt und einsehbar.

5. Diskussion

5.1 Patientencharakteristika und Prävalenz

Die hepatische Enzephalopathie (HE) stellt für Patienten mit Leberzirrhose eine relevante Erkrankung mit prognostischer Bedeutung dar. Insbesondere die verdeckte Form (CHE) ist herausfordernd und für Betroffene eine bedeutsame Komplikation. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kollektiv von 172 Patienten mit Leberzirrhose an den Universitätsstandorten Halle, Homburg und Jena im Zeitraum von Juli 2017 bis November 2020 untersucht.

Die zentrale Forschungsfrage war, ob NOD2-Risikovarianten (RV) gegenüber dem Wildtyp (WT) vermehrt mit dem Auftreten sowohl von coverter (CHE) als auch overter hepatischer Enzephalopathie (OHE) assoziiert sind.

Des Weiteren wurden unter Berücksichtigung klassischer pathophysiologischer Mechanismen der HE gezielt Biomarker zur Inflammation und bakterieller Translokation erfasst und Assoziationen zu den Subgruppen (NOD2-Risikovarianten vs. Wildtyp) untersucht.

Der Forschungsfrage lag die Hypothese zugrunde, dass NOD2-Risikovarianten vermehrt mit bakterieller Translokation sowie systemischen Entzündungen und konsekutiv mit erhöhter Prävalenz von HE einhergehen.

Die Forschungsergebnisse zeigten, dass die Leberzirrhose der meisten Studienteilnehmer bereits dekompensiert war ($n = 148 \triangleq 86 \%$). Erwartungsgemäß war bei Betroffenen von HE das Stadium der Leberinsuffizienz weiter fortgeschritten. Dies zeigte sich in prognostisch schlechteren MELD-Scores und laborchemischen Untersuchungen mit vergleichsweise reduziertem Albumin sowie Natrium. Passend dazu waren bei Betroffenen die Werte von Ammoniak, Bilirubin und INR erhöht.

Die Studienhypothese konnte allerdings nicht bestätigt werden. Stattdessen zeigten die Untersuchungsergebnisse, dass sich die Prävalenz sowohl von der CHE als auch von der OHE unabhängig vom Nachweis von NOD2-Mutationen verhielt. Auch hinsichtlich des Auftretens von OHE in der Vorgeschichte von Patienten war der NOD2-Status nicht ausschlaggebend. Alle Ergebnisse waren unabhängig davon welche Untersuchung zur Diagnostik der hepatischen Enzephalopathie angewendet wurde (CFF oder PHES). Da das Durchschnittsalter von Probanden mit Wildtyp-Allelen sogar etwas niedriger war (WT: 60 Lebensjahre vs. RV: 62 Lebensjahre), ergaben sich keine Hinweise dafür, dass Patienten mit NOD2-Risikovarianten frühzeitiger an Leberzirrhose erkranken ($p = 0.354$).

In Übereinstimmung dazu konnten in den NOD2-Vergleichsgruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Anhalts für eine bakterielle Translokation oder eine systemische Entzündung festgestellt werden.

Des Weiteren wurden weitere Komplikationen der Leberzirrhose in Abhängigkeit vom NOD2-Status untersucht. Generell zeigten die Analysen, dass es mit Exazerbation der Erkrankung auch zum vermehrten Auftreten von Komplikationen kam. Interessanterweise, war der NOD2-Status weder für Aszites ($p = 0.811$), noch für Ösophagusvarizen ($p = 0.381$) oder -blutungen ($p = 0.084$) relevant. Um den Krankheitsverlauf der Studienteilnehmer besser beurteilen zu können, wurden zudem prophylaktische Therapien berücksichtigt, die Probanden bereits vor Studienbeginn zur Behandlung erhielten. Hierzu wurde die Prävalenz von Antibiotika ($p = 0.301$), Betablocker ($p = 0.950$), Lactulose ($p = 0.704$) sowie TIPS ($p = 0.773$) in den Subgruppen verglichen und auch diese Ergebnisse waren unauffällig.

Schlussendlich wurden, unabhängig vom NOD2-Status, die Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von bakterieller Translokation und systemischen Entzündungen sowie dem Nachweis von hepatischer Enzephalopathie untersucht. Als Zeichen vermehrter Aktivität von BT und Inflammation wiesen Patienten mit HE vergleichsweise erhöhte Parameter von CRP und CD14 auf. Weitere Biomarker, die ebenfalls auf eine vermehrte Immunaktivität (Leukozyten, IL-6, hTLR4) oder bakterielle Translokation (Endotoxin, LBP) hindeuteten, waren hingegen unauffällig.

5.2 Studienlage zu den vorliegenden Untersuchungsergebnissen

In der vorliegenden Arbeit waren 70 % der Probanden männlichen Geschlechts und dieses Ergebnis ist mit anderen Beobachtungen vergleichbar (Shavakhi et al., 2014). In den meisten Fällen war die Leberzirrhose äthyltoxisch bedingt (rund 65 %) und unter anderem dadurch ist bisweilen der hohe Männeranteil zu erklären. Erfahrungsgemäß leiden diese häufiger als Frauen unter gesundheitsschädlichen Alkoholabusus (Kraus und Pabst, 2009). Passend dazu war auch das hohe mediane Alter der Studienpopulation mit 60 Jahren. Die alkoholbedingte Leberzirrhose manifestiert sich häufig erst nach jahrelangem Konsum. Dementsprechend war das Alter vieler Probanden fortgeschritten. Im Vergleich dazu wurde in einer Untersuchung von Sajja et al., die mehr als 2000 Patienten mit Leberzirrhose umfasste, das Durchschnittsalter mit 52 Jahren angegeben (Sajja et al., 2014).

Neben der herausragenden Bedeutung des Alkohols sind in Deutschland virale Hepatitiden sowie nichtalkoholische Fettlebererkrankungen (NASH) die häufigsten Ursachen der Leberzirrhose (Wiegand und Berg, 2013). In der vorliegenden Untersuchung folgten Virushepatitiden sowie NASH ätiologisch ebenfalls auf den Plätzen zwei (8 %) und drei (7 %).

Die Prävalenz von NOD2-Mutationen war mit rund 31 % höher als in der Untersuchung von Mayer et al, die eine Prävalenz von 20 % bei ihren Patienten mit Leberzirrhose angaben (Mayer et al., 2011). Allerdings wurden in der Veröffentlichung aus dem Jahr 2011 ausschließlich die Varianten p.R702W, p.G908R sowie c.3020insC untersucht. Zusätzlich zu diesen Veränderungen wurden in dieser Studienpopulation die Risikovarianten p.N289S und c.-958T>C gescreent und diese konnten mit einer Häufigkeit von 2 % beziehungsweise 3 % nachgewiesen werden.

Bereits vor Studienbeginn waren bei 26 % der Probanden Ausprägungen im Sinne einer OHE im natürlichen Krankheitsverlauf aufgetreten. Während der Erhebung konnte die hepatische Enzephalopathie mit einer Häufigkeit von 11 % (OHE) und 27 % (CHE gemäß CFF) beziehungsweise 46 % (CHE gemäß PHES) festgestellt werden. Die diagnostischen Verfahren zur Detektion der HE lieferten also auffallend abweichende Ergebnisse. Diese Resultate decken sich mit anderen Erfahrungsberichten. So unterliegt die Prävalenz der CHE deutlichen Schwankungen und sie variiert in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium der Leberzirrhose sowie vom verwendeten Testverfahren (Louissaint et al., 2022). In der Literatur lag die Schwankungsbreite im Stadium der Dekompensation zwischen 12 % (Ampuero et al., 2018) und 45 % (Rudler et al., 2021). Bei einer anderen Voruntersuchung kam es bei rund 80 % der Patienten, die aufgrund einer Leberzirrhose stationär behandelt werden mussten, im Verlauf der Erkrankung zu Ausprägungen von HE. 48 % von ihnen hatten verdeckte Einschränkungen (CHE) und 36 % offensichtliche Symptome (OHE) (Labenz et al., 2017). Die Daten der Auswertung von Labenz et. al aus dem Jahr 2017 wurden allerdings über einen längeren Zeitraum erhoben.

Die meisten Patienten dieser Studienpopulation wurden in die Studie eingeschlossen, als sie aufgrund von klinischen Beschwerden im Krankenhaus behandelt werden mussten. Dementsprechend war bei einem Großteil der Patienten die Leberzirrhose bereits dekompensiert ($n = 148 \triangleq 86 \%$) und somit die Leberschädigung sowie die portale Hypertension (hoher Anteil an Patienten mit Aszites und Ösophagusvarizen) fortgeschritten. Im Stadium der Dekompensation scheint vor allem der Pfortaderhochdruck essenziell für die erhöhte Permeabilität der Darmschleimhaut und konsekutiv für bakterielle Translokation mit systemischer Entzündungsfolge zu sein (Bruns et al., 2014). In der hier vorgelegten Arbeit hatten NOD2-Risikovarianten keine Assoziationen zur Verschlechterung klinischer Parameter zur Folge. Die Resultate waren für verschiedene Parameter gleich, die im Zusammenhang mit bakteriellen Translokationen und systemischen Entzündungen berücksichtigt wurden.

Neben der Prävalenz der HE waren auch die pathophysiologischen Zusammenhänge nicht mit dem Einfluss von NOD2-Risikovarianten assoziiert. Diese Resultate stimmen insofern mit anderen Voruntersuchungen überein, in denen der NOD2-Status vor allem für Patienten mit kompensierter Leberzirrhose relevant war. In einer Publikation von 2019 analysierten die Autoren Reichert et al. die Zusammenhänge von NOD2-Varianten und bakteriellen Infektionen bei Patienten mit Leberzirrhose. Im Falle der Kompensation waren NOD2-Varianten mit einem signifikant erhöhten Risiko für bakterielle Infektionen assoziiert (OR= 4.79), wohingegen bei Dekompensation die Ergebnisse unauffällig waren (p=0.11) (Reichert et al., 2019).

Trotz zahlreicher Voruntersuchungen sind die Wechselwirkungen von Ammoniak und Entzündungsmediatoren bei hepatischer Enzephalopathie nicht abschließend geklärt. Zwar wurde in klinischen Untersuchungen nachgewiesen, dass eine Hyperammonämie zur Verschlechterung neuropsychologischer Funktionen bei Patienten mit HE und SIRS führten, aber auch, dass sich die kognitiven Fähigkeiten nach Abklingen der akuten Entzündung wieder verbessern konnten (Shawcross et al., 2004). In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2021 konnten keine Assoziationen zwischen hepatischer Enzephalopathie und erhöhten Blutwerten von Ammoniak, bakterieller Translokation und Entzündungsmarkern beobachtet werden (Kimer et al., 2021). Viele andere Studien belegen jedoch eine signifikante Korrelation, insbesondere zwischen der Ammoniakserumkonzentration und der HE sowie dessen Schweregrad, sodass ein Zusammenhang sehr wahrscheinlich ist (Shawcross et al. 2004; Jain et al., 2012; Jalan und Rose 2022).

In der vorliegenden Studie wurden bei Patienten mit HE, unabhängig vom NOD2-Status, ebenfalls signifikante Veränderungen von Ammoniak, CRP und CD14 nachgewiesen. Weitere Biomarker (Leukozyten, IL-6, LBP, IgG, hTLR4), die ebenfalls als Zeichen für eine bakterielle Infektion oder eine erhöhte Aktivität des Immunsystems untersucht wurden, blieben hingegen unauffällig. Eine durchgeführte Regressionsanalyse der vorliegenden Daten, zeigte keine eindeutigen Wechselwirkungen zwischen Ammoniak und Entzündungsmediatoren.

5.3 Limitationen

Die größte Limitation der vorliegenden Querschnittsstudie bestand darin, dass ein Großteil der Probanden im Krankenhaus rekrutiert wurde, als sie aufgrund ihrer Beschwerden stationär behandelt werden mussten. Dementsprechend waren viele Erkrankungen im fortgeschrittenen Stadium und es wurden somit überwiegend Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose in die Studie eingeschlossen. Definitionsgemäß war es also bereits zum Auftreten von Aszites, einer OHE und/oder

Ösophagusvarizenblutungen gekommen. Die OHE tritt vergleichsweise selten als primäre Komplikation im natürlichen Verlauf der Leberzirrhose auf (Jepsen et al., 2010). Die CHE gilt zwar nicht als Dekompensationszeichen, aber sie geht mit einer schlechten Prognose bezüglich des Fortschreitens und der Mortalität der Erkrankung einher (de Franchis et al., 2022).

Patienten mit kompensierter Leberzirrhose waren in der Untersuchung also unterrepräsentiert. Ob NOD2-Varianten ein Risiko für die OHE sowie CHE im Stadium der Kompensation darstellen, konnte anhand der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden.

Zwar wurden Patienten mit akuten Infektionen von der Analyse ausgeschlossen. Dennoch war eine weitere Einschränkung der Studie, dass neuropsychometrische Testverfahren wie CFF oder PHES, die die kognitive Gesundheit von Patienten messen, ebenfalls durch epigenetische oder andere Faktoren, wie zum Beispiel Alkohol- und Nikotinabusus oder Diabetes mellitus, erheblich beeinflusst werden (Pérez-Matos et al., 2018). Im Vergleich dazu kann ein lebenslanges Risiko durch NOD2-Genvarianten eine untergeordnete Bedeutung darstellen.

Eine weitere Limitation ist die Größe des untersuchten Kollektivs und das Fehlen einer weiteren, unabhängigen Kohorte. Hier gilt es anzumerken, dass sowohl die genetischen Daten als auch die erhobenen klinischen und laborchemischen Daten sich gut mit früheren Publikationen decken und somit kein größerer Bias zu erwarten ist.

5.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit war die erste Studie, in der mögliche Assoziationen zwischen NOD2-Risikovarianten und der Prävalenz von hepatischer Enzephalopathie untersucht wurden. Dementsprechend konnte zum Studienzeitpunkt ein Vergleich mit anderen Untersuchungen nicht durchgeführt werden und weitere Analysen über mögliche Zusammenhänge stehen gegenwärtig noch aus.

Wie bereits erläutert, lag in der vorliegenden Studienpopulation ein Großteil der Leberzirrhosen dekompensiert vor. Bei dieser Kohorte waren NOD2-Varianten für die Entstehung der HE irrelevant. Ob im Stadium der Kompensation NOD2-Varianten ein gesondertes Risiko für die HE darstellen, konnte anhand dieser Daten nicht beantwortet werden. Weitere Untersuchungen über mögliche Zusammenhänge könnten Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Obwohl die meisten Studien auf signifikante Wechselwirkungen von Ammoniak und Entzündungsmediatoren bei HE hindeuten (Shawcross et al. 2004; Jain et al., 2012; Jalan und Rose 2022), ist die Datenlage nicht eindeutig. In ihrer Veröffentlichung aus dem Jahr 2021 konnten Kimer et al. keine Assoziationen zwischen hepatischer Enzephalopathie und erhöhten Blutwerten von Ammoniak, bakterieller Translokation sowie systemischen Entzündungszeichen beobachten (Kimer et al., 2021). Im Gegensatz dazu wurden in dieser Studie, unabhängig vom NOD2-Status, bei Patienten mit HE signifikante Veränderungen von Ammoniak, CRP und CD14 nachgewiesen. Weitere Biomarker (Leukozyten, IL-6, LBP, IgG, hTLR4), die ebenfalls als Anzeichen für bakterielle Infektionen oder eine vermehrte Inflammation untersucht wurden, blieben hingegen unauffällig. Eine abschließende Regressionsanalyse dieser Daten, zeigte jedenfalls keine eindeutigen Ergebnisse.

6. Zusammenfassung

Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist eine relevante Komplikation bei Patienten mit Leberzirrhose. Die Pathogenese der HE ist multifaktoriell. Ammoniak spielt aufgrund seiner neurotoxischen Wirkung eine zentrale Rolle aber auch Inflammation und entzündungsfördernde Zytokine müssen berücksichtigt werden (Jalan und Rose, 2022). Die Wechselwirkungen von Ammoniak und anderer Entzündungsmediatoren bei HE sind nicht eindeutig geklärt (Shawcross et al., 2004).

NOD2 übernimmt als Mustererkennungsrezeptor wichtige Funktionen der angeborenen Immunabwehr und Varianten des Proteins (p.R702W, p.G908R, c.3020insC, p.N289S und c.-958T>C) sind mit einer reduzierten Barrierefunktion der Darmschleimhaut assoziiert (Buhner et al., 2006). Infolgedessen kommt es zu einer übermäßigen Translokation von Darmbakterien insbesondere in die Blutbahn und in die Peritonealhöhle. Bakterielle Translokation (BT) lässt sich auch bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites nachweisen und auf dieser Grundlage kann eine weitere gewichtige Komplikation, die spontan bakterielle Peritonitis (SBP), entstehen (Bernardi et al., 2015). Bakterien und bakterielle Stoffwechselprodukte können, neben Infektionen, im Verlauf auch eine HE begünstigen (Montoliu et al. 2009) und beides geht für Betroffene mit einer Verschlechterung der Prognose einher (Zapater et al., 2008). Für die SBP stellen NOD2-Varianten ein genetisches Risiko dar (Bruns et al., 2012). Assoziationen zwischen nachgewiesenen NOD2-Risikovarianten und dem Auftreten von HE sind bisher nicht bekannt.

Das primäre Ziel der vorliegenden Studie war die Überprüfung einer Assoziation von NOD2-Varianten mit der Prävalenz der HE bei Patienten mit Leberzirrhose. Des Weiteren sollten etwaige Auswirkungen dieser Varianten auf die BT und entzündliche Prozesse untersucht werden. Die Hypothese war, dass NOD2-Risikovarianten vermehrt mit BT sowie Entzündungen und konsekutiv mit erhöhter Prävalenz von HE einhergehen. Darüber hinaus wurden, unabhängig vom NOD2-Status, die Zusammenhänge zwischen BT mit Entzündungsfolge und dem Auftreten von HE untersucht.

Für die Untersuchung wurden die Daten von 172 Patienten mit Leberzirrhose in einer prospektiven Querschnittsstudie ausgewertet, die an den Universitätsstandorten Halle, Homburg und Jena über einen Zeitraum von über 3 Jahren erhoben worden sind.

Die Einteilung des Schweregrads der Leberzirrhose bzw. -insuffizienz erfolgte bei allen Probanden anhand des MELD-Scores. Die Erhebung der klinischen Parameter zeigte, dass die meisten Patienten bereits dekompensiert waren ($n = 148 \triangleq 86 \%$). Definitionsgemäß war es also bereits zum Auftreten von Aszites,

Ösophagusvarizenblutungen und/oder overt hepatischer Enzephalopathie (OHE) im Vorfeld des Studieneinschlusses gekommen.

Die OHE konnte durch ausführliche klinisch-neurologische Untersuchungen festgestellt oder ausgeschlossen werden. Verdeckte kognitive Defizite im Sinne einer covert hepatischen Enzephalopathie (CHE) wurden anhand spezieller Testverfahren detektiert. Bei allen Patienten wurde dazu die Analyse der kritischen Flimmerfrequenz (CFF) angewendet. Eine Subgruppe (n = 63) erhielt zusätzlich eine Testung mittels Portosystemischem Hepatischen Enzephalopathie Score (PHES).

Zur Feststellung der NOD2-Varianten p.R702W, p.G908R, c.3020insC, N289S und c.-958T>C wurden Taqman-basierte Genanalysen durchgeführt. Zudem erhielten alle Patienten ein vordefiniertes Standardlabor, das unter anderem die erforderlichen Parameter des MELD-Scores (Kreatinin, Bilirubin, INR) beinhaltet. Anzeichen verstärkter Aktivität von BT (Ammoniak, Endotoxin und LBP) und Inflammation (Leukozyten, CRP, IL-6, CD14, hTLR4) wurden anhand genannter Biomarker detektiert.

Zusammenfassend ließ sich die Studienhypothese nicht bestätigen. Bei dieser Kohorte konnte weder für die CHE noch für die OHE ein zusätzliches Risiko durch NOD2-Varianten nachgewiesen werden. Auch hinsichtlich der pathophysiologischen Zusammenhänge zeigte sich keine Relevanz. In der Studienpopulation waren NOD2-Varianten ebenso wenig mit Anzeichen einer gesteigerten BT oder Inflammation assoziiert.

Diese Studienergebnisse stimmen insofern mit anderen Voruntersuchungen überein, als dass der NOD2-Status vor allem für Patienten mit kompensierter Leberzirrhose relevant zu sein scheint. Reichert et al. analysierten in ihrer Publikation von 2019 die Zusammenhänge von NOD2-Varianten und bakteriellen Infektionen bei Patienten mit Leberzirrhose. Im Falle der Kompensation stellten NOD2-Varianten ein signifikant erhöhtes Risiko für bakterielle Infektionen dar, wohingegen bei Dekompensation die Ergebnisse keine Assoziation zeigten (Reichert et al., 2019).

Unabhängig vom NOD2-Status wurde in der vorliegenden Untersuchung bei Patienten mit HE signifikant erhöhte Blutspiegel von Ammoniak, CRP sowie CD14 festgestellt. Weitere Parameter, die ebenfalls auf eine vermehrte BT oder Inflammation hindeuteten, blieben unauffällig. Eine Regressionsanalyse der Daten erbrachte keinen eindeutigen Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Ammoniak und Entzündungsmediatoren. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnte in einer Untersuchung aus dem Jahr 2021 keine Assoziation zwischen HE und erhöhten Blutwerten von Ammoniak sowie systemischen Entzündungszeichen beobachtet werden (Kimer et al., 2021).

Die größte Limitation der vorliegenden Querschnittsstudie war, dass ein Großteil der Studienteilnehmer im Krankenhaus rekrutiert wurde, da sie aufgrund ihrer Beschwerden stationär behandelt werden mussten. Dementsprechend waren viele Erkrankungen bereits weit fortgeschritten und es wurden somit überwiegend Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose in die Studie eingeschlossen. Zum Zeitpunkt der Dekompensation sind die fortgeschrittene portale Hypertension und die Leberinsuffizienz essenziell für eine vermehrte bakterielle Translokation mit systemischer Entzündungsfolge (Bruns et al., 2014). Das für diese Kohorte nachgewiesene NOD2-Risikovarianten eine zusätzliche Risikokonstellation darstellen, erscheint unwahrscheinlich. Weiterhin waren Probanden mit kompensierter Leberzirrhose unterrepräsentiert. Damit bleibt unklar ob im Stadium der Kompensation NOD2-Varianten ein gesondertes Risiko für die HE darstellen. Weitere Analysen in größeren Patientenkohorten sowie von möglichen funktionellen Konsequenzen von NOD2-Varianten könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

7. Literaturverzeichnis

Adams R. D. and Foley J. M., „The neurological disorder associated with liver disease”. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis 1953; 32:198-237.

Al Nabhani Z, Dietrich G, Hugot J-P, Barreau F (2017) NOD2: The intestinal gate keeper. PLoS Pathog., 13, e1006177.

Ampuero J, Montoliu C, Simon-Talero M, Aguilera V, Millan R, Marquez C, Jover R, et al. Minimal hepatic encephalopathy identifies patients at risk of faster cirrhosis progression. J Gastroenterol Hepatol 2018; 33:718-725.

Appenrodt B, Grünhage F, Gentemann MG et al. (2010) Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. Hepatology, 51, 1327–1333.

Arvaniti V, D’Amico G, Fede G et al. (2010) Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. Gastroenterology, 139, 1246–1256.

Bajaj J. S., Cordoba J., Mullen K. D., Amodio P., Shawcross D. L., Butterworth R. F., Morgan M. Y., „International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN). Review article: the design of clinical trials in hepatic encephalopathy - an International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) consensus statement”. Aliment Pharmacol Ther. 2011; 33(7):739-47.

Balasubramanian I, Gao N. From sensing to shaping microbiota: insights into the role of NOD2 in intestinal homeostasis and progression of Crohn's disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2017; 313: G7-g13.

Barnich N, Aguirre JE, Reinecker HC, Xavier R, Podolsky DK. Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor kappaB activation in muramyl dipeptide recognition. J. Cell Biol 2005; 170: 21-26.

Benten D, Wiest R (2012) Gut microbiome and intestinal barrier failure – The “Achilles heel” in hepatology? J. Hepatol., 56, 1221–1223.

Bernardi M, Moreau R, Angeli P, Schnabl B, Arroyo V. Mechanisms of decompensation and organ failure in cirrhosis: From peripheral arterial vasodilation to systemic inflammation hypothesis. J Hepatol 2015; 63:1272-1284.

Bosch, J. C. Garcia-Pagan, „Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension”. J Hepatol 2000; 32:141-156.

- Bruns T, Peter J, Reuken PA, Grabe DH, Schuldes SR, Brenmoehl J, Scholmerich J, et al. NOD2 gene variants are a risk factor for culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and monomicrobial bacterascites in cirrhosis. *Liver Int* 2012; 32:223-230.
- Bruns T, Zimmermann HW, Stallmach A (2014) Risk factors and outcome of bacterial infections in cirrhosis. *World J. Gastroenterol.*, 20, 2542–2554.
- Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, Kuechler I, et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 2006; 55:342-347.
- Bundesärztekammer (2006) Richtlinien zur Organtransplantation gemäß § 16 TPG. *Dtsch. Arztebl.*, 103, 3282–3290.
- Casafont F, Sánchez E, Martín L, Agüero J, Romero FP. Influence of malnutrition on the prevalence of bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology* 1997; 25: 1334-1337.
- Casper M, Mengel M, Fuhrmann C, Herrmann E, Appenrodt B, Schiedermaier P, Reichert M, et al. The INCA trial (Impact of NOD2 genotype-guided antibiotic prevention on survival in patients with liver Cirrhosis and Ascites): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2015; 16:83.
- Chen G, Shaw MH, Kim Y-G, Nuñez G (2009) NOD-Like Receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 4, 365–98.
- Cichoż-Lach H, Michalak A. Current pathogenetic aspects of hepatic encephalopathy and noncirrhotic hyperammonemic encephalopathy. *World J Gastroenterol.* 2013 Jan 7;19(1):26-34.
- Conn H. O. and Bircher J., „Quantifying the severity of hepatic encephalopathy: syndromes and therapies”. In: Conn HO, Bircher J (eds.) *Hepatic encephalopathy: syndromes and therapies*. East Lansing MI: Medi Ed Press. 1993: 13.
- Cronin-Golomb A, Corkin S, Rizzo JF, Cohen J, Growdon JH, Banks KS. Visual dysfunction in Alzheimer's disease: relation to normal aging. *Ann Neurol* 1991;29:41-52.
- D. Häussinger, F. Schliess, G. Kircheis, „Pathogenesis of hepatic encephalopathy”. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17.3:256–259.
- D'Amico G., Garcia-Tsao G., Pagliaro L., „Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies”. *J Hepatol* (2006); 44:217–231.

D'Amico G., Morabito A., Pagliaro L., Marubini E., „Survival and prognostic indicators in compensated and decompensated cirrhosis”. *Dig Dis Sci* 1986; 31:468-475.

de Franchis R, Bosch J, Garcia-Tsao G, Reiberger T, Ripoll C, Baveno VIIF. Baveno VII - Renewing consensus in portal hypertension. *J Hepatol* 2022; 76:959-974.

Ferenci, P.: Hepatische Enzephalopathie. *Fortbildung Hepatitis & more* 1/2011.

Fernández J, Gustot T (2012) Management of bacterial infections in cirrhosis. *J. Hepatol.*, 56, Supp.1, S1–S12.

Freeman Jr. R. B., Wiesner R. H., Harper A., McDiarmid S. V., Lake J., Edwards E., Merion R., Wolfe R., Turcotte J., Teperman L., „UNOS/OPTN Liver Disease Severity Score, UNOS/OPTN Liver and Intestine, and UNOS/OPTN Pediatric Transplantation Committees”. *Liver Transpl.* 2002;8(9):851.

Friedman L., Keefe E.: *Handbook of liver disease.* 2011, Chapter 13: Hepatic encephalopathy, S. 183–192.

Girardin SE, Boneca IG, Viala J et al. (2003) NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.*, 278, 8869–8872.

Groeneweg M., Quero J. C., De Bruijn I., Hartmann I. J., Essink-bot M. L., Hop W. C., Schalm S. W., „Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning”. *Hepatology* 1998; 28:45-9.

Gutierrez A, Scharl M, Sempere L, Holler E, Zapater P, Almenta I, Gonzalez-Navajas JM, et al. Genetic susceptibility to increased bacterial translocation influences the response to biological therapy in patients with Crohn's disease. *Gut* 2014;63:272-280.

Gutierrez O., Pipaon C., Inohara N. u. a.: Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. In: *The Journal of Biological Chemistry.* 277(44), November 2002, S. 41701–41705.

Hampe J., Cuthbert A., Croucher P. J., Mirza M. M., Mascheretti S., Fisher S., Frenzel H., King K., Hasselmeyer A., MacPherson A. J., Bridger S., van Deventer S., Forbes A., Nikolaus S., Lennard-Jones J. E., Foelsch U. R., Krawczak M., Lewis C., Scheiber S., Mathew C. G.: Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. In: *Lancet.* 357(9272), 16. Jun 2001, S. 1925–1928.

Hansen HC: *Bewusstseinsstörungen und Ezephalopathien:* 2013; 48-49.

- Harputluoglu MMM, Dertli R, Oflu B et al. (2016) Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 variants in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Dig. Dis. Sci.*, 61, 1545–1552.
- Hassanein T. I., Tofteng F., Brown Jr. R. S., Mc Guire B., Lynch P., Mehta R., Larsen F. S., Gornbein J., Stange J., Blei A. T., „Randomized controlled study of extracorporeal albumin dialysis for hepatic encephalopathy in advanced cirrhosis”. *Hepatology* 2007; 46:1853-62.
- Häussinger et al., „Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie: Kompendium und Praxisleitfaden“. De Gruyter 2018; 344-359.
- Herold G. et al: *Innere Medizin*. 2020, S. 548-558.
- Hugot J-P, Chamaillard M, Zouali H et al. (2001) Association of NOD2 leucinerich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, 599–603.
- Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G (Feb 1996). "Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16". *Nature*. 379 (6568): 821–3.
- Iwasaki A, Medzhitov R: Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. In: *Science*. 327. Jahrgang, Nr. 5963, Januar 2010, S. 291–295.
- Jain L, Sharma BC, Sharma P, Srivastava S, Agrawal A, Sarin SK. Serum endotoxin and inflammatory mediators in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Dig Liver Dis* 2012; 44(12): 1027–31.
- Jalan R, Rose CF. Heretical thoughts into hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2022;77:539-548.
- Jepsen P., Ott P., Andersen P. K., Sørensen H. T., Vilstrup H., „The clinical course of alcoholic liver cirrhosis: a Danish population-based cohort study”. *Hepatology* 2010; 51:1675-1682.
- Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M et al. (2001) A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*, 33, 464–470.
- Kim TH, Payne U, Zhang X, Iwanaga Y, Davey MP, Rosenbaum JT, Inman RD (Jan 2007). "Altered host:pathogen interactions conferred by the Blau syndrome mutation of NOD2". *Rheumatology International*. 27 (3): 257–62.

Kimer N, Gluud LL, Pedersen JS, Tavenier J, Moller S, Bendtsen F. The Psychometric Hepatic Encephalopathy Syndrome score does not correlate with blood ammonia, endotoxins or markers of inflammation in patients with cirrhosis. *Transl Gastroenterol Hepatol* 2021;6:8.

Kircheis G., Hilger N., Häussinger D.: Value of critical flicker frequency and psychometric hepatic encephalopathy score in diagnosis of low-grade hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*. 2014; 146: 961-969.

Kircheis G., Gürtelmeyer R., Grafe S., „Critical assessment of the PHES test battery in patients with low-grade hepatic encephalopathy”. In Häussinger D, Kircheis G, Schliess F, eds. *Hepatic encephalopathy and nitrogen metabolism*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2006, pp. 495–5042.

Kircheis G., Wettstein M., Timmermann L., Schnitzler A., Häussinger D., „Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy”. *Hepatology*. 2002 Feb;35(2):357-66.

Kraus L., Pabst A.: „Epidemiologischer Suchtsurvey“. *Sucht*, 2009, pp. 56(5).

Krawitt EL, Autoimmune Hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 1996, 334, 897–903.

Labenz C, Toenges G, Huber Y, Nagel M, Marquardt JU, Galle PR, Labenz J, Wörns MA. Raised serum Interleukin-6 identifies patients with liver cirrhosis at high risk for overt hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther* 2019; 50:1112-1119.

Labenz C, Wörns MA, Schattenberg JM, Huber Y, Galle PR, Labenz J. Epidemiology of hepatic encephalopathy in German hospitals - the EpHE study. In: *Z Gastroenterol*, 2017, 55(8), S. 741–747.

Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V. et al. (2016) Analysis of protein-coding genetic variation in 60.706 humans. *Nature*, 536, 285–291.

Louissaint J, Deutsch-Link S, Tapper EB. Changing Epidemiology of Cirrhosis and Hepatic Encephalopathy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022 Aug; 20(8 Suppl): S1–S8.

Mason RJ, Snelgar RS, Foster DH, Heron JR, Jones RE. Abnormalities of chromatic and luminance critical flicker frequency in multiple sclerosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23:246-252.

Mayer L, Krawczyk M, Mahler M, Lang A, Grünhage F, Lammert F. In search for genetic risk factors for hepatic encephalopathy: relevance of nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants. *Journal of Hepatology* 2011; Volume 54, Page 74.

- Merli M, Lucidi C, Pentassuglio I, Giannelli V, Giusto M, Di Gregorio V, Pasquale C, et al. Increased risk of cognitive impairment in cirrhotic patients with bacterial infections. *J Hepatol* 2013; 59:243-250.
- Moller S., Hobolth L., Winkler C., Bendtsen F., Christensen E., „Determinants of the hyperdynamic circulation and central hypovolaemia in cirrhosis”. *Gut* 2011; 60:1254-1259.
- Montoliu C, Piedrafita B, Serra MA, del Olmo JA, Urios A, Rodrigo JM, Felipo V. IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43:272-279.
- Mulle KD et al.: Rifaximin is safe and well tolerated for long-term maintenance of remission from overt hepatic encephalopathy, *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug;12(8):1390-1397.e2.
- Musskopf MI, Fonseca FP, Gass J, de Mattos AZ, John JA, de Mello Brandão AB. Prognostic factors associated with in-hospital mortality in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Ann Hepatol* 2012; 11: 915-920.
- Odeh M, Sabo E, Srugo I, Oliven A. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver Int* 2004; 24:110-116.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:603-606.
- Ogura Y., Inohara N. u. a.: Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. In: *The Journal of biological chemistry*. Band 276, Nummer 7, Februar 2001, S. 4812–4818.
- Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, et al. Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am J Med* 2003; 114(3): 188–93.
- Pérez-Matos MC, Jiang ZG, Tapper EB. Factors that affect results of psychometric tests to identify patients with minimal hepatic encephalopathy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018; 16:1836–1838.
- Pommer P., „Chronisch entzündliche Darmerkrankungen – Bakterielle DNA in Lymphknoten“. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2015; 53(2): 86.

Practice Guideline by the European Association for the Study of the Liver (EASL) and the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), „Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease“, 2014.

Radford-Smith G, Pandeya N (Nov 2006). "Associations between NOD2/CARD15 genotype and phenotype in Crohn's disease--Are we there yet?". *World Journal of Gastroenterology*. 12 (44): 7097–103.

Reiberger T (2012) Pathophysiologie der portalen Hypertension als Voraussetzung innovativer Therapien. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* 10 (2):28-29.

Reichert MC, Ripoll C, Casper M, Greinert R, Vandieken E, Grunhage F, Appenrodt B, et al. Common NOD2 Risk Variants as Major Susceptibility Factors for Bacterial Infections in Compensated Cirrhosis. *Clin Transl Gastroenterol* 2019; 10:e00002.

Riggio O., Efrati C., Catalano C., Mecarelli O., Accornero N., Nicolao F., Angeloni S., Masini A., Ridola L., Attili A.F., Merli M., „High prevalence of spontaneous portal-systemic shunts in persistent hepatic encephalopathy: a case-control study“. *Hepatology* 2005; 42:1158-1165.

Rimola A, García-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, Inadomi JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. *J Hepatol* 2000; 32: 142-153.

Rivest S et al. (2000): How the Blood Talks to the Brain Parenchyma and the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus During Systemic Inflammatory and Infectious Stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* 223:22-38.

Roman E., Cordoba J., Torrens M., Torras X., Villanueva C., Vargas V., Guarner C., Soriano G., „Minimal hepatic encephalopathy is associated with falls“. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 476–82.

Romero-Gomez M, Cordoba J, Jover R, del Olmo JA, Ramirez M, Rey R, de Madaria E, et al. Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2007;45:879-885.

Runyon BA, Committee APG. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: an update. *Hepatology* 2009; 49:2087-107.

Rudler M, Weiss N, Bouzbib C, et al. Diagnosis and management of hepatic encephalopathy. *Clin Liver Dis*. 2021;25:393–417.

S2k-Leitlinie „Komplikationen der Leberzirrhose“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten e.V. (DGVS). In: AWMF online (Stand 2018).

Sabbah A., Chang T. H., u. a.: Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. In: Nature Immunology. Band 10, Nummer 10, Oktober 2009, S. 1073–1080.

Sajja KC, Mohan DP, Rockey DC: Age and Ethnicity in Cirrhosis. J Investig Med. 2014 Oct; 62(7): 920–926.

Saner F. H., Gieseler R. K., Akiz H., Canbay A., Gorlinger K., „Delicate balance of bleeding and thrombosis in end-stage liver disease and liver transplantation“. Digestion 2013; 88:135–144.

Sato H, Williams HR, Spagnolo P, Abdallah A, Ahmad T, Orchard TR, Copley SJ, Desai SR, Wells AU, du Bois RM, Welsh KI (Feb 2010). "CARD15/NOD2 polymorphisms are associated with severe pulmonary sarcoidosis". Eur Respir J. 35 (2): 324–30.

Schomerus H., Hamster W., Blunck H., Reinhard U., Mayer K., Dölle W., „Latent portasystemic encephalopathy. I. Nature of cerebral functional defects and their effect on fitness to drive“. Dig Dis Sci 1981; 26:622-30.

Sharma P, Sharma BC, Puri V, Sarin SK. Critical flicker frequency: diagnostic tool for minimal hepatic encephalopathy. J Hepatol 2007;47:67-73.

Sharma P, Sharma BC, Sarin SK. Predictors of nonresponse to lactulose for minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. Liver Int 2009;29:1365-1371.

Shavakhi A., Hashemi H., Tabesh E., Derakhshan Z., Farzamnia S., Meshkinfar S., Shavakhi S., Minakari M., Gholamrezaei A., „Multistrain probiotic and lactulose in the treatment of minimal hepatic encephalopathy“. J Res Med Sci. 2014; 19(8):703-708.

Shawcross DL, Davies NA, Williams R, Jalan R. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. J Hepatol 2004;40:247-254.

Sörensen H. T., Thulstrup A. M., Mellekjar L., Jepsen P., Cristensen E., Olsen JH, Vilstrup H., „Long-term survival and cause-specific mortality in patients with cirrhosis of the liver: a nationwide cohort study in Denmark". Journal of Clinical Epidemiology 2003; 56 (1): 88–93.

Strober W, Asano N, Fuss I, Kitani A, Watanabe T. Cellular and molecular mechanisms underlying NOD2 risk-associated polymorphisms in Crohn's disease. Immunol Rev 2014; 260:249-260.

Umapathy S., Dhiman R. K., Grover S., Duseja A., Chawla Y. K., „Persistence of cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy”. *Am J Gastroenterol.* 2014; 109(7):1011-9.

Vaure C, Liu Y (2014). "A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species". *Frontiers in Immunology.* 5: 316.

Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology* 2014; 60:715-35.

Weissenborn K PHEs: One label, different goods?!. *Journal of Hepatology* 2008; 49:346-353.

Weissenborn K, Ahl B, Fischer-Wasels D, van den Hoff J, Hecker H., Burchert W., Köstler H. (2007) Correlations between magnetic resonance spectroscopy alterations and cerebral ammonia and glucose metabolism in cirrhotic patients with and without hepatic encephalopathy”. *Gut* 56:1736–1742.

Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Rückert N, Hecker H (2001) Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 34(5):768-773.

Weissenborn K., „Diagnosis of encephalopathy”. *Digestion* 1998; 59 (Suppl. 2):22-24.

Wiegand J und Berg T, „The etiology, diagnosis and prevention of liver cirrhosis: part 1 of a series on liver cirrhosis”. *Dtsch Arztebl Int.* 2013 Feb;110(6):85-91.

Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005; 41:422-433.

Wiest R., Lock G. und Schölmerich J., „Portale Hypertension“. *Internist* 2000; 41:1077–109.

Wiltfang J., Nolte W., Weissenborn K., Kornhuber J. und Ruther E., „Psychiatric aspects of portal-systemic encephalopathy“. *Metab Brain Dis* 1998; 13:379-389.

Wittenburg H., Tennert U. und Berg T., „Komplikationen der Leberzirrhose“ *Internist* 2011; 52:1061–1072.

Zapater P, Frances R, Gonzalez-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, Monfort D, et al. Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology* 2008; 48:1924-1931.

Zhao H, Jia M, Wang Z, Cheng Y, Luo Z, Chen Y, Xu X, Yang S, Tang Y (Jun 2015). "Association between NOD2 single nucleotide polymorphisms and Grade III-IV acute graft-versus-host disease: A meta-analysis". *Hematology*. 20 (5): 254–62.

Zipprich A, Garcia-Tsao G, Rogowski S et al. Prognostic indicators of survival in patients with compensated and decompensated cirrhosis. *Liver Int* 2012; 32: 1407–1408.

8. Thesen

1. Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist mit relevanten kognitiven Einschränkungen bei Patienten mit Leberzirrhose verbunden und die Prävalenz der Erkrankung variiert in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium sowie den verwendeten Testverfahren.
2. Die Pathogenese der HE ist multifaktoriell und NOD2-Varianten zählen zu den möglichen Risikofaktoren.
3. Die Schwere der Lebererkrankung (Einstufung anhand des MELD-Scores) ist ein zur hepatischen Enzephalopathie assoziierter Faktor.
4. Das Vorliegen von NOD2-Varianten führt zu einer erhöhten Prävalenz der overt HE und covert HE.
5. NOD2 übernimmt als Mustererkennungsrezeptor wichtige Funktionen des Immunsystems und Varianten des Proteins sind mit vermehrtem Auftreten von bakterieller Translokation (indirekter Nachweis über Ammoniakspiegel, Endotoxin und LBP) assoziiert.
6. NOD2-Varianten begünstigen bei Patienten mit Leberzirrhose eine Erhöhung von Inflammationsparametern (Leukozyten, CRP, IL-6, CD14, hTLR4).

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 15 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Georg Hoss

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Die Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Georg Hoss

Danksagung

Als erstes danke ich Herrn Prof. Dr. J. Rosendahl für die Möglichkeit der Promotion an der Universitäts- und Poliklinik für Innere Medizin I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und die gute Betreuung dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Prof. Dr. C. Ripoll und Herrn Professor Dr. A. Zipprich für die Koordinierung und wissenschaftliche Begleitung des gesamten Projekts, sowie für die Unterstützung dieser Arbeit.

Ich danke meinem weiteren Betreuer Dr. R. Greinert für die exzellente Anleitung, stetige Motivation und permanente Unterstützung. Ohne sein Engagement und seine wissenschaftliche Begeisterung wäre eine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Meiner lieben Familie und meinen Freunden danke ich ebenfalls für die uneingeschränkte Unterstützung, die lieben Worte und den Ansporn zur Fertigstellung der Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch meiner lieben Freundin Jenny, die mich während des gesamten Prozesses geduldig begleitet hat. Ihre Motivation und Rückhalt waren mir eine besondere Hilfe.