

Aus der Klinik für Intensivmedizin
des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf
Direktor (komm.): Dr. med. S. Kluge

**Einfluss des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie
Stimulierenden Faktors (GM-CSF) auf die monozytäre HLA-DR
Expression bei Patienten mit schwerer Sepsis oder
septischem Schock**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von Anke Zapfe
aus Hamburg

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
am 8.2.2010.

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. K. G. Kreymann

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. I. Sobottka

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. J.-M. Pollok

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis:

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	S. 1
2. Einleitung	
2.1. Systemisch-inflammatorisches Reaktionssyndrom, Sepsis und septischer Schock	S. 2
2.2. Pathophysiologie und Klinik	S. 5
2.3. Immunsystem, Monozyten und das HLA-DR Antigen	S. 8
2.4. Granulozyten–Makrophagen Kolonie Stimulierender Faktor	S. 10
2.5. Immuntherapie und der Einfluss von Wachstumsfaktoren	S. 12
3. Material und Methoden	
3.1. Art der Studie, Patientenpopulation, Einschlusskriterien und Randomisierungsverfahren	S. 15
3.2. Messung der HLA-DR Expression auf Monozyten	S. 16
Funktion des Durchflusszytometers	S. 16
Verwendete Antikörper und ihre Funktion	S. 18
Material	S. 20
Methode	S. 21
Auswertung der Oberflächenmarkierungen	S. 23
3.3. Erfassung von Infektionen, Erkrankungsschwere und klinischem Verlauf	S. 26
3.4. Voraussetzungen und Durchführung der GM-CSF Gabe	S. 30
3.5. Messung der weiteren Parameter	
Die Leukozytenzahl	S. 31
Das C-reaktive Protein	S. 32
Interleukin 6	S. 32
Interleukin 10	S. 33
Procalcitonin	S. 33
3.6. Statistische Methoden	S. 34

4.	Ergebnisse	
4.1.	Demographie	S. 36
4.2.	Einfluss der GM-CSF Gabe auf die monozytäre HLA-DR Expression	S. 38
4.3.	Einfluss der GM-CSF Gabe auf die übrigen Parameter	S. 39
4.4.	Unerwünschte Ereignisse und Nebenwirkungen von GM-CSF	S. 43
4.5.	Einfluss der GM-CSF Gabe auf Infektionen, Erkrankungen und Mortalität	S. 45
4.6.	Unterschiede zwischen Überlebenden und Verstorbenen bei der Erkrankungsschwere und den immunologischen Markern	S. 50
5.	Diskussion	
5.1	Kernaussage	S. 54
5.2.	Methodenkritik	S. 55
5.3.	Diskussion der Ergebnisse	S. 61
5.4.	Einordnung der Ergebnisse in andere Studien	S. 69
6.	Zusammenfassung und Ausblick	S. 72
7.	Literaturverzeichnis	S. 73
8.	Glossar	S. 84
9.	Danksagung	S. 86
10.	Erklärung	S. 87

Abbildungen und Tabellen (nach dem Inhaltsverzeichnis)

Abbildungen und Tabellen

Abb. 1	SIRS, Sepsis und Infektion	S. 3
Abb. 2	Phasen der Sepsis	S. 6
Abb. 3	Aufbau eines Durchflusszytometers	S. 18
Abb. 4	Darstellung eines Streulichthistogramms	S. 23
Abb. 5	Betrachtung der Zellpopulationen	S. 24
Abb. 6	Einstellung CD14 FITC vs. Seitwärtsstreulicht	S. 25
Abb. 7	Mittelwerte und Standardfehler der HLA-DR Expression im Verlauf	S. 38
Abb. 8	Einfluss der GM-CSF Gabe auf die Leukozyten	S. 39
Abb. 9	Einfluss der GM-CSF Gabe auf das CRP	S. 40
Abb. 10	Einfluss der GM-CSF Gabe auf das Interleukin 6	S. 41
Abb. 11	Einfluss der GM-CSF Gabe auf das Interleukin 10	S. 42
Abb. 12	Einfluss der GM-CSF Gabe auf das Procalcitonin	S. 43
Abb. 13	Mittelwerte und Standardfehler der MODS Werte	S. 48
Abb. 14	Mittelwerte und Standardfehler der SOFA Werte	S. 49
Abb. 15	HLA-DR Expression für Überlebende und Verstorbene	S. 51
Abb. 16	Procalcitonin für Überlebende und Verstorbene	S. 52
Abb. 17	Interleukin 6 für Überlebende und Verstorbene	S. 53
Tab.: 1	SIRS-Kriterien	S. 2
Tab.: 2	Folgeerscheinungen von SIRS und Sepsis	S. 4
Tab.: 3	Demographische Daten der Patienten	S. 36
Tab.: 4	Verteilung der Hauptdiagnosen	S. 37
Tab.: 5	Einfluss der GM-CSF Gabe auf die Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Fieber, Delta MODS-Werte	S. 44
Tab.: 6	Infektions- und Aufnahmediagnosen	S. 45
Tab.: 7	Infektionsdiagnosen der Placebo- und Verumgruppe	S. 46

Tab.: 8	Einfluss der GM-CSF Gabe auf die Erkrankungsschwere	S. 47
Tab.: 9	Einfluss der Erkrankungsschwere auf Überlebende und Verstorbene	S. 50

Der Einfluss von GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie Stimulierender Faktor) auf die monozytäre HLA-DR Expression bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Krankheitsbild der Sepsis rückt zunehmend in den Vordergrund des medizinischen Interesses und die damit verbundene Pathophysiologie des Immunsystems steht im Mittelpunkt der intensivmedizinischen Forschung. Die Krankheitsbilder der Sepsis, schweren Sepsis und des septischen Schocks gehören zu den häufigsten Todesursachen auf den Intensivstationen in den westlichen Ländern.

Trotz der Fortschritte bei der Diagnostik und Therapie gestörter Organfunktionen bei septischen Patienten in den letzten Jahren sind die Therapieansätze zur Modulation des Immunsystems bisher wenig Erfolg versprechend. Es wird daher weiter versucht, geeignete Parameter zur Diagnostik und Therapie zu etablieren.

Monozyten stellen mit ihren vielfältigen Fähigkeiten eine Schlüsselrolle im Immunsystem dar. Das monozytäre Oberflächenantigen HLA-DR spielt als Bindeglied zwischen unspezifischer und spezifischer Immunantwort eine zentrale Rolle im Immunsystem.

Unterschiedliche Arbeiten konnten Zusammenhänge zwischen der monozytären HLA-DR Expression und der Mortalität von Intensivpatienten mit septischer Erkrankung aufzeigen. Eine reduzierte Expression des HLA-DR Oberflächenantigens zeigte negative Auswirkung auf das Immunsystem der Patienten. Aufgrund dieser Erkenntnisse lag es nah Therapieoptionen zu suchen, welche die HLA-DR Antigene beeinflussen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des Wachstumsfaktors GM-CSF auf die monozytäre HLA-DR Expression bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock zu untersuchen.

2. Einleitung

2.1. Systemisch-inflammatorisches Reaktionssyndrom, Sepsis und septischer Schock

Sepsis und septischer Schock sind trotz der Fortschritte in der Intensivmedizin mit einer Letalität von 20-50% die Haupttodesursachen auf den meisten nichtkardiologischen Intensivstationen in den westlichen Ländern (Stone 1994). Um eine Einheitlichkeit in das Verständnis des septischen Krankheitsbildes zu bringen, mussten die Begriffe systemisch-inflammatorisches Reaktionssyndrom (SIRS), Sepsis und septischer Schock neu definiert werden.

Der Begriff des systemisch-inflammatorischen Reaktionssyndroms (SIRS) wurde 1992 von der Society of Critical Care Medicine (SCCM) und dem American College of Chest Physicians (ACCP) unter dem Vorsitz von Roger C. Bone geprägt. Mit dem Begriff des SIRS wurde ein klinisches Bild definiert, das Veränderungen der Herzfrequenz, der Atemfrequenz, der Körpertemperatur und der Leukozytenzahl beschreibt. Mindestens zwei der nachfolgend aufgeführten Kriterien müssen für die Diagnose des SIRS erfüllt sein (Tab. 1).

Tab.1: Kriterien zur Diagnose des systemisch-inflammatorischen Reaktionssyndroms.

Körpertemperatur	> 38 °C oder < 36 °C
Herzfrequenz	> 90 / min.
Atemfrequenz	> 20 / min. oder ein PaCO ₂ < 32 mmHg oder kontrollierte Beatmung
Leukozytenzahl	> 12 000 / mm ³ oder < 4000 / mm ³ oder > 10 % unreife Formen

Die Entstehung eines SIRS kann verschiedene Ursachen haben. Neben einer Infektion gehören auch andere nichtinfektiöse Erkrankungen wie Polytrauma, Ischämie, Gewebeerletzung oder Verbrennung dazu. Eine Sepsis liegt vor, wenn eine mikrobiologisch oder klinisch nachgewiesene Infektion die Ursache eines SIRS ist (Abb. 1).

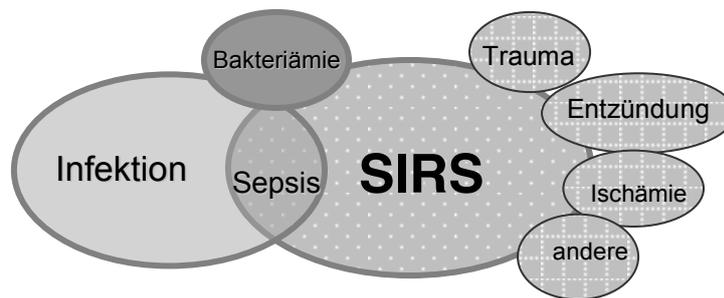


Abb.1: Das systemisch-inflammatorische Reaktionssyndrom (SIRS) im Zusammenhang mit Sepsis und Infektion

Von einer schweren Sepsis spricht man, wenn die Sepsis mit Zeichen der Organdysfunktion, wie Hypoperfusion oder Hypotension einhergeht. Weiterhin gelten die Laktatazidose, die Oligurie, oder eine akute Veränderung der Bewusstseinslage ohne andere erkennbare Ursachen als solche Zeichen.

Der septische Schock ist eine schwere Sepsis mit Hypotension trotz ausreichender Volumensubstitution. Er wird definiert durch einen systolischen Blutdruck unter 90 mmHg, einen Blutdruckabfall von mindestens 40 mmHg vom Ausgangswert, wobei andere Ursachen auszuschließen sind, oder den Einsatz von Vasopressoren (Bone 1992). Die schwerstwiegende klinische Folgeerscheinung von SIRS und Sepsis ist das Multiorganversagen, dem eine Organdysfunktion voran geht. Von einer Organdysfunktion spricht man, wenn ein Organ seine Funktion nicht mehr vollständig aufrechterhalten kann. Als

Multiorganversagen bezeichnet man das gleichzeitige oder in unmittelbarer Folge auftretende Versagen mindestens zweier Organsysteme (Tab. 2).

Tab.2: Definitionen der Folgeerscheinungen von SIRS und Sepsis (Bone 1992)

Schwere Sepsis	Sepsis mit Zeichen einer Organdysfunktion: Hypoperfusion oder Hypotension.
Septischer Schock	Schwere Sepsis mit Hypotension trotz ausreichender Volumensubstitution
Multiorgandysfunktion	Auftreten mehrerer Organdysfunktionen
Multiorganversagen	ohne Intervention gleichzeitiges oder in unmittelbarer Folge auftretendes Ausfallen mehrerer Organsysteme

Die Krankenhausmortalität für Sepsis ist in den letzten Jahrzehnten weiter angestiegen.

In Deutschland beträgt die Prävalenz für die Sepsis 12,4 %, für die schwere Sepsis einschließlich septischem Schock 11 %. Die erwartete Anzahl neu diagnostizierter Fälle mit schwerer Sepsis wird zwischen 76 und 110 Erwachsenen / 100.000 angegeben. Nach den neuesten Daten muss mit einer Intensiv- und Krankenhausletalität von 48,4 % und 55,2 % gerechnet werden (Engel 2007).

Nach Angaben des Center of Disease Control versterben in den USA jährlich ca. 200.000 Menschen an den Folgen einer Sepsis. Die Prävalenz einer Sepsis in den USA wird auf ca. 600.000 pro Jahr geschätzt, mit einer Inzidenz von ca. 300 auf 100.000 Einwohner ist die Sepsis somit eine der häufigsten Erkrankungen. Die geschätzten Krankenhauskosten belaufen sich auf ca. 17 Milliarden Dollar (Brunkhorst 2004).

Um die epidemiologischen Daten der Sepsis und ihrer Folgeerscheinungen für europäische hospitalisierte Patienten zu veranschaulichen wurde die im Jahr 2000 veröffentlichte Arbeit von Brun-Buisson herangezogen. Demnach erfüllten 33% aller Krankenhauspatienten die SIRS-Kriterien, wobei auf operativen Intensivstationen sogar über 80% diese Kriterien erfüllten. Insgesamt entwickelten ungefähr ein Drittel aller SIRS-Patienten eine Sepsis. Die Sepsis wurde bei circa 25% aller Intensivpatienten beschrieben, in mehr als 50% der Fälle entwickelte sich aus einer Sepsis eine schwere Sepsis. Für den septischen Schock hingegen war die Inzidenz deutlich niedriger. Für die Intensivpatienten lag sie bei 10%-15%, für stationäre Patienten bei 2%-3%. Bei circa 25% der Patienten entwickelte sich aus einer schweren Sepsis ein septischer Schock. Der septische Schock zeigte mit 40%-60% die höchste Mortalitätsrate. Schwere Sepsis und Sepsis führten bei 20%-40% bzw. 10-20% der Patienten zum Tod (Brun-Buisson 2000).

2.2. Pathophysiologie und Klinik

In der frühen Phase der Sepsis beobachtet man eine Aktivierung des unspezifischen Immunsystems mit dem klinischen Bild des SIRS und, bei Überaktivierung, einem möglichen konsekutiven Organversagen. Diese Hyperinflammation führt zu einer generalisierten Aktivierung von immunologischen Zellen und einer systemischen Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren.

Die Entstehung dieser proinflammatorischen Immunantwort kann unterschiedliche Ursachen haben. Endogene Faktoren wie die Nebenprodukte einer akuten Zellschädigung oder aktivierte Komplementfaktoren können Auslöser sein, sowie bakterielles Endo- und Exotoxin als exogene Stimulatoren. In dieser initialen Phase werden vermehrt Makrophagen und Monozyten stimuliert, die durch die Synthese von Interleukin 1 β (IL1 β) und Tumornekrose-Faktor α (TNF α) die Reaktion weiterleiten.

Kardiozirkulatorisches Versagen ist in dieser Phase eine der Hauptursachen für die Frühletalität von Patienten.

Nach dieser frühen Phase kommt es zu einer Gegenregulation, die durch vermehrte Freisetzung antiinflammatorischer Faktoren, wie z.B. Interleukin 10, Interleukin 4 und dem Transforming Growth Factor (TGF) β ausgelöst wird. Dieses wird als kompensatorisch antiinflammatorische Gegenreaktion (CARS: compensatory anti-inflammatory response syndrome) auf einen proinflammatorischen Reiz bezeichnet. Bei einer überschießenden Gegenregulation des Immunsystems in dieser Phase kann es zu einer Immunsuppression oder Anergie kommen. In dieser Phase ist der Patient besonders gefährdet für Sekundärinfektionen. Diese zwei Phasen können sich im Verlauf der Sepsis abwechseln, was als MARS (mixed antagonistic response syndrome) bezeichnet wird (Weigand 2003) (Abb. 2).

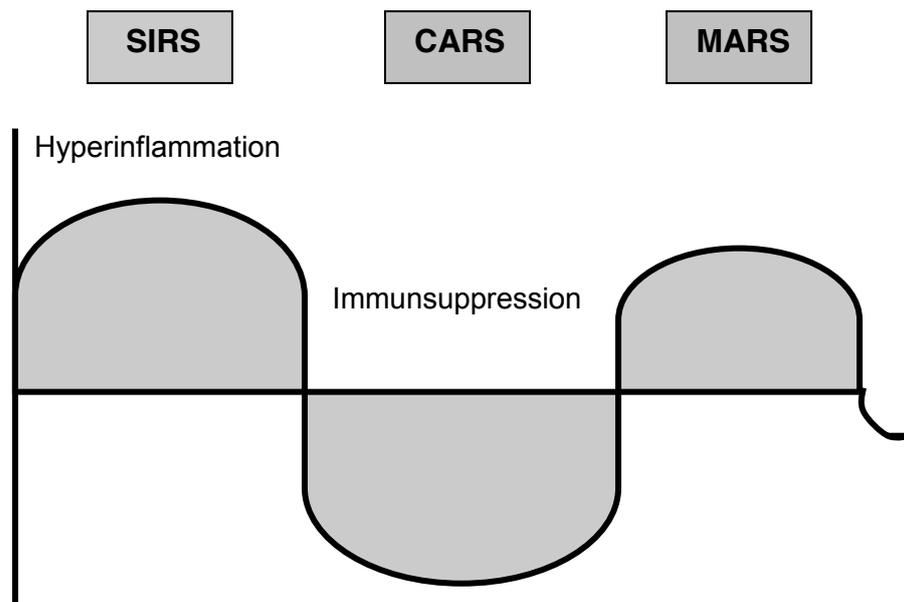


Abb.2: Phasen der Sepsis

SIRS: Systemic inflammatory response syndrome

CARS: compensatory anti-inflammatory response syndrome

MARS: mixed antagonistic response syndrome

Die in den unterschiedlichen Phasen der Sepsis freigesetzten Substanzen verursachen Schädigungen an Zellen und Endothel, welche die Grundlage für die Insuffizienz und das Versagen der verschiedenen Körperorgane sind.

Durch diese Zellschädigung kommt es zu einer Permeabilitätsstörung der Endothelmembranen, einer metabolisch-toxischen Schädigung der Zellen durch die direkte Einwirkung von zytotoxischen Mediatoren auf die Zellfunktion und die Zellstrukturen, sowie einer Hemmung der Sauerstoff-metabolisierenden Zellsysteme durch den spezifischen Effekt des Endotoxins, die sogenannte endotoxisch-hypoxische-Schädigung. Von grundlegender Bedeutung ist auch die Maldistribution des Blutflusses besonders im Bereich der Mikrozirkulation, die zu einer gestörten Verteilung von Sauerstoffbedarf und -versorgung führt. Als Pathomechanismus dieser Maldistribution des Blutflusses gilt der Verlust der Gefäßregulation als Folge der Endothelschädigung, eine Anhäufung regionaler Vasokonstriktoren sowie die Entstehung von Mikroembolien auf kapillärer Ebene (Schuster HP 1996).

Diese pathophysiologischen Abläufe führen in erster Linie zu respiratorischen und kardiozirkulatorischen Störungen sowie zur Beeinträchtigung der Nierenfunktion.

Im Bereich der Makrozirkulation wirken die Mediatoren bei der Sepsis vasoaktiv mit dem Resultat einer Vasodilatation und damit der Herabsetzung des peripheren Gefäßwiderstandes. Im Rahmen eines Kompensationsversuches kommt es in der sogenannten hyperdynamen Phase der Sepsis zu einer Tachykardie und Zunahme des Herzzeitvolumens (Wilson 1965). Weiterhin beobachtet man bei der Sepsis eine Myokarddepression, die sich besonders in der eingeschränkten Funktion des linken Ventrikels ausdrückt (Parker 1984). Ursachen dieser systolischen Ventrikelfunktionsstörung sind myokarddepressorische Substanzen, z.B. Tumor-Nekrose-Faktor oder Endotoxin im Serum, der metabolische Defekt der Myozyten und die Herunterregulation der β -Rezeptoren (septische Kardiomyopathie). Beim septischen Schock sind die beschriebenen Pathomechanismen der Verminderung des peripheren Widerstandes, die Myokarddepression und die Störung der Makrozirkulation am stärksten ausgeprägt.

Die Pathophysiologie der respiratorischen Störung der Sepsis basiert im wesentlichen auf einer verschlechterten Sauerstoffextraktion und -utilisation bei der, trotz ausreichenden Sauerstoffangebots, eine Gewebehypoxie vorliegen kann. Als Ursachen dieser Sauerstoffverwertungsstörung betrachtet man die Fehlverteilung von Sauerstoffzufuhr und Sauerstoffbedarf, die Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve und die Störung des oxidativen Zellmetabolismus (Schuster HP 1996).

Klinisch kommt es anfänglich zu einer meist akuten Verschlechterung des Allgemeinzustandes mit nachfolgendem Fieber und Schüttelfrost, in selteneren Fällen auch zu einer Hypothermie. Bei der Mehrzahl der Patienten zeigt sich eine Leukozytose, wohingegen eine Leukopenie eher selten auftritt.

Als Zeichen der respiratorischen Störung kann man eine Tachypnoe oder Hyperventilation beobachten. Zeichen der kardiozirkulatorischen Störungen belaufen sich auf Tachykardie und Blutdruckinstabilitäten mit hypotonen Werten. Die Gerinnung ist in der Regel aktiviert, die messbaren stoffwechselbedingten Veränderungen zeigen eine Hyperglykämie, einen Anstieg der Blutlaktatkonzentration sowie eine erhöhte Stickstoffausscheidung im Urin. Eine Niereninsuffizienz führt zu einer verminderten Diurese mit einer erniedrigten Kreatininclearance und einem Anstieg des Serumkreatinins. Eine septische Enzephalopathie kann sich in Zeichen von Verwirrtheit, Unruhe und Somnolenz mit zunehmender Bewusstseinsstrübung ausdrücken (Schuster HP 2000).

2.3. Immunsystem, Monozyten und das HLA-DR Antigen

Das Immunsystem, unter dem die angeborene und die erworbene Immunität verstanden werden, ist ein komplexes System zur Erhaltung der Individualstruktur durch die Abwehr körperfremder Substanzen, sogenannter Antigene, und die kontinuierliche Elimination anomaler Körperzellen. Zum Immunsystem gehören die Organe des lymphatischen Systems sowie Zellen und Moleküle, die im gesamten Organismus verteilt sind.

Die angeborene Immunität reagiert schnell und unspezifisch, die erworbene Immunität steht für Spezifität und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Die Leukozyten stehen im Zentrum der zellulären Immunantwort, neben ihnen nimmt auch eine Vielzahl von gewebeständigen Zellen an der Immunantwort teil. Die Kommunikation der Zellen erfolgt über verschiedene Mediatoren, zu denen Zytokine, Interferone und Komplement gehören.

Lymphozyten erkennen Pathogene und sind nach der entsprechenden Stimulation für die spezifische Immunantwort zuständig. Die B-Lymphozyten sind hierbei für die Antikörperproduktion verantwortlich. Zur Unterstützung fungieren Lymphozyten als T-Helferzellen, aber auch als zytotoxische Zellen, die Tumorzellen und Wirtszellen erkennen und abtöten.

Den Hauptbestandteil der zirkulierenden Leukozyten stellen die Granulozyten. Sie sind in der Lage in das Gewebe abzuwandern, ihre Hauptaufgabe ist die Phagozytose.

Monozyten sind zur Migration, Antigenpräsentation und Phagozytose befähigt. In ihrer Funktion als Phagozyten nehmen sie Pathogene auf um sie dann zu zerstören. Die Monozyten sind ebenfalls in der Lage in das Gewebe abzuwandern. Dort wandeln sie sich in Makrophagen um, deren Fähigkeit dann in der Antigenpräsentation gegenüber den T-Lymphozyten besteht. Die Überlebenszeit der Monozyten ist deutlich höher als die der Granulozyten.

Bei der humoralen Immunantwort handelt es sich um lösliche Mediatoren, deren Synthese in Leukozyten, Endothelzellen und Hepatozyten stattfindet.

Die Zytokine als Bestandteil dieser Gruppe sind in erster Linie für die Signalübermittlung während einer Immunantwort zuständig. Zu ihnen werden die Interleukine und Interferone gezählt. Das Komplementsystem setzt sich aus einer Gruppe von ca. 20 Serumproteinen zusammen. Zu ihren Funktionen zählen die Lyse von Bakterienmembranen, das Anlocken von Phagozyten, die sogenannte Chemotaxis, und die Ummantelung von Pathogenen zur Vorbereitung der Phagozytose, die Opsonierung. Diese Funktionen laufen bei der Aktivierung der Komplementfaktoren kaskadenartig ab. Zu den löslichen Mediatoren werden auch Antikörper und Immunglobuline gezählt, die von den B-Lymphozyten gebildet werden. Ihre Aufgabe ist das Binden der Antigene mit

der Bildung des Antigen-Antikörperkomplexes und die weitere Reaktion mit dem Immunsystem.

Die Monozyten spielen eine zentrale Rolle im Immunsystem. Sie sind Bestandteil sowohl der spezifischen als auch der unspezifischen Immunantwort. Die Monozyten sind in der Lage Zytokine aufzunehmen und freizusetzen, sie empfangen und senden so unterschiedliche Signale an andere Zellen.

Sie besitzen die Fähigkeit auf Fremdartigene mit einer T-Zell-vermittelten spezifischen Immunreaktion zu antworten. Verantwortlich für die Präsentation dieser Antigene ist der Haupthistokompatibilitätskomplex oder auch MHC (engl. Major Histocompatibility Complex), der beim Menschen auch als Humanes Leukozyten-Antigen (HLA) bezeichnet wird. Der HLA-DR Komplex ist polymorph, wird auf dem Chromosom 6 kodiert und gehört zu den Antigenen der Klasse II.

HLA-DR Antigene werden auf Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert. HLA-Klasse II Moleküle und damit das HLA-DR Antigen haben unterschiedliche funktionelle Aspekte. Auf Monozyten dient der HLA-DR Komplex vor allem der Präsentation von Antigenen und der Kommunikation mit Lymphozyten (Benacerraf 1988). Um diesen zellulären Bereich der Immunantwort zu messen gibt es verschiedene Testverfahren, wie z.B. die Messung der Phagozytoseaktivität oder die Erfassung der HLA-DR Expression auf Monozyten. Volk beschrieb 1996 den Begriff der „Immunparalyse“, die durch eine Monozytendeaktivierung in der hypoinflammatorischen Phase einer Sepsis gekennzeichnet ist. In dieser Phase beschreibt er weiterhin den Einsatz immunstimulierender, besonders monozytenaktivierender Faktoren wie z.B. Interferon γ oder GM-CSF als mögliche Therapieoption (Volk 1996).

2.4. Granulozyten-Makrophagen Kolonie Stimulierender Faktor

Granulozyten-Makrophagen Kolonie Stimulierender Faktor (GM-CSF) ist ein pleiotropes Zytokin mit einer Vielzahl von Funktionen und unterschiedlichen Wirkungen auf den Organismus.

Induziert wird das GM-CSF durch andere, „stromaufwärts“ gelegene Zytokine wie TNF- α , TNF- β , Interleukine 1 und 2 sowie Interferone.

Die Produktion und Ausschüttung von GM-CSF erfolgt durch eine Vielzahl von Makrophagen, T-Lymphozyten und aktivierten B-Zellen, aber auch durch andere Zelltypen wie z.B. Endothelzellen, Fibroblasten, Mastzellen (Goodall 1993).

Humanes GM-CSF ist ein Protein aus 127 Aminosäuren, seine Chromosomensequenz ist auf Chromosom 5 codiert und eng lokalisiert zu anderen Loci hämatopoetischer Wachstumsfaktoren wie IL3, IL4, IL5 sowie M-CSF (Makrophagen Kolonie Stimulierender Faktor). Das Protein GM-CSF besitzt weiterhin multiple glykolisierte Ketten und Disulfidbindungen, die essentiell für seine biologische Aktivität sind. Rezeptoren mit hoher Affinität zu GM-CSF wurden auf unterschiedlichen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen entdeckt.

Die Rezeptoren des GM-CSF sind auf Endothelzellen auffindbar, in 100-1000 facher Stärke aber auf den myeloiden Zellen lokalisiert. Keine Rezeptoren befinden sich hingegen auf lymphoiden oder erythroiden Zellen. Die Rezeptordichte nimmt mit dem Grad der Reifung der Zellen ab. Eine hohe Affinität des GM-CSF Rezeptors entsteht nur durch die Zusammenlagerung der beiden Untereinheiten des Moleküls. Es zeigt außerdem Ähnlichkeiten zu Rezeptoren anderer Wachstumsfaktoren auf, wie etwa denen für Interleukin 6, Interleukin 3 oder Erythropoetin (Lopez 1992).

GM-CSF wird benötigt für das Wachstum und die Differenzierung von frühen dendritischen Vorläuferzellen, es stimuliert Granulozyten- und Makrophagenprogenitorzellen, sowie Wachstum und Reifung von Monoblasten und Myeloblasten.

Neben der Reifung hämatopoetischer Zellen fördert GM-CSF die Funktion der differenzierten Zellen, es verlängert das Überleben von reifen Neutrophilen sowie Eosinophilen. Zu den weiteren Funktionen dieses Wachstumsfaktors gehört die Fähigkeit, durch Stimulation der Langerhanszellen der Haut diese zu dendritischen Zellen umzuwandeln. In nicht-hämatopoetischen Geweben kann GM-CSF das Einwandern und die Proliferation von Endothelzellen bewirken (Sakamoto 1991).

Als Entzündungsmediator ist GM-CSF ein chemotaktischer Faktor für neutrophile Zellen und Makrophagen. Es verstärkt die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen und fördert die Phagozytoseeigenschaft gegenüber Tumorzellen.

Die Expression von C3a Rezeptoren auf basophilen Zellen und ihre Stimulation führt zur Ausschüttung von Histamin und Leukotrienen und damit zu einer Hypersensibilisierungsreaktion. Ebenfalls kommt es durch GM-CSF zu einer vermehrten Arachidonsäureabgabe sowie einer Verstärkung des oxidativen Metabolismus. Weiterhin induziert GM-CSF die Synthese und Freisetzung zahlreicher Zytokine wie z.B. von Interleukin 1 und TNF- α aus Monozyten. Es verstärkt die Wirkung von Zytokinen wie Interleukin 1 und wirkt synergistisch mit Interleukin 3, Interleukin 4 sowie Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor (G-CSF).

Der als Medikament eingesetzte, rekombinant hergestellte Granulozyten Makrophagen-Kolonie Stimulierende Faktor (rhGM-CSF), Sagramostim (Leukine[®]), ist ein hämatologischer Wachstumsfaktor, der hauptsächlich die Granulozyten- und Makrophagenprogenitorzellen stimuliert. Die Hauptanwendungsgebiete des Wirkstoffes sind: Organ- und Knochenmarktransplantation, Mobilisation peripherer Blutprogenitorzellen, myelodysplastische Syndrome, Chemotherapie oder Neutropenie bei HIV oder akuter myeloischer Leukämie.

2.5. Immuntherapie und der Einfluss von Wachstumsfaktoren

Trotz großer Fortschritte bei den intensivmedizinischen und chirurgischen Behandlungsoptionen der Sepsis ist weiterhin eine hohe Morbidität und Mortalität dieses Krankheitsbildes zu verzeichnen (Brun-Buisson 2000, Angus 2001). Aufgrund der Komplexität des septischen Krankheitsbildes, der unterschiedlichen Pathomechanismen und der immer noch großen Unkenntnis vieler pathophysiologischer Hintergründe ist eine gezielte Immuntherapie besonders schwer durchzuführen. Gerade in diesem Bereich basieren einige Therapieansätze teilweise noch auf Vermutungen.

Unter Einbeziehung des unter 2.2 beschriebenen phasenweisen Verlaufs der Sepsis mit ihren hyperinflammatorischen und antiinflammatorischen Phasen wurden in der Vergangenheit verschiedene Therapiemöglichkeiten erwogen und zahlreiche Studien durchgeführt.

Um der Sepsis in der hyperinflammatorischen Phase entgegenzuwirken, wurde bereits 1960 versucht, die Immunantwort durch die Gabe von Glukokortikoiden zu dämpfen (Benett 1963). Andere Studien untersuchten die Gabe von Antiendotoxin (Freeman 2000), TNF-Antikörpern (Marshall 2000) oder rekombinanten IL-1ra zur Inhibition der IL-1 Aktivität (Arndt 2001).

Keine dieser Interventionsmöglichkeiten konnte die Mortalität wesentlich senken.

Volk stellte bei seinen Beobachtungen des septischen Krankheitsbildes heraus, dass Patienten, die sich in einer immunsuppressiven Phase (CARS) befinden, häufig an persistierenden Infektionen oder Organdysfunktionen leiden oder versterben. Diesen Zustand der Inkompetenz des Immunsystems belegte er mit dem Begriff der „Immunparalyse“. Diese Arbeitsgruppe stellte seit Mitte der 80er Jahre verschiedene Studien vor, die besonders die monozytäre HLA-DR Expression in vitro und in vivo untersuchten und diese Pathophysiologie mit dem klinischen Erscheinungsbild der Sepsis in Zusammenhang brachten. 1991 konnte der Funktionsverlust der Monozyten in vitro aufgezeigt werden. Die Wiederherstellung der Monozytenfunktionsfähigkeit und der HLA-DR Expression gelang durch die Stimulation mit Interferon γ und Granulozyten-Makrophagen Kolonie Stimulierendem Faktor.

Döcke untersuchte daraufhin in einer unkontrollierten Pilotstudie an neun Patienten, die eine verminderte HLA-DR Expression aufzeigten, den Einfluss von Interferon γ . Es zeigten sich bei den Patienten eine Verbesserung der Monozytenfunktion und ein Anstieg der HLA-DR Expression. Diese Ergebnisse wurden bisher nicht durch eine klinische Studie verifiziert (Döcke 1997).

Als Einsatz eines Wachstumsfaktors im Rahmen der immuntherapeutischen Behandlung der Sepsis wurden auch die Eigenschaften und Wirkungen des GM-CSF verwandten G-CSF (Granulozyten Kolonie Stimulierender Faktor) in einigen Studien untersucht. Der rekombinante Wachstumsfaktor zeigte sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Eigenschaften (Hartung 1995). G-CSF konnte zwar eine Reduktion bei der Inzidenz von nosokomialen

Infektionen bewirken, es konnte aber keine Verbesserung der Mortalität bei Sepsis nachgewiesen werden (Root 1999, Van der Poll 2000).

1998 untersuchte Williams die Eigenschaften von GM-CSF ex vivo. Er stellte heraus, dass eine monozytäre Anergie beim septischen Schock durch die GM-CSF Gabe ex vivo wiederhergestellt werden konnte (Williams 1998).

Perry verglich die GM-CSF Plasmaspiegel von septischen Patienten und gesunden Probanden und fand, dass die Plasmaspiegel der verstorbenen Patienten signifikant niedriger waren als die der gesunden Probanden (Perry 2002).

In einer kontrollierten Studie mit 60 Neonaten mit Neutropenie und den klinischen Zeichen einer Sepsis wurde durch die GM-CSF Gabe ein Anstieg der Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten bewirkt und eine Verminderung der Mortalität gezeigt (Bilgin 2001).

Presneill untersuchte die Auswirkungen von GM-CSF auf die Lungenfunktion bei septischen Patienten mit Lungenversagen (ARDS (engl.): adult respiratory distress syndrome) und konnte eine Verbesserung des Gasaustausches ohne die pulmonale Infiltration durch Neutrophile aufzeigen (Presneill et al. 2002).

In einer Pilotstudie konnten Nierhaus et al. bei neun Patienten mit Sepsis und verminderter monozytärer HLA-DR Expression einen signifikanten Anstieg der HLA-DR Expression durch die Gabe des Wachstumsfaktors GM-CSF demonstrieren (Nierhaus 2003).

Die vorliegende Untersuchung hatte zum Ziel, die Effekte des Wachstumsfaktors GM-CSF auf das septische Krankheitsbild zu untersuchen und seine Auswirkungen auf das Immunsystem mit Veränderungen der HLA-DR Expression auf Monozyten herauszuarbeiten.

3. Material und Methoden

3.1 Art der Studie, Patientenpopulation, Einschlusskriterien und Randomisierungsverfahren

Ziel dieser prospektiven, randomisierten und kontrollierten Studie war es, den Einfluss des Wachstumsfaktors GM-CSF auf die monozytäre HLA-DR Expression bei septischen Patienten zu ermitteln.

Nach Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg wurden 32 Patienten von zwei operativen Intensivstationen konsekutiv eingeschlossen.

Die Patienten erfüllten die *ACCP/SCCM* (Bone 1992) Kriterien für schwere Sepsis oder septischen Schock und waren zwischen 18 und 75 Jahre alt. Der Beobachtungszeitraum betrug mindestens drei bis maximal 21 Tage und endete mit dem Verlassen der Intensivstation oder dem Versterben des Patienten.

Alle Patienten wiesen seit mindestens 48 Stunden eine anhaltende Suppression der zellulären Immunantwort auf (HLA-DR auf Monozyten ≤ 200 MFI [mean fluorescence intensity] und zeigten fallende Werte für Interleukin 6 im Plasma. Ausschlusskriterien für die Teilnahme an dieser Studie waren Schwangerschaft oder Stillzeit, hämatologische Systemerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, eine laufende cytotoxische Chemotherapie sowie Patienten nach Organtransplantation. Weitere Gründe für einen Ausschluss waren eine Überempfindlichkeit gegen GM-CSF oder gegen Hilfsstoffe dieses Präparates (Mannitol, Citrat, NaHCO_3). Zum Studieneinschluss wurde das Einverständnis der Patienten oder ihrer gesetzlichen Vertreter nach ausführlicher Aufklärung durch einen der behandelnden Ärzte eingeholt.

Nach dem Einschluss in die Studie wurden die Patienten doppelblind randomisiert und einer Placebo- oder Verumgruppe zugeordnet. Die Randomisierung der 32 Patienten sowie die zeitnahe Herstellung des Verum- oder Placebopräparates erfolgten durch die Apotheke des Krankenhauses anhand einer von einem unabhängigen Mitarbeiter mittels Zufallsgenerator erstellten Randomliste. Nach Beendigung des Beobachtungszeitraumes der ersten 16 Patienten wurde eine geplante Aufdeckung der Zuordnung zu den

jeweiligen Untersuchungsgruppen durchgeführt, um gegebenenfalls Mortalitäts- oder Morbiditätsunterschiede oder Verum-bedingte Nebenwirkungen aufzudecken. Die abschließende Entblindung erfolgte am Ende der Beobachtungszeit aller 32 Patienten.

Mit dem Einschlusstag beginnend wurde 24-stündlich die Expression von HLA-DR auf Monozyten mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Zur späteren Bestimmung der GM-CSF Spiegel wurden täglich Plasmaproben bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, auch ein Differentialblutbild wurde 24-stündlich erstellt. Zusätzlich gemessene Parameter in diesem Zeitraum waren die Leukozytenzahl, das C-reaktive Protein, Interleukin (IL) 6 und Interleukin (IL)10, sowie Procalcitonin. Die Körpertemperatur der Patienten wurde kontinuierlich erfasst.

Für beide Patientengruppen wurden am Aufnahmetag sowohl der Acute Physiology And Chronic Health Evaluation Score (APACHE II, Knaus 1985) als auch der Simplified Acute Physiology Score (SAPS II, Le Gall 1993) erhoben. An allen weiteren Tagen des Beobachtungszeitraumes auf der Intensivstation wurden der Multiple Organ Dysfunction Score (MODS, Marshall 1995) und der Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA, Vincent 1996) bestimmt. Zudem wurde die Aufenthaltsdauer der Patienten auf der Intensivstation (length of stay [LOS]), die 28-Tage-Mortalität sowie die Intensiv- und Krankenhausmortalität erfasst. Die mikrobiologischen Daten wurden erhoben. Besondere Ereignisse, die durch die GM-CSF Gabe hätten hervorgerufen sein können, wurden dokumentiert.

3.2. Messung der HLA-DR Expression auf Monozyten

Funktion des Durchflußzytometers

Das Durchflußzytometer ist ein optisches Meßsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner, sich in einem Flüssigkeitsstrom befindlicher Partikel analysiert (Abb.3). Grundsätzlich sind zur durchflußzytometrischen Untersuchung Zellen jeglicher Herkunft geeignet, sofern diese einzeln und in Suspension vorliegen. Das allgemeine Anwendungsspektrum reicht von der Bestimmung von Zelloberflächeneigenschaften und Zelltypisierungen über

Zellzyklusanalysen bis zur funktionellen Untersuchung von intrazellulären Stoffwechselfvorgängen.

Das Durchflußzytometer misst unterschiedliche optische Qualitäten wie Lichtstreuung und Zellfluoreszenz. Als Fluoreszenz bezeichnet man die rasch abklingende Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlen.

Diese optischen Signale entstehen, wenn die Zellen in einer laminaren Strömung zu einem Analysepunkt geleitet werden um dort einzeln von einem fokussierten Lichtstrahl beleuchtet zu werden. Ein Detektions- und Verarbeitungssystem erfasst und quantifiziert dann die Signale der einzelnen Zellen.

Das Streulicht entsteht, wenn eine Zelle das Licht einer bestimmten Wellenlänge aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften mit unterschiedlicher Qualität und Quantität bricht. Größe und Granularität als Zelleigenschaften lassen sich so messen. Wenn eine Zelle den Lichtstrahl durchquert, wird das Licht in verschiedene Richtungen gestreut. Ein entstandenes Streulicht in Richtung des ursprünglichen Strahls, das Vorwärtsstreulicht (Forward Angle Light Scatter - FSC), wird vor allem von der Größe der Zelle beeinflusst. Das im 90° Winkel zum Lichtstrahl entstehende Seitwärtsstreulicht (Side Scatter - SSC) hingegen ist von der Granularität der Zelle abhängig. Anhand dieser Parameter lassen sich bereits die wichtigsten Zellpopulationen wie Leukozyten, Monozyten oder Lymphozyten unterscheiden. Weiterhin besteht auch die Möglichkeit zu einer fluoreszierenden Zellanalyse (FACS-Analyse: Fluorescence Activated Cell Sorting), einem Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Proteinen. Als Grundlage dient hier die Antigen-Antikörperreaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern (Fluorochromen) durchgeführt wird.

Zur Analyse werden die in einer Einzelsuspension vorliegenden Zellen durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Lichtstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. In der Durchflußzytometrie werden meist Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm zur Anregung der Fluorochrome verwendet. Auch eine gleichzeitige durchflußzytometrische Messung mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen ist möglich. Die eingesetzten Farbstoffe lassen

sich zwar über eine gemeinsame Wellenlänge anregen, verfügen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren. Da sich bei einer solchen Mehrfarbenfluoreszenzmessung dennoch verschiedene Fluoreszenzfarben überschneiden können, ist mitunter eine Korrektur der Messung nötig. Die aus den oben genannten Messungen entstandenen Werte werden anschließend mit einem speziellen Softwareprogramm ausgewertet (Raffael 1994).

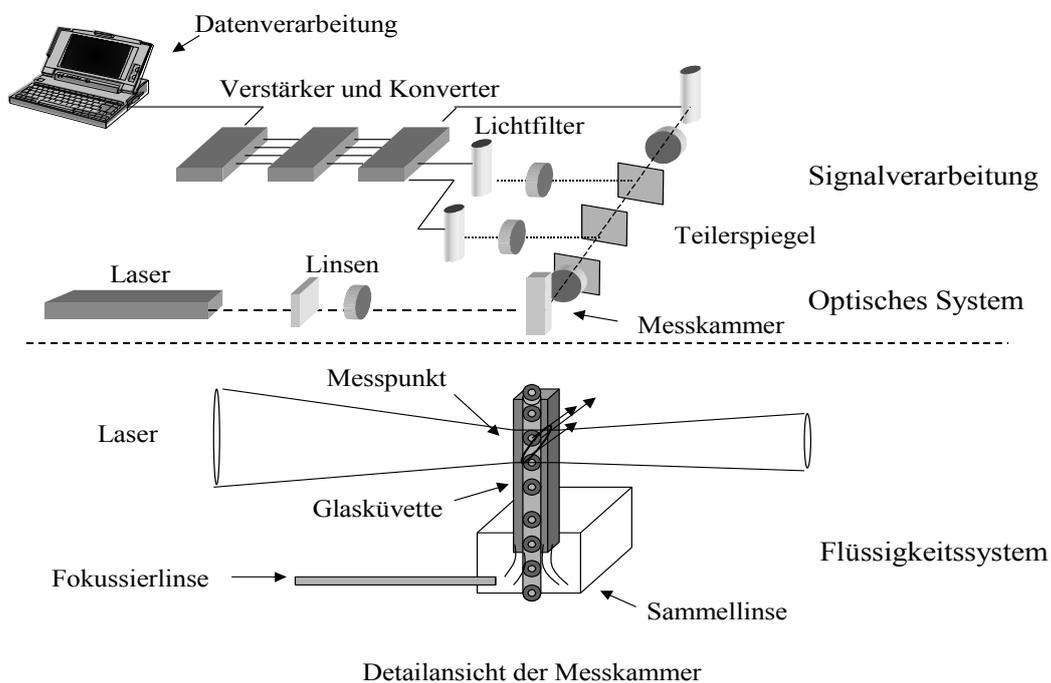


Abb. 3: Der Aufbau eines Durchflusszytometers mit einem optischen System, einem Flüssigkeitssystem und dem System zur Signalverarbeitung

Verwendete Antikörper und ihre Funktion

Um ein bestimmtes Merkmal einer Zelle untersuchen zu können, muss man es zunächst mit speziellen Antikörpern markieren, die eine fluoreszierende Gruppe tragen und sich an bestimmte Oberflächenantigene binden. Unterschiedliche

Oberflächeneigenschaften machen es möglich, Zellen verschiedener Populationen und Aktivität zu differenzieren.

Antigene, die mit fluorochrombesetzten Antikörpern markiert sind, leuchten beim Durchqueren des Lichtstrahls auf und werden vom Durchflußzytometer detektiert. Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen ist auch eine simultane Zweifarben-Analyse möglich, da jedes Fluorochrom Licht unterschiedlicher Wellenlänge ausstrahlt.

Zwei häufig verwendete Farbstoffe sind das Fluorescein (FITC) und das R-Phycoerythrin (PE). Zellen, die mit Fluorescein (FITC) markiert werden, leuchten bei einer Wellenlänge von ca. 515 nm im gelb-grünen Licht, während R-Phycoerythrin (PE)-markierte Zellen bei ca. 580 nm im orange-roten Licht ausstrahlen. Beide Farbstoffe können von einem Argonlaser bei 488 nm angeregt werden.

Ig G1 (Mouse)-PE

Diese mit PE konjugierte Mäuse-IgG1-Isotypiekontrolle mit dem monoklonalen Antikörper 679.1Mc7 bindet an unspezifische Strukturen und nicht an die spezifische Oberflächenantigenstruktur humaner Leukozyten. Meist sind diese unspezifischen Strukturen Bruchstücke von Zellen, an die nur wenige dieser Antikörper binden, so dass deren Leuchtintensität gering ist. Sie bilden die Negativkontrolle. Anhand der Negativkontrolle können die Grenzen für positive Fluoreszenzen festgelegt werden. Wenn andere Antikörper spezifisch an Zellen binden, ist ihre Leuchtintensität wegen der Anzahl ihrer Bindungen und der somit höheren Dichte auf der Struktur intensiver. Fluoreszenzen, die stärker leuchten als die der Negativkontrolle, werden als positiv gewertet.

CD 14 FITC

CD 14 FITC erkennt das humane Monozyten und Makrophagen Antigen. Der CD 14 Klon M ϕ P 9 wird von hybridisierten Mäusezellen gewonnen, die mit Monozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis immunisiert worden sind. Das CD 14 Antigen wird auf der Mehrheit der peripheren Monozyten und zum geringeren Teil auf Granulozyten exprimiert. Die Antigenstruktur entspricht der Membran des Glykoproteins 55 und bindet das Endotoxin aus der Zellwand gramnegativer Bakterien.

Anti-HLA-DR PE

Dieser Antikörper erkennt das humane MHC-Klasse-II-Molekül (Haupthistokompatibilitätskomplex). Dieser Komplex ist ein transmembranöses Glykoprotein bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 36 und 27 Kilodalton (kd). Das HLA-DR Oberflächenantigen wird auf zahlreichen Zellen wie B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen sowie aktivierten T-Lymphozyten, aktivierten natürlichen Killerzellen (NK) und humanen Stammzellen exprimiert. Anti-HLA-DR reagiert mit dem HLA-DR-Komplex, wobei keine Kreuzreaktivität mit HLA-DQ oder HLA-DP Molekülen besteht. Der Anti-HLA-DR Klon L243 ist abgeleitet von hybridisierten Mäusezellen, die mit humanen Lymphoblasten der B-Zelllinie immunisiert wurden.

Material

Durchflußzytometer

FACS Calibur System, Becton Dickinson

Datenverarbeitungssystem: Apple Macintosh, Power Mac

Auswertungsprogramm: Cell Quest v3.3TM und Cell Quest Pro

Kühlzentrifuge

Hettich, Rotixia/A, Y2K lfd.Nr.:05866

Analyseröhrchen

Falcon 2052

Falcon, Oxnard CA, USA

FACS Lysing Solution

Becton Dickinson

Phosphate Buffered Saline (PBS)

CaCl₂, MgCl₂

GIBCO, Invitrogen life technologies

Isotypkontrolle

Ig G1 (Mouse)-PE

Beckman Coulter Company

Frankreich, Marseille

CD 14 FITC

Klon MφP 9

BD Biosciences, USA

Anti-HLA-DR PE

Klon L 243

BD Biosciences, USA

Methode

Nach dem Erfüllen der Einschlusskriterien wurden den Patienten täglich während des Beobachtungszeitraumes ca. 3ml EDTA-Blut abgenommen, umgehend gekühlt und innerhalb der nächsten Stunde verarbeitet.

Für die Probenvorbereitung und Durchführung der Färbung wurden in zwei Ansätzen je 5 µl der entsprechenden Antikörper vorgelegt,

1. Ansatz: CD 14 FITC / Ig G1 (Mouse)-PE (Negativkontrolle)

2. Ansatz: CD 14 FITC / Anti-HLA-DR PE

und im weiteren 100 µl Vollblut hinzugefügt. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur für ca.10-15 Min. im Dunkeln inkubiert. Danach wurde zu den Proben jeweils 2 ml oben genannter Lysing solution hinzugefügt um eine Lyse der Erythrozyten zu erreichen. Diese Erythrozytendepletion diente der Einsparung von Reagenzien durch Entfernung von unspezifisch färbbaren

Zellen und der Verkleinerung des Färbolumens. Zur Lysierung wurden die Proben erneut für 10 min. im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zentrifugation mit einer Geschwindigkeit von 1800 U/min. gestoppt. Anschließend wurde der Überstand der Proben abgesaugt, erst mit 2 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) versetzt, dann erneut bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert und mit 1 ml der gleichen Pufferlösung resuspendiert. Mit den bearbeiteten Proben konnte nun die FACS-Messung durchgeführt werden.

Auswertung der Oberflächenmarkierungen

Nach Inbetriebnahme und Kalibration des FACS-Gerätes sowie der nötigen Einstellungen des Softwaresystems werden die Zellpopulationen der Proben durch den Argonlaser angeregt und im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC bzw. SSC) betrachtet.

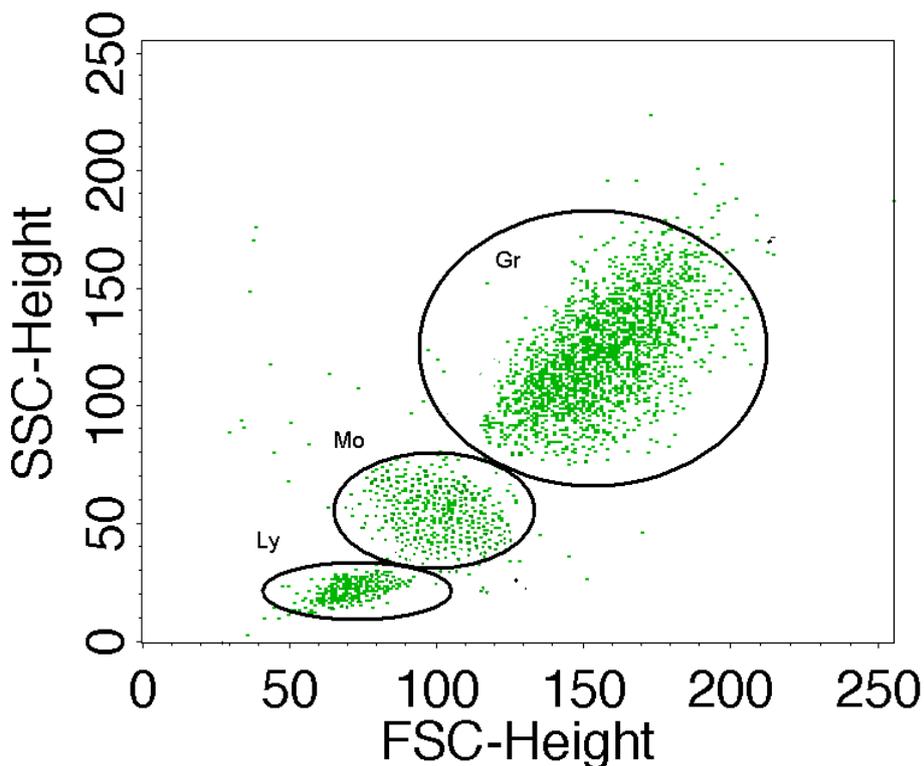


Abb. 4: Darstellung eines Streulicht-Histogramms. Es lassen sich Granulozyten (Gr), Monozyten (Mo) und Lymphozyten (Ly) anhand von Grösse und Granularität unterscheiden.

(FSC-Height: Intensität des Vorwärtsstreulichtes, SSC-Height: Intensität des Seitwärtsstreulichtes).

In diesem Streulicht-Histogramm kann die Qualität der Probe beurteilt werden. Durch die Intensitätseinstellungen des Lasers sollten alle Zellen im zu betrachtenden Bereich liegen. Um die Streulicht-Messergebnisse anschaulich darzustellen, werden die Zellen in einer besonderen Graphik, einem

sogenannten Dot-Plot, gezeigt. Partikel, die besonders klein sind, werden als Verschmutzung angesehen und liegen weiter links im Streulichthistogramm. Sie können über das Setzen einer Schwelle, dem so genannten Threshold, von der Auswertung ausgeschlossen werden. Dann wird die mit der Negativkontrolle (Ig G1 Mouse-PE) gefärbte Probe betrachtet. Durch diese Färbung können die Grenzen für die positive Fluoreszenz festgelegt werden.

Im nächsten Schritt soll der Anteil HLA-DR tragender Monozyten dargestellt werden.

Dafür wird die mit CD 14 FITC und Anti-HLA-DR PE gefärbte Probe betrachtet. Um die gewünschten Monozyten optimal darstellen zu können, müssen die gemessenen Daten zunächst eingegrenzt werden. Die einfachste Methode, eine Monozytenauswahl zu treffen, ist die Einstellung CD14 versus Sidescatter (SSC).

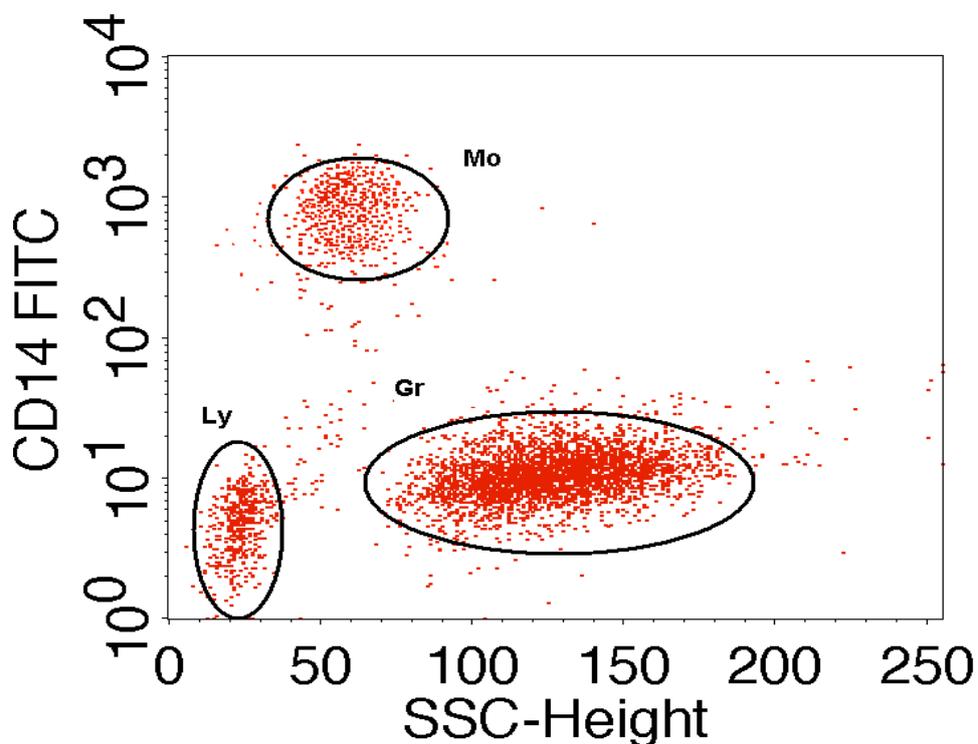


Abb. 5: Betrachtung der Zellpopulationen: Granulozyten (Gr), Monozyten (Mo) und Lymphozyten (Ly) in der Einstellung CD 14 FITC versus Seitwärtsstreulicht (SSC)

Das Setzen eines „Gates“ (engl.: Tor) ist eine wichtige Auswertetechnik der Durchflusszytometrie, deren Ziel es ist Zellen auszuwählen. Dabei wird ein Gate um die Punktwolke der Monozyten des Streulichthistogramms gesetzt.

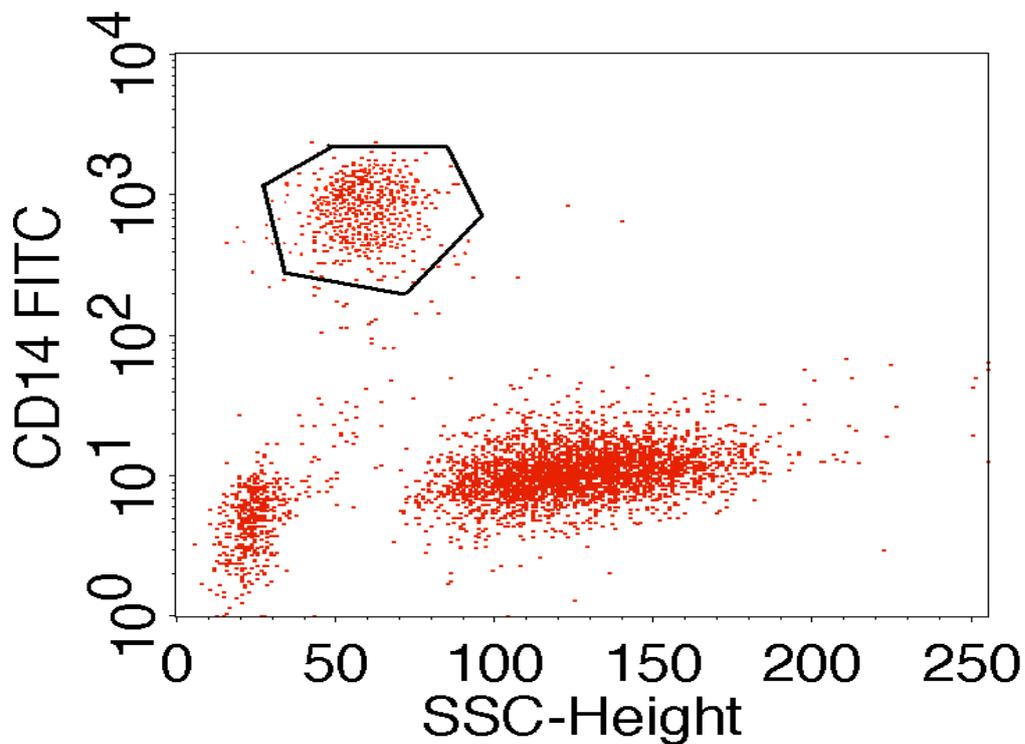


Abb. 6: Einstellung CD 14 FITC versus Seitwärtsstreulicht (SSC) mit im Gate liegenden Monozyten

In der nächsten Graphik werden dann nur die mit Gate versehenen Monozyten dargestellt.

Bei Methode der FACS-Durchflusszytometrie wird der Anteil der HLA-DR positiven Monozyten in Prozent gemessen und betrachtet.

Es wird die Immunfluoreszenz auf dem quantitativen Weg bestimmt, d.h. die Fluoreszenzintensität ausgewertet. Die kontinuierliche Expression von HLA-DR auf Monozyten, als gebräuchliche Form für die Analyse der Fluoreszenzintensität, wird als Mittelwert kalkuliert. Das Ergebnis wird als mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity [MFI]) des HLA-DR-Antigens auf Monozyten ausgedrückt.

Bei standardisierten Einstellungen und Reagenzien wurden Durchschnittswerte der mittleren HLA-DR Fluoreszenzintensität oberhalb von 250 MFI als normal eingestuft. Werte zwischen 150 und 250 liegen in einem Zwischenstadium (Übergangsphase) und Werte unterhalb von 150 MFI korrelieren mit einer schlechten Prognose. (Nebe, CT 1998). Aufgrund dieser Werte wurde ein interner Grenzwert von 200 MFI für diese Studienpopulation gewählt.

3.3. Erfassung von Infektionen, Erkrankungsschwere und klinischem Verlauf

Erfassung der Infektionen

Für die Infektionserhebung in der Studie wurden die allgemeinen CDC-Definitionen (Centers for Disease Control, Atlanta, USA) herangezogen (CDC-Definitionen Robert Koch-Institut, Berlin 2003). Diese Definitionen gelten für alle Infektionen und alle Patienten unabhängig vom Lebensalter. Als Reaktion auf Mikroorganismen oder ihre Toxine müssen lokale oder systemische Infektionszeichen vorliegen. Bei der nosokomialen Infektion dürfen keine Hinweise existieren, dass die Infektion bereits vor der Aufnahme in ein Krankenhaus bestand oder sich bereits in der Inkubationsphase befand. Die Entscheidung über das Vorliegen einer Infektion kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Es kann unter Berücksichtigung klinischer Befunde wie diagnostischer Untersuchungen (Röntgen, CT, MRT, Biopsien, Punktionen) beruhen oder durch Ergebnisse der Labormedizin wie mikrobiologischer Befunde oder mikrobiologischer Nachweismethoden erfolgen. Auch die Diagnose des behandelnden Arztes, die aus der direkten Beobachtung, z.B. während einer Operation resultiert, wird als Kriterium für Infektionen nach den CDC-Definitionen gewertet.

Als postoperative Wundinfektion im Sinne der CDC-Kriterien gelten Infektionen, die innerhalb von 30 Tagen nach der Operation auftreten bzw. mit ihr im Zusammenhang stehen und eines der folgenden Kriterien aufweisen: positiver mikrobiologischer Befund, lokalisierter Schmerz, Schwellung, Rötung oder

Berührungsempfindlichkeit oder Diagnosestellung durch den behandelnden Arzt.

Um von einer Infektion der Atemwege nach den CDC-Kriterien zu sprechen, müssen klinische Symptome und Zeichen (Rasselgeräusche, Verschattungen im Röntgen thoraxbefund) vorhanden sein. Weiterhin müssen entweder eine positive Blutkultur, eine Veränderung im Sputum oder die Isolierung eines ätiologisch in Frage kommenden Erregers aus dem Trachealsekret oder einer bronchoalveolären Lavage die Infektionsdiagnose unterstützen.

Die Peritonitis als intraabdominelle Infektion nach den CDC-Kriterien kann als solche betrachtet werden, wenn z.B. ein positiver kultureller oder histopathologischer Nachweis aus intraoperativ oder durch Punktion gewonnenem eitrigem Material vorhanden ist und zusätzlich eine kulturelle Isolierung eines Mikroorganismus aus den Sekreten eines Drainagesystems gelingt.

Erfassung der Erkrankungsschwere

Zur Erfassung der Erkrankungsschwere wurden Scoresysteme herangezogen. Seit Einführung dieser Systeme wurden Scores zur Klassifizierung des Krankheitsschweregrades und Stratifizierung von Patientengruppen erhoben während sie zur Abschätzung der Individualprognose ungeeignet sind (Unertl und Kottler 1997).

Um die Erkrankungsschwere der Patienten zu bestimmen wurden die universell einsetzbaren Scores, der Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (APACHE II) Score als auch der Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) erhoben. Der 1985 modifizierte APACHE II Score von Knaus et al. ist einer der am häufigsten verwendeten Scoresysteme mit prognostischer Aussagekraft. Er wird aus 12 physiologischen und biochemischen Parametern erhoben, die mit Punktwerten von Null (normale Werte) bis vier (pathologischster Wert) skaliert werden, wobei das Alter und chronische Vorerkrankungen berücksichtigt werden. Die Aussagekraft des APACHE II Score bezogen auf die Mortalität wurde bei über 6000 Intensivpatienten an 13 unterschiedlichen Krankenhäusern bestimmt. Diese Validierung der Datenerhebung bezieht sich auf die ersten 24 Stunden des Intensivaufenthaltes.

Die primäre Fassung des SAPS Score von 1984 von Le Gall et al. sollte eine praktikablere Form der APACHE Fassung darstellen. Alter und neurologischer Status der Patienten wurden anders bewertet und es erfolgte eine Reduktion der erhobenen physiologisch-biochemischen Werte (Bein 1993). Der SAPS II Score wurde dann 1993 als weiterentwickelte und vereinfachte Form des APACHE II Score eingeführt. Dieses Scoresystem wurde an einem großen Kollektiv von über 13000 Patienten validiert, wobei auch europäische Intensivstationen einbezogen wurden. Der SAPS II Score gehört ebenfalls zu den häufig verwendeten Scoresystemen und wird auch innerhalb der ersten 24 Stunden des Intensivaufenthaltes erhoben. Es ist möglich, dem berechneten Scorewert ein individuelles Letalitätsrisiko („predicted mortality“) zuzuordnen. Die Erhebung und Berechnung der verschiedenen Scorewerte erfolgte mit dem Hamburg Intensive CAre Scoring Tool (HICAST). Dieses Datenprogramm erleichtert die Eingabe der verschiedenen Werte, die für die entsprechenden Scores benötigt werden, da die Daten gemeinsam und nur einmalig erhoben werden müssen und so die Berechnung der einzelnen Scorewerte beschleunigt wird.

Erfassung des klinischen Verlaufs

Im Gegensatz zu den beiden oben genannten prädiktiven Scoresystemen werden zur Erfassung des klinischen Verlaufs der Multiple Organ Dysfunction Score (MODS) und der Sepsis-related organ failure assessment (SOFA) Score herangezogen. Diese Verlaufscores wurden entwickelt um den Schweregrad eines Multiorganversagens vergleichen und das Mortalitätsrisiko abschätzen zu können (Marshall 1995).

Der MOD-Score wurde aus einer retrospektiven Analyse von Literaturrecherchen entwickelt, die Aussagekraft bezüglich der Mortalität (n=336) wurde überprüft und festgelegt. Der MODS-Score betrachtet sechs Organsysteme (Atmung, Herz-Kreislauf-System, Gerinnung, Zentrales Nervensystem, Leber- und Nierenfunktion), wobei jeweils ein Wert, der zu einer bestimmten Tageszeit dokumentiert wird, in die Bewertung einfließt und nicht wie bei den übrigen Scoresystemen der schlechteste Wert innerhalb von 24

Stunden. Die Werte werden in eine Punkteskala von null bis vier eingeordnet, wobei null eine annähernd normale Organfunktion beschreibt.

Der SOFA Score wurde 1994 durch eine Arbeitsgruppe der European Society of Intensive Care Medicine entwickelt (Vincent 1997).

Dieser Score sollte speziell bei Patienten mit Sepsis als Hauptursache eines Multiorganversagens angewendet werden und die Entwicklung im zeitlichen Verlauf darstellen. Auch hier werden die gleichen sechs Organsysteme wie beim MOD Score betrachtet und Punktwerte auf einer Skala von null bis vier vergeben, wobei null wieder eine normale Organfunktion und vier ein Organversagen aufzeigen. Aus der Summe dieser Punktwerte ergibt sich ein Gesamtscore, der im zeitlichen Verlauf als Grafik dargestellt werden kann. Auch die Erfassung und Berechnung dieser Scorewerte wurde mit dem HICAST Programm durchgeführt. Weiterführend wurde, bezugnehmend auf den Delta MODS-Wert von J. Marshall (Marshall 1997), in dieser Studie der Delta MODS-Wert für die respiratorische Funktion erhoben. Mit dem Delta MODS von Marshall kann die Organdysfunktion über die Zeit beobachtet werden. Es wird die Differenz zwischen dem gesamten MODS Wert des jeweiligen Tages und dem MODS Wert des Aufnahmetages kalkuliert. So können fortlaufend über die gesamte Behandlungszeit für jeden einzelnen Tag die Delta MODS-Werte erhoben und Veränderungen festgestellt werden.

In dieser Studie wurde der Delta MODS-Wert für den Gasaustausch aus der Differenz des ersten (Tag 1) und dritten Tages (Tag 3) errechnet. Tag 1 wurde als Ausgangstag vor der ersten Verum- oder Placebogabe gewählt. Der dritte Tag wurde gewählt, da zu diesem Zeitpunkt bereits eine zweimalige GM-CSF-Gabe erfolgt war und ggf. eine frühe Verschlechterung des Gasaustausches sichtbar würde. Die respiratorische Funktion des Patienten nach dem MOD-Score wird durch den Oxigenierungsindex nach Horowitz bestimmt. Hier wird die Sauerstoffkonzentration der Inspirationsluft zu dem arteriellen Sauerstoffpartialdruck in Verhältnis gesetzt um den Oxigenierungsgrad abzuschätzen. Man teilt den arteriellen Sauerstoffpartialdruck (P_aO_2) durch die inspiratorische Sauerstoffkonzentration (F_iO_2). Der Normwert des Oxigenierungsindex (P_aO_2/F_iO_2) sollte mehr als 450 mmHg betragen.

Die Delta MODS-Werte der einzelnen Patienten wurden für die jeweilige Verum- oder Placebogruppe addiert und als Summenwerte und Spanne

angegeben, wobei höhere Summenwerte für eine schlechtere respiratorische Funktion stehen.

Neben den genannten Scorewerten wurden die Vitalparameter der Studienpatienten durchgehend überwacht. Die Körpertemperatur der Patienten und das Auftreten von Fieber wurden erfasst. Werte, die eine Körpertemperatur von 38,5° C am zweiten und dritten Tag im Rahmen der beginnenden Verum- oder Placebogabe überschritten, wurden dokumentiert.

Ein besonderes Augenmerk wurde auf die möglichen verumbedingten Nebenwirkungen gelenkt, wobei im Besonderen die Entwicklung hämatologischer Werte wie Thrombozyten- und Leukozytenzahl im Vordergrund standen. Eine Thrombozytopenie von unter 50 Mrd/l wurde dokumentiert sowie eine Leukozytose von mehr als 60/nL. Überwachung und Dokumentation erfolgten durch das Patientendatenmanagementsystem (CliniComp, San Diego, USA) der Klinik für Intensivmedizin.

3.4. Voraussetzungen und Durchführung der GM-CSF Gabe

Nach Erfüllen der unter 3.1 aufgeführten Einschlusskriterien, Erhalt des Einverständnisses und nach Randomisierung in Placebo- oder Verumgruppe und Erhebung der studienrelevanten Parameter wurden die Patienten gemäß folgenden Ablaufplanes behandelt:

An den ersten zwei Tagen des Studienzeitraumes (Tag 0 und 1) wurde bei einer vorbestehenden HLA-DR Expression von unter 200 MFI über 48 Stunden nun täglich nach Erhalt der Laborwerte und Vitalparameter und nach der zeitnahen Herstellung des Placebo- oder Verumpräparates dieses verblindet in einer gebrauchsfertigen Spritze geliefert und dem Patienten verabreicht. Das Verumpräparat Leukine® (Sagramostim) wurde in einer gebrauchsfertigen Spritze durch die Klinikapotheke geliefert und dem Patienten mit einer Dosis von 4 µg/kg Körpergewicht subcutan verabreicht. Ebenso wurde mit dem Placebopräparat verfahren.

Der Studienpatient wurde durchgehend auf systemische oder lokale Reaktionen des möglichen Verumpräparates überwacht. Alle Beobachtungen wurden zeitnah dokumentiert.

Wenn die HLA-DR-Expression am zweiten Tag des Studienzeitraumes unterhalb eines MFI-Wertes von 500 blieb, wurde die Placebo- oder Verumgabe fortgeführt. Bei einem Überschreiten des Wertes wurde die Gabe beendet.

An den nachfolgenden Tagen (drei bis 21) wurde ähnlich verfahren: Bei einem Anstieg der HLA-DR-Expression über 500 MFI wurde die Placebo- bzw. Verumgabe ausgesetzt, bei einem erneutem Abfall der HLA-DR Expression unterhalb von 200 MFI wurde die Gabe der Studienmedikation wieder aufgenommen, bis ein erneutes Überschreiten des MFI Wertes von > 500 gemessen wurde.

3.5. Messung der weiteren Parameter

Die Leukozytenzahl

Leukozyten nennt man die weißen Blutzellen, unter denen man Granulozyten (60-70%), Lymphozyten (20-30%) und Monozyten (2-6%) zusammenfasst. Monozyten zirkulieren fortwährend im Blut und sind Vorläuferzellen der Makrophagen. Diese phagozytierenden Zellen spielen in der angeborenen Immunität eine entscheidende Rolle und fungieren als antigenpräsentierende Zellen sowie als Effektorzellen bei der humoralen und zellulären Immunreaktion.

Bei infektiösen Erkrankungen kommt es zu phasenweise ablaufenden Veränderungen der Leukozytenzahl und der prozentualen Verteilung der Zelltypen, die mit dem Differentialblutbild erfasst werden können. Bei einer Entzündungsreaktion werden verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren ausgeschüttet, die vielfältige Effekte auf die Leukozyten haben. GM-CSF und G-CSF führen zum Beispiel zu einer Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen sowie zu deren Freisetzung aus dem Knochenmark. Durch das Zytokin Interleukin 8 kommt es zu einer Abwanderung von Leukozyten in entzündete Gewebe und andere lymphatische Organe. In der klinischen Praxis gehört die Messung der Leukozytenzahl nicht nur auf der Intensivstation zur täglichen Routine und zum Standardmonitoring.

Der Normwert der Leukozytenzahl liegt zwischen 4,5 bis 11,5 Mrd/L und wird mittels Streulicht- oder Impedanzmessung im Zellcounter bestimmt.

Das C-reaktive Protein

Das C-reaktive Protein (CRP) ist das Protein der klassischen Akute-Phase-Reaktion auf einen entzündlichen Stimulus. Seine Bestimmung dient unter anderem zur Erkennung systemischer Entzündungsreaktionen (Sierra 2004). Es wird ausschließlich von den Hepatozyten gebildet und besteht aus fünf identischen Polypeptidketten in Form eines Ringes. Seine Freisetzung und Produktion wird von IL6 stimuliert.

Die CRP Konzentration steigt in Gegenwart inflammatorischer Prozesse innerhalb von 24-48 Stunden stark an, fällt dann nach erfolgreicher Behandlung innerhalb von zwei bis drei Tagen wieder auf Normalwerte ab, die sich in der Regel unterhalb von 5 mg/L befinden. Das C-reaktive Protein erkennt fremde molekulare Strukturen und bindet an unterschiedliche Liganden wie Lipoproteine oder bakterielle Zellteile. Komplextiertes CRP aktiviert das Komplementsystem beginnend bei Cq1. CRP initiiert die Opsonierung und Phagozytose eingedrungener Zellen, seine Hauptaufgabe liegt aber im Binden und Entgiften von toxischem körpereigenem Material nach Gewebsläsionen. Zur CRP-Bestimmung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung: Die Nephelometrie, ein Verfahren, das die Konzentration gelöster Substanzen durch die Intensität eines Streulichts misst, die Immunturbidimetrie, eine der Nephelometrie und Photometrie verwandte Methode oder ein Test, der auf dem Prinzip der Immunagglutination beruht.

Interleukin 6

Interleukin 6 (IL6) gehört zu der Klasse der vorwiegend proinflammatorischen Zytokine. Eine Vielzahl von Zellen, T-Zellen oder Hepatozyten, sind in der Lage IL6 zu produzieren, seine Freisetzung erfolgt jedoch hauptsächlich durch die Stimulation anderer Zytokine, die von Monozyten und Endothelzellen ausgeschüttet werden (Blackwell 1996).

IL 6 induziert die Bildung von Akute-Phase-Proteinen, beeinflusst die B-Zell Aktivierung und Blutbildung, erhöht die Thrombozytenzahl und die Zahl der Immunglobuline.

Dieses Zytokin ist ein häufig verwendeter Parameter zur Inflammationsdiagnostik, da es bei Entzündungen, Hypoxie und Gewebeschäden innerhalb von wenigen Stunden ansteigt (Harbarth 2001). Der Normwert von IL 6 liegt unter 11 ng/L, wobei die Befundmitteilung innerhalb von siebzig Minuten möglich ist. Gemessen wird dieser Parameter mit einem Chemilumineszenz-Immunoassay mit einem halbautomatischen Elisa (ELISA: engl. Abk. f.: enzyme-linked immunosorbent assay) Immulite[®], der eine deutlich schnellere Diagnostik im Vergleich zur konventionellen ELISA-Technik bietet und eine höhere Standardisierung der Ergebnisse ermöglicht.

Interleukin 10

Interleukin 10 (IL 10) ist ein vorwiegend antiinflammatorisches Zytokin. IL 10 wird produziert von aktivierten T-Zellen, T-Helferzellen, Mastzellen und von lipopolysaccharid-aktivierten Monozyten. Die Synthese von IL 10 durch Monozyten wird durch Interleukin 4 als auch durch Interleukin 10 inhibiert, das auch die Synthese zahlreicher Zytokine wie Interferon-gamma (IFN γ), Interleukin 6, Interleukin 2 und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) supprimiert. Weiterhin ist es ein physiologischer Antagonist von Interleukin 12 sowie Costimulator bei der Proliferation von Mastzellen und peripheren Lymphozyten (Oberholzer 2002).

IL 10 wird ebenfalls mit einem Chemilumineszenz-Immunoassay in einem halbautomatischen Elisa (Immulite[®]) gemessen.

Procalcitonin

PCT ist ein Prohormon des in der Schilddrüse von den C-Zellen gebildeten Calcitonins und wird seit 1996 primär zur Diagnostik von bakteriellen Erkrankungen und zur frühen Detektion von infektiösen Komplikationen in der Intensivmedizin verwendet. PCT als proinflammatorischer Parameter wird

neben dem Monocyten/Makrophagensystem und den Zytokinen hauptsächlich von dem bakteriellen Endotoxin (LPS) stimuliert.

Erhöhte PCT-Spiegel wurden auch bei Organdysfunktion, Sepsis, septischem Schock, systemischen inflammatorischen Reaktionen sowie nach großen Operationen und nach extrakorporaler Zirkulation gefunden.

Normale PCT Konzentrationen in Plasma und Serum liegen im Bereich von unterhalb 0.5 ng/ml. PCT Werte über 0,5 ng/ml können eine akute Infektion signalisieren, dezente Erhöhungen der PCT Konzentrationen von 0.5 bis 2.0 ng/ml wurden bei leichten systemischen bakteriellen Infektionsreaktionen gemessen. Besonders hohe Werte von über 10 ng/ml bis zu 1000 ng/L wurden bei Patienten mit sicherer Sepsis oder septischem Schock (ACCP/SCCM) sowie Multiorganversagen (MOV) festgestellt. Die Messung von PCT erfolgt mit dem LUMItest PCT[®], einem immunoluminometrischen Assay (ILMA) innerhalb von zwei Stunden. Zwei antigenspezifische monoklonale Antikörper, von denen einer lumineszierend ist, binden an die Procalcitoninmoleküle von unterschiedlichen Seiten (Sandwichcomplex). Das durch das Luminometer gemessene Lumineszenzsignal nach der Reaktion ist direkt proportional zu der PCT Konzentration der Probe (Meisner 2000).

3.6. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des SPSS (Statistical Package for the Social Science; V 9.0, Chicago, USA). Zur Differenzierung der Verteilung einer Stichprobe wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewendet. Je nach dem wurde zum Vergleich unabhängiger Stichproben für eine nicht-parametrische Verteilung (Nicht-Normalverteilung), der Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (U-Test) und für eine parametrische Verteilung (Normalverteilung) der t-Test herangezogen.

Zur Untersuchung des Einflusses einer oder mehrerer unabhängiger Variablen auf eine abhängige Variable wurde eine Univariateanalyse, gegebenenfalls mit Messwiederholung, nach dem allgemeinen linearen Modell durchgeführt. Für die Berechnung dichotomer Zielgrößen wurde ein Vierfelder-Test verwendet und mittels eines χ^2 -Tests auf Unabhängigkeit untersucht.

Als Lagemaß bei Normalverteilungen wurde der Mittelwert berechnet; wenn es sich nicht um eine Normalverteilung handelte, wurde der Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean [SEM]) angegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Demographie

Im Zeitraum von Anfang März 2003 bis Ende März 2004 wurden 32 Patienten in die Studie eingeschlossen.

In der nachfolgenden Tabelle werden die demographischen Daten der untersuchten Population dargestellt und hinsichtlich Placebo- und Verumgruppe aufgeschlüsselt.

Tab.3: Demographische Daten der eingeschlossenen Patienten

	Placebo N=16	rhGM-CSF N=16	Gesamt N=32	p-Wert
Alter in Jahren Median (Spanne)	55 (22-71)	55 (32-67)	56 (22-71)	0.8
Geschlecht (m/w)	14/2	11/5	25/7	0.4
Intensivaufenthalt in Tagen Median (Spanne)	35 (10-218)	22 (2-128)	28 (2-218)	0.1
MFI bei Studieneinschluss Mittelwert - SEM	106±16.8	121±24.4	113±14.3	0.6
Krankenhausmortalität	5/16 (31 %)	7/16 (44 %)	12 (38%)	0.7
APACHE II Median (Spanne)	17 (4-21)	17 (10-25)	17 (4-25)	0.4

rhGM-CSF= rekombinant humaner Granulozyten Makrophagen- Kolonie Stimulierender Faktor

MFI= mittlere Fluoreszenzintensität

SEM= Standardfehler des Mittelwertes

APACHE II= Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II

Das Alter der Patienten lag sowohl in der Placebo- als auch der Verumgruppe im Median bei 55 Jahren. Es gab keine signifikanten Unterschiede innerhalb der beiden Gruppen. Es überwog insgesamt die Anzahl der männlichen Patienten mit einem Verhältnis von 25 männlichen (25 von 32) zu 7 weiblichen (7 von 32) Patienten, wobei das Geschlecht in keinem Zusammenhang zu dem Überleben stand.

Die Liegedauer der Patienten der Placebogruppe auf der Intensivstation war mit 35 Tagen höher als die Liegedauer der Patienten der Verumgruppe mit 22 Tagen.

Die bei Studieneinschluss gemessenen Ausgangswerte der HLA-DR Expression auf Monozyten wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Auch die Erkrankungsschwere und die Krankenhausmortalität innerhalb des Patientenkollektivs waren nicht unterschiedlich.

Die klinischen Diagnosen des Patientenkollektivs stellten sich wie folgt dar:

Tab. 4: Die Verteilung der Hauptdiagnosen

Peritonitis	10/32 (31%)
Pneumonie	8/32 (25%)
Pankreatitis	7/32 (22%)
Wundinfektionen	4/32 (13%)
Mediastinitis	3/32 (9%)

4.2. Einfluss der GM-CSF Gabe auf die monozytäre HLA-DR Expression

Insgesamt lagen die Mittelwerte der monozytären HLA-DR Expression der Verumgruppe über der mittleren HLA-DR Expression der Placebogruppe (Abb. 7).

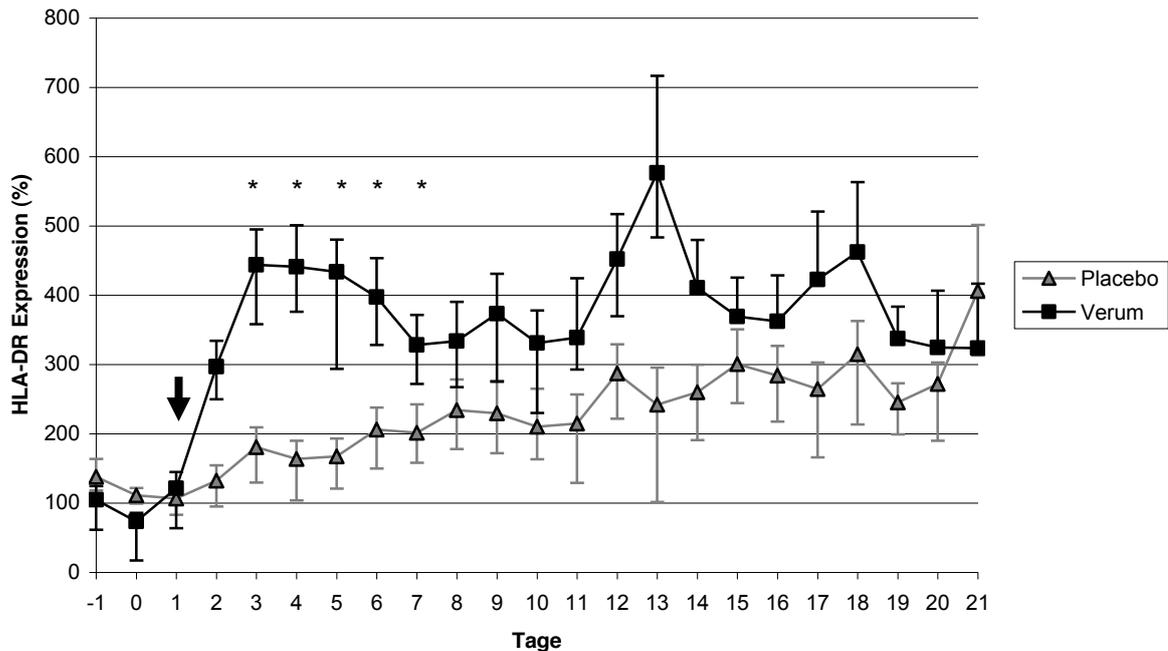


Abb. 7.: Mittelwerte und Standardfehler der HLA-DR Expression im Verlauf für die Placebo und Verumgruppe. * für $p < 0.001$. ↓ rhGM-CSF/Placebo-Gabe

Bei der Verumgruppe erkennt man einen deutlichen Anstieg der HLA-DR Expression an den ersten beiden Tagen (Tag 1 bis Tag 3) nach Studieneinschluss und den erstmaligen Gaben von rhGM-CSF. Die mittlere HLA-DR Expression der Monozyten lag in der Placebogruppe bei Werten zwischen 106 bis 406 % MFI und in der Verumgruppe zwischen 73 bis 576 % MFI. Die Werte der HLA-DR Expression bei der Verumgruppe waren an den Tagen 3 bis 7 signifikant ($p < 0.001$) von denen der Placebogruppe verschieden (Abb.7).

4.3. Einfluss der GM-CSF Gabe auf die übrigen Parameter

Die übrigen Parameter umfassten die Anzahl der Leukozyten, das C-reaktive Protein, Interleukin 6 und Interleukin 10 sowie Procalcitonin. Bei der Leukozytenzahl im Verlauf konnte an den Tagen zwei bis sechzehn ein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden.

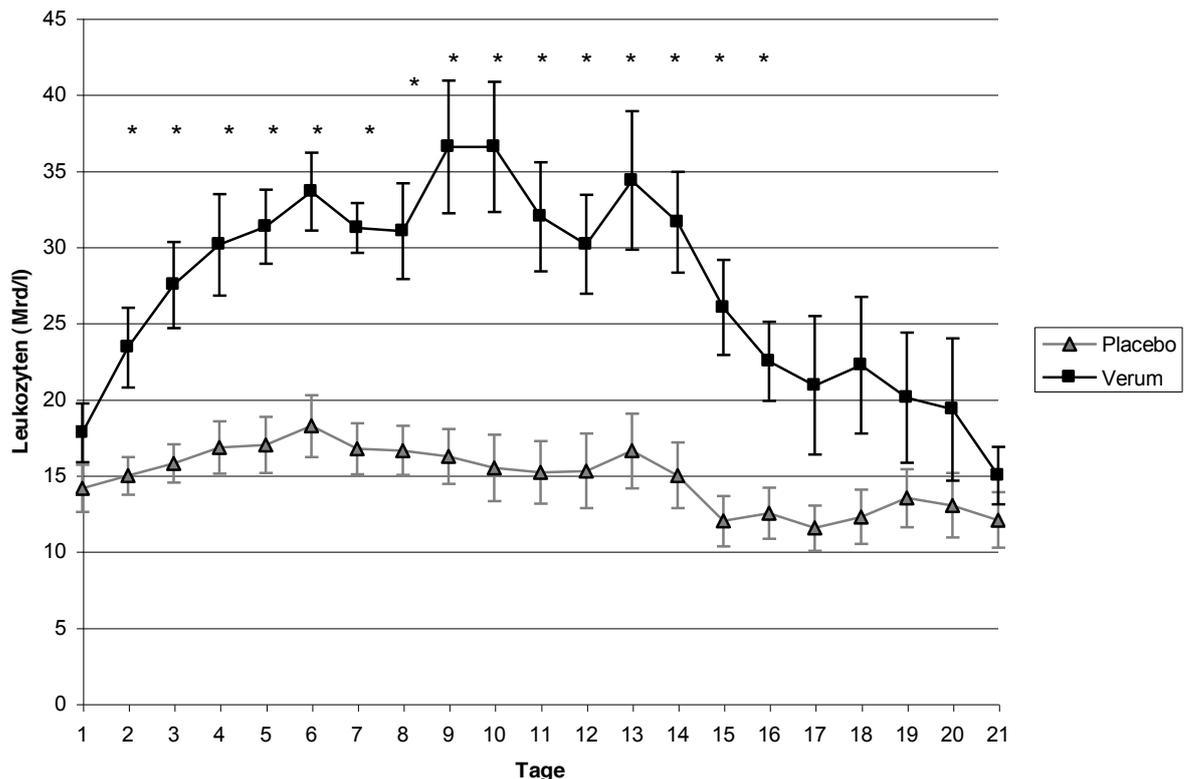


Abb. 8: Mittelwerte und Standardfehler der Leukozytenzahl für die Placebo- und Verumgruppe im Verlauf. * für $p < 0.001$

Bei der Betrachtung der Mittelwerte der Leukozytenzahl im Verlauf (Abb. 8) erkennt man höhere Werte im Kurvenverlauf der Verumgruppe als im Verlauf der Kurve der Placebogruppe. Bei keinem der übrigen Parameter konnten hingegen signifikante Unterschiede zwischen Placebo- und Verumgruppe gefunden werden.

Die mittleren CRP-Werte von Placebo- und Verumgruppe zeigen einen ähnlichen Verlauf (Abb. 9).

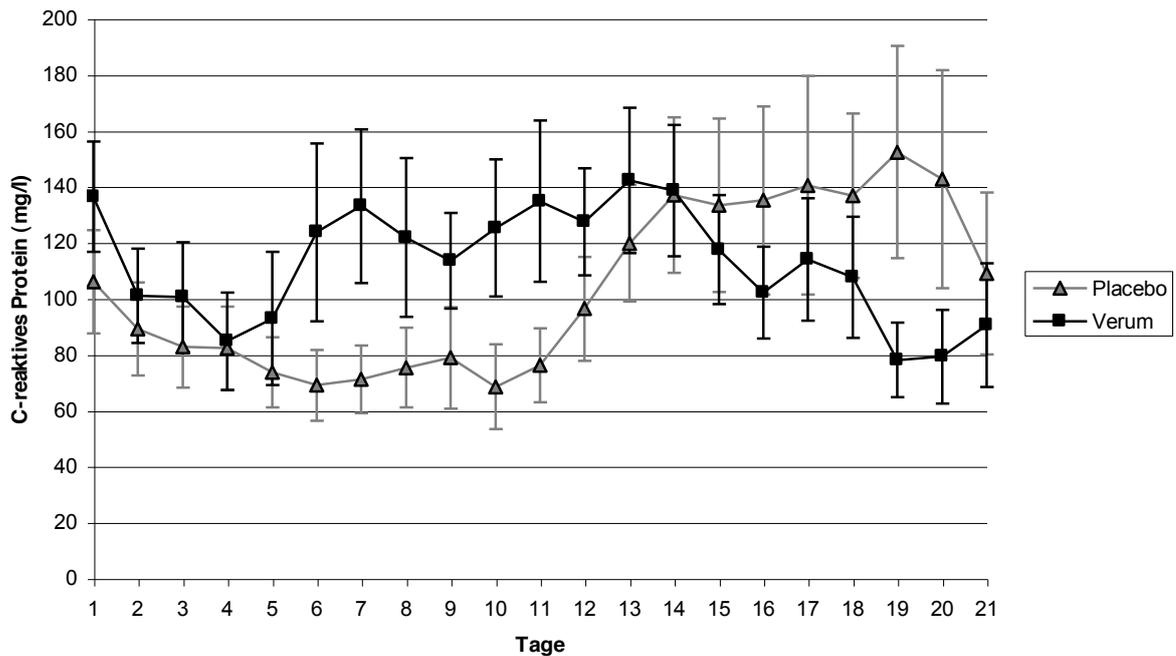


Abb. 9: Mittelwerte und Standardfehler des C-reaktiven Proteins für die Placebo- und Verumgruppe im Verlauf.

An den ersten Tagen des Beobachtungszeitraumes zeigt das CRP im Verlauf höhere Werte in der Verumgruppe, die sich dann den Werten der Placebogruppe annähern. Im weiteren Verlauf liegen die CRP-Spiegel der Verumgruppe bis zum 14. Tag des Beobachtungszeitraumes über denen der Placebogruppe. Danach zeigt sich ein umgekehrtes Bild im Verlauf der CRP-Werte.

Die Betrachtung der mittleren Interleukin 6 Werte im Verlauf (Abb. 10) zeigt annähernd gleiche Kurvenverläufe. Der Verlauf der Verumgruppe zeigt zwei deutliche Spitzen am 5. und 10. Tag.

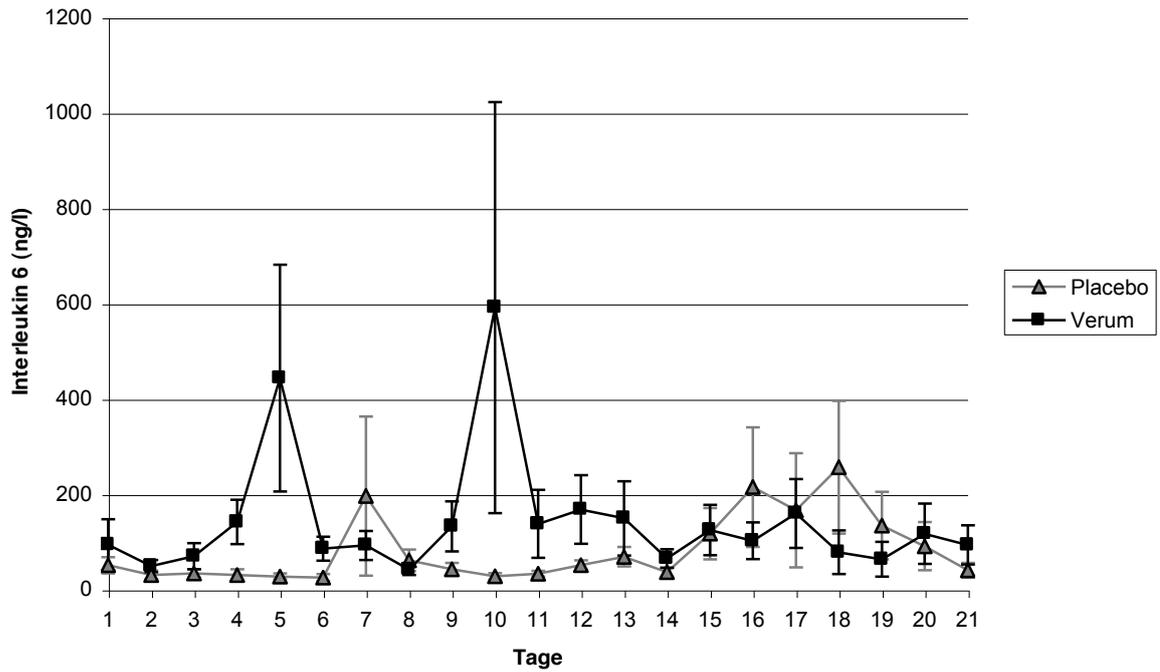


Abb.10: Mittelwerte und Standardfehler der Interleukin 6 Werte für die Placebo- und Verumgruppe im Verlauf.

Die mittleren Interleukin 10 Werte zeigen insgesamt höhere Plasmaspiegel im Verlauf für die Verumgruppe als für die Placebogruppe.

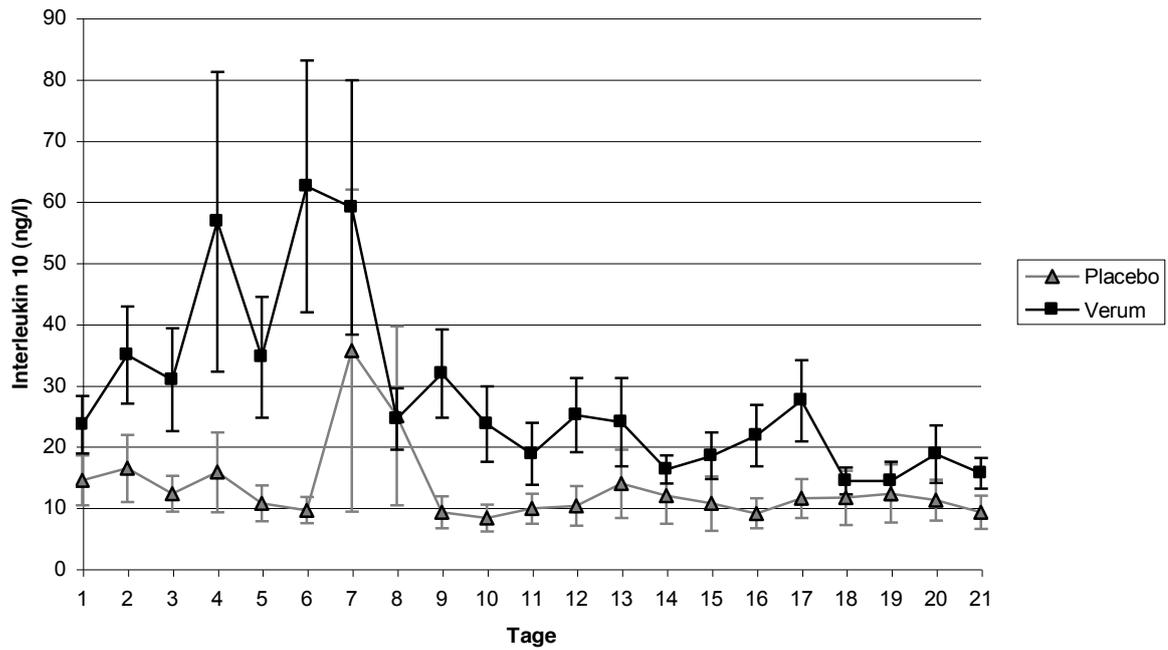


Abb. 11: Mittelwerte und Standardfehler der Interleukin 10 Werte für die Placebo- und Verumgruppe im Verlauf.

Bei der Betrachtung der mittleren Procalcitoninwerte erkennt man an den ersten Tagen des Beobachtungszeitraumes höhere Werte in den Kurvenverläufen der Verumgruppe, während die Werte der Placebogruppe durchgehend niedrig verlaufen. Im weiteren Verlauf sinken die Werte der Verumgruppe ab und gleichen sich denen der Placebogruppe an.

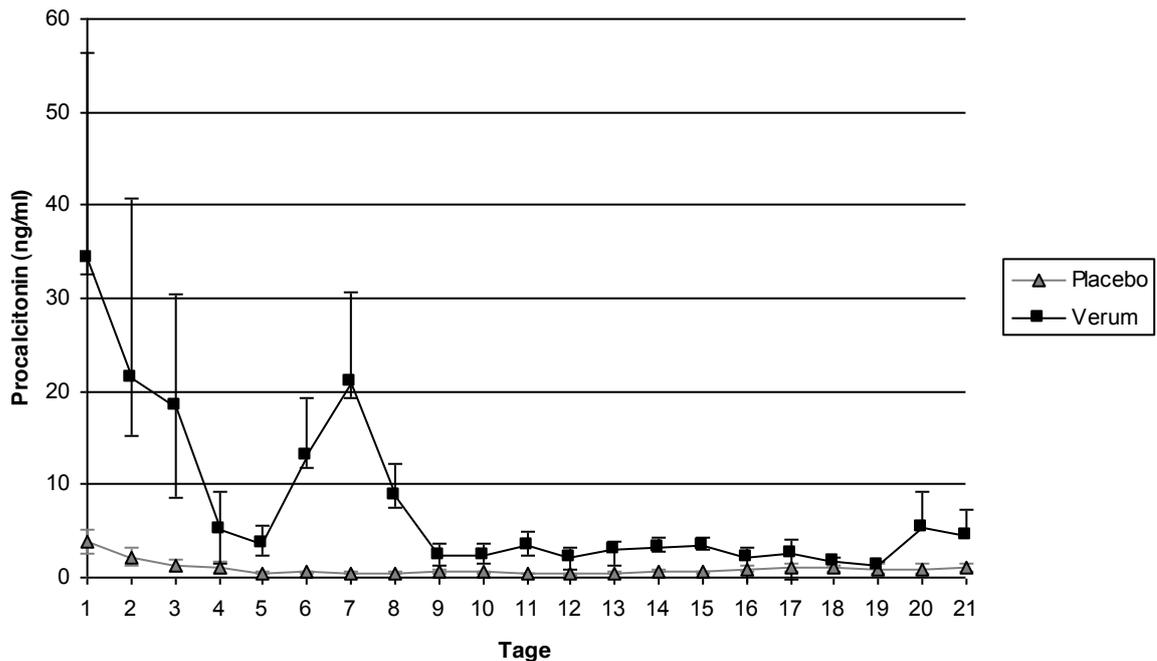


Abb. 12: Mittelwerte und Standardfehler der Procalcitoninwerte für die Placebo- und Verumgruppe im Verlauf.

4.4. Unerwünschte Ereignisse und Nebenwirkungen von GM-CSF

Die primären Nebenwirkungen von Sagramostim (Leukine®) wurden mit hämatologischen Veränderungen, wie Leukozytose und Thrombozytopenie beschrieben. Die Häufigkeit von Thrombozytopenien wurden bereits in einer 1989 veröffentlichten Studie mit 10 % angegeben (Ganser 1989).

In den ersten 4-6 Stunden nach Gabe wurden vorübergehende, initiale Leukopenien beobachtet. Die weiteren beobachteten Nebenwirkungen von Sagramostim wurden wie folgt beschrieben: Fieber, Knochenschmerzen, Hautrötungen, Arthralgien, Myalgien, Lethargie, Ohnmachtsanfälle oder Schwindel. Weiterhin wurden unterschiedliche kardiovaskuläre Effekte des Wirkstoffes, wie Arrhythmien, Ödeme, Perikarditis oder Perikardergüsse dokumentiert. Auch Dyspnoe, Übelkeit und Erbrechen wurden bei der Applikation höherer Dosen beobachtet. Im Rahmen der Erstapplikation, die allerdings vermehrt bei der intravenösen Gabe beobachtet wurden, traten

Symptome wie Hypotension oder generalisierte Hautrötungen auf (Thomsen 2005).

Um unerwünschte Ereignisse und Nebenwirkungen des rhGM-CSF (Sagramostim, Leukine®) aufzudecken und zu beurteilen, wurden die Leukozytenzahl, die Thrombozytenzahl und das Auftreten von Fieber, sowie die Delta MODS-Werte für die Respiration genauer beobachtet.

Weiterhin wurden die laut Hersteller des rh-GM-CSF Präparates angegebenen und oben aufgeführten Nebenwirkungen geprüft und überwacht.

Tab. 5: Anzahl der Patienten mit Nebenwirkungen (Placebo vs. Verumgruppe).

	Placebo (n)	rhGM-CSF (n)	p-Wert
Leukozytenzahl über 60 Mrd./L	0	3	0.1
Thrombozytenzahl unter 50 Mrd./L	0	6	< 0.01
Fieber über 38.5 C von Tag 2/3	7	5	0.5
Delta MODS (Tag1/Tag3) für Respiration (Summe(Spannweite))	-1 (-1 bis 1)	2 (-1 bis 1)	0.5

rhGM-CSF= rekombinant humaner Granulozyten Makrophagen- Kolonie Stimulierender Faktor

MODS= Multiple Organ Dysfunction Score

Wie in Tabelle 5 dargestellt besteht eine Signifikanz ($p < 0.01$) bezüglich der Thrombozytenzahl bei der Placebo- und der Verumgruppe, wobei signifikant mehr Patienten der Verumgruppe eine niedrigere Thrombozytenzahl von unter 50 Mrd./L aufzeigen. Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich bei Leukozyten über 60 Mrd./L, Fieberanstieg von Tag 2 zu 3 sowie dem Delta MODS für die Respiration. Neben der bereits erwähnten Thrombozytopenien konnten keine der oben aufgelisteten Nebenwirkungen oder andere Unverträglichkeiten des Präparates in diesem Patientenkollektiv festgestellt werden.

4.5. Einfluss der GM-CSF Gabe auf Infektionen, Erkrankungsschwere und Mortalität

Die folgende Tabelle zeigt die Infektionsdiagnose mit den pathogenen Keimen und die Zugehörigkeit der Patienten zur Placebo- oder Verumgruppe.

Tab. 6: Infektions- und Aufnahmediagnosen der Studienpatienten

Patienten	Placebo/ Verum	Aufnahmediagnose	Infektionsdiagnose
1	0	Rektumperforation	Peritonitis (<i>Escherichia coli</i>)
2	0	Polytrauma	Pneumonie (<i>Aspergillus</i> , <i>Enterokokken</i>)
3	1	Pankreatogastrektomie	Peritonitis (<i>Proteus</i> , <i>Klebsiellen</i> , <i>Escherichia coli</i>)
4	1	BronchialCA, Teilpneumektomie	Pneumonie (<i>Stenotrophomonas</i>)
5	1	Pankreatitis	Pankreatitis (<i>Candida</i>)
6	0	Peritonitis	Peritonitis (<i>Candida</i> , <i>Staphylokokken</i>)
7	0	Polytrauma	Wundinfektion (<i>Pseudomonas</i> , <i>Aspergillus</i>)
8	1	Peritonitis	Peritonitis (<i>Proteus</i> , <i>Klebsiellen</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida</i>)
9	0	ÖsophagusCA	Wundinfektion (<i>Citrobacter</i>)
10	1	Mediastinitis	Mediastinitis (<i>Staphylokokkus aureus</i> , <i>Candida</i>)
11	0	Pankreatitis	Pankreatitis (<i>Candida</i> , <i>Enterokokken</i>)
12	1	Pankreatitis	Pankreatitis (<i>Enterokokken</i> , <i>Pseudomonas</i>)
13	1	Akutes Abdomen	Peritonitis (<i>Candida</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>)
14	0	Polytrauma	Wundinfektion (<i>Streptokokken</i> , <i>Clostridien</i> , <i>Bacillus spec.</i>)
15	0	Magenperforation	Peritonitis (<i>Candida</i>)
16	1	Pankreatitis	Pankreatitis (<i>Proteus</i>)
17	0	Pankreatitis	Peritonitis (<i>Escherichia coli</i>)
18	0	Pankreatitis	Pankreatitis (<i>Candida</i>)
19	1	Polytrauma	Pneumonie (<i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i>)
20	1	Duodenalperforation	Peritonitis (<i>Enterokokken</i> , <i>Proteus</i>)
21	0	Pankreatitis	Pankreatitis (<i>Citrobacter</i>)
22	1	Mediastinitis	Mediastinitis (<i>Staphylokokken</i>)
23	1	Pankreatitis	Pankreatitis (<i>Pseudomonas</i> , <i>Candida</i>)
24	0	Perimandibulärer Abzess	Wundinfektion (<i>Staphylokokken</i> , <i>Corynebakterium</i>)
25	1	Pleuramesotheliom	Mediastinitis (<i>Enterokokken</i> , <i>Candida</i>)
26	0	Peritonitis	Peritonitis (<i>Escherichia coli</i> , <i>Candida</i> , <i>Enterokokken</i>)
27	1	ÖsophagusCA	Pneumonie (<i>Staphylokokken</i> , <i>Corynebakterium</i>)
28	0	Polytrauma	Pneumonie (<i>Klebsiellen</i>)
29	1	Polytrauma	Pneumonie (<i>Proteus</i> , <i>Serratia</i>)
30	0	Trachealstenose	Pneumonie (<i>Klebsiellen</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Candida</i>)
31	0	Z.n ACVB u. GI-Blutung	Pneumonie (<i>Enterokokken</i> , <i>Candida</i>)
32	1	Akutes Abdomen	Peritonitis (<i>Klebsiellen</i> , <i>Candida</i> , <i>Proteus</i>)

0=Placebogruppe, 1=Verumgruppe

Sowohl die Verteilung der unterschiedlichen Infektionsdiagnosen, aufgeschlüsselt in Tabelle 7, als auch die entsprechenden Keime zeigten keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zur Placebo- oder Verumgruppe.

Tab. 7: Infektionsdiagnosen aufgeschlüsselt nach Placebo- und Verumgruppe

Infektionen	Placebo (n)	rhGM-CSF (n)	Gesamt
Peritonitis	5	5	10
Pneumonie	4	4	8
Pankreatitis	3	4	7
Wundinfektionen	4	0	4
Mediastinitis	0	3	3

Bezüglich der Erkrankungsschwere, Krankenhausmortalität und Mortalität des Intensivaufenthaltes konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Verum- oder Placebogruppe gefunden werden.

Tab. 8: Einfluss der GM-CSF Gabe auf die Erkrankungsschwere

	Placebo N=16	rhGM-CSF N=16	Gesamt N=32	p-Wert
APACHE II Median (Spanne)	17 (4-21)	17 (10-25)	17 (4-25)	0.4
Mortalität des Intensivaufenthaltes	4/16 (25%)	6/16 (38%)	10/32 (31%)	0.7
Krankenhausmortalität	5/16 (31%)	7/16 (44%)	12/32 (38%)	0.7

GM-CSF= Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

APACHE II= Acute Physiology And Chronic Health Evaluation

Die Verlaufscores konnten zu keinem Zeitpunkt signifikant zwischen den Verum- und Placebopatienten trennen (Abb. 13 und 14).

Die Kurvenverläufe der MOD-Scorewerte liegen insgesamt bei der Verumgruppe höher als bei der Placebogruppe. Annähernd gleiche Scorewerte der beiden Gruppen zeigen sich am 11. Tag des Beobachtungszeitraumes

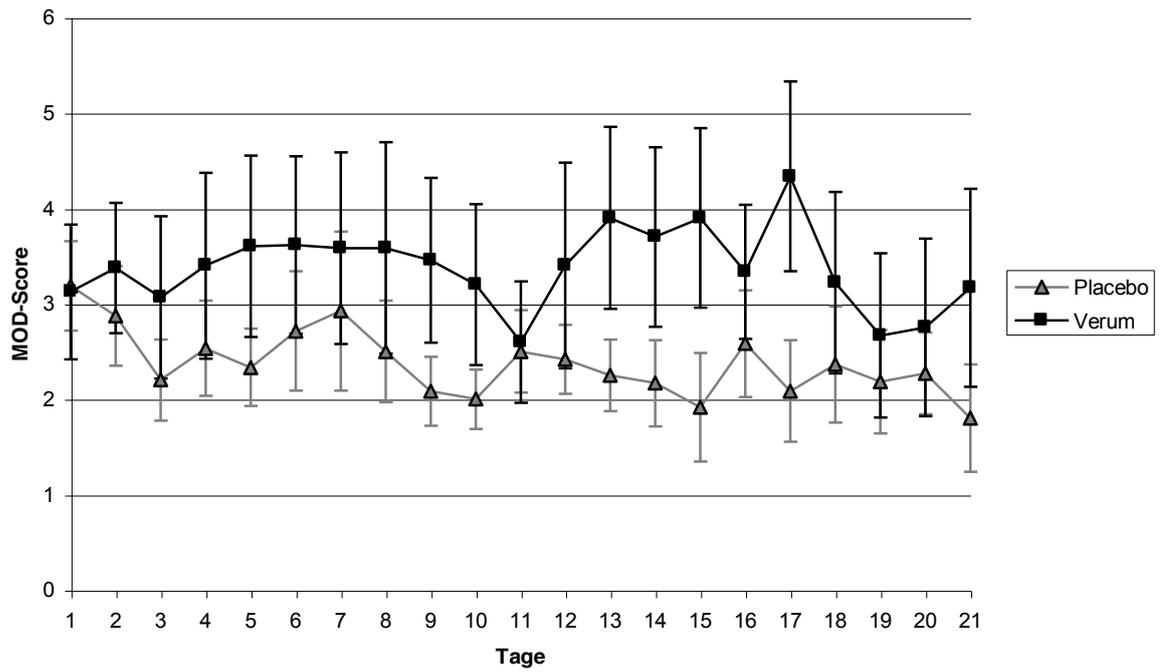


Abb. 13: Mittelwerte und Standardfehler der MODS Werte im Verlauf für die Placebo- und Verumgruppe

MODS= Multiple Organ Dysfunction Score

Beim SOFA Verlaufscore liegen die Werte der Verumgruppe im Verlauf über denen der Placebogruppe.

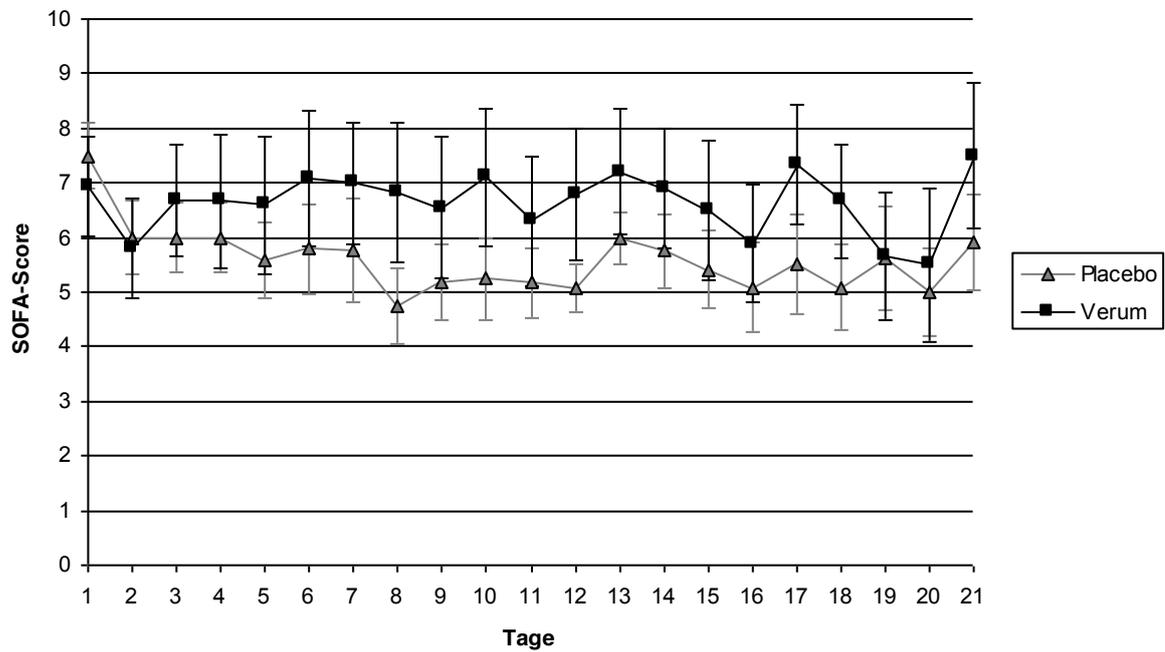


Abb. 14: Mittelwerte und Standardfehler der SOFA Scorewerte im Verlauf für die Placebo- und Verumgruppe
SOFA= Sepsis-related Organ Failure Assessment

4.6 Unterschiede zwischen Überlebenden und Verstorbenen bei Erkrankungsschwere und immunologischen Markern

Bezüglich der Erkrankungsschwere konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenden und Verstorbenen gefunden werden.

Tab. 9: Einfluss der Erkrankungsschwere auf Überleben und Versterben

	Überlebende N=22	Verstorbene N=10	Gesamt N=32	p-Wert
APACHE II Median (Spanne)	15 (4-22)	19 (10-25)	17 (4-25)	0.09
SAPS Median (Spanne)	36 (12-25)	34 (20-58)	34 (12-58)	0.16

Insgesamt zeigte sich kein deutlicher Unterschied bei den Kurvenverläufen der monozytären HLA-DR Expression bei Überlebenden und Verstorbenen. Besonders ähnlich zeigt sich der Verlauf der Mittelwerte an den ersten Tagen. Bei den Verstorbenen liegen die Werte insgesamt unter denen der Überlebenden, dies zeigt sich besonders an den letzten vier Tagen des Beobachtungszeitraumes.

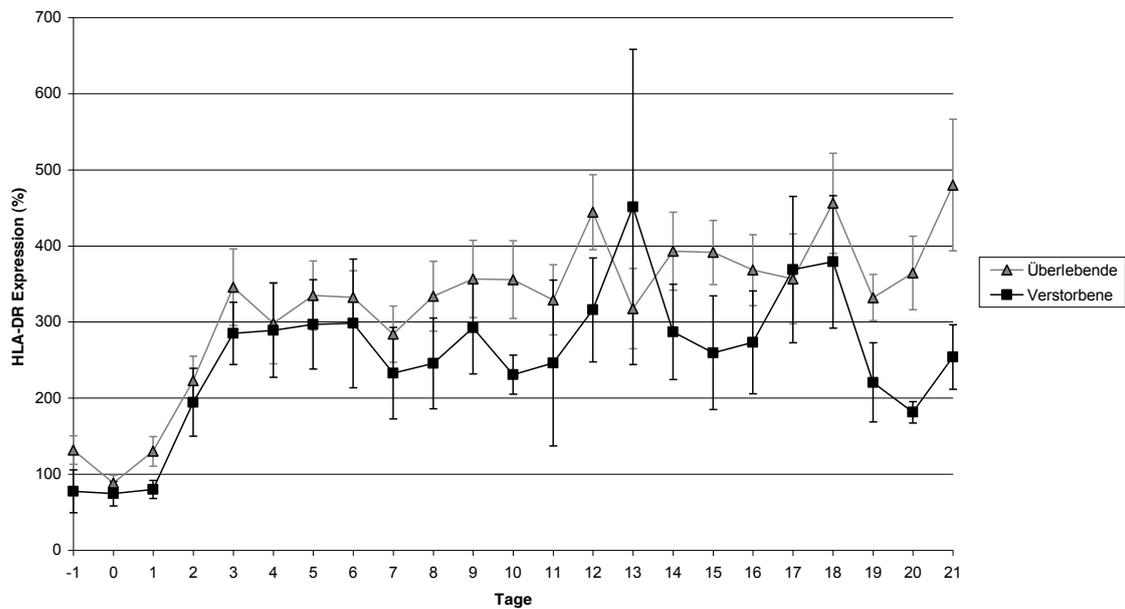


Abb. 15: Mittelwerte und Standardfehler der HLA-DR Expression für die Überlebenden und Verstorbenen im Verlauf.

Bei der Betrachtung der mittleren Procalcitoninwerte erkennt man an den ersten Tagen des Beobachtungszeitraumes höhere Werte in den Kurvenverläufen bei den Verstorbenen während die Werte der Überlebenden durchgehend niedrig verlaufen. Im weiteren Verlauf sinken die Werte der Verstorbenen ab und gleichen sich denen der Placebogruppe an.

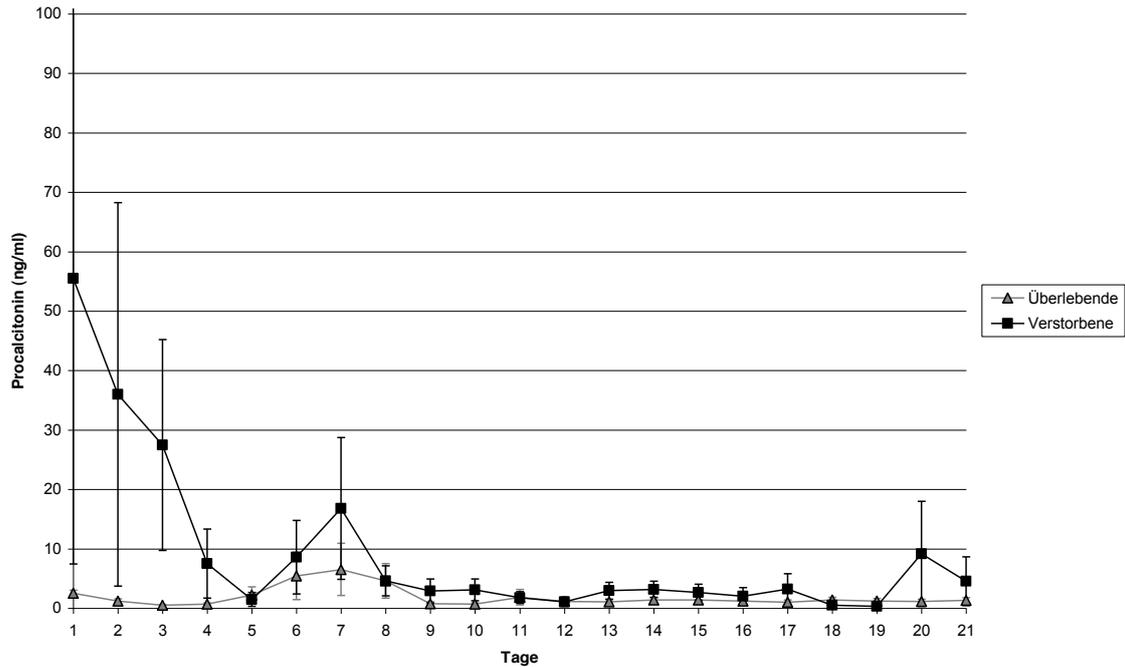


Abb.16: Mittelwerte und Standardfehler der Procalcitoninwerte für die Überlebenden und Verstorbenen im Verlauf.

Die Betrachtung der mittleren Interleukin 6 Werte im Verlauf (Abb. 17) zeigt annähernd gleiche Kurvenverläufe. Der Kurvenverlauf der Verstorbenen liegt an den ersten zwölf Tagen insgesamt höher als bei den Überlebenden und zeigt drei deutliche Spitzen am 5., 7. und 10. Tag des Beobachtungszeitraumes.

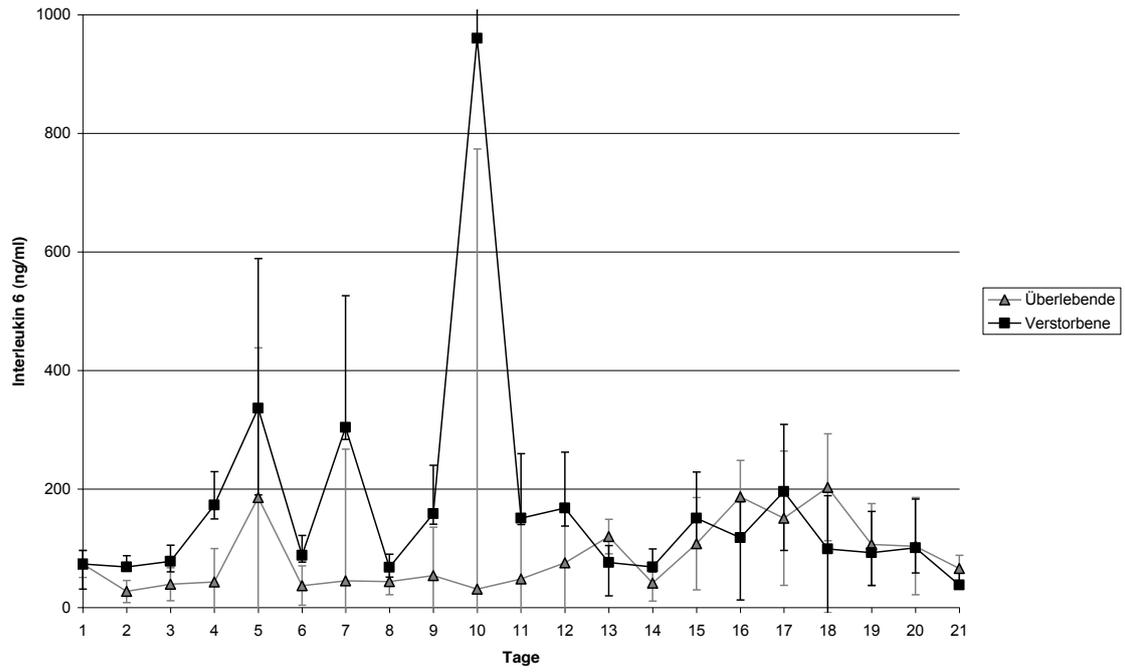


Abb.17: Mittelwerte und Standardfehler der Interleukin 6 Werte für die Überlebenden und Verstorbenen im Verlauf.

5. Diskussion

5.1. Kernaussage

Diese Arbeit weist den starken Einfluss der GM-CSF-Gabe auf die monozytäre HLA-DR Expression nach.

Durch die Gabe von GM-CSF zeigte sich eine signifikant höhere HLA-DR Expression auf den Monozyten in der Verumgruppe als auf den Monozyten der Placebogruppe an den ersten 5 Tagen des Beobachtungszeitraumes. Alle Patienten der Verumgruppe reagierten innerhalb der ersten 48 Stunden mit einem Anstieg der HLA-DR Expression auf die GM-CSF Gabe. Die HLA-DR Expression bei den Patienten der Placebogruppe zeigte einen spontanen Anstieg über den Beobachtungszeitraum.

Auch die Leukozytenzahl zeigte einen signifikanten Anstieg an den Tagen 2 bis 16 des Beobachtungszeitraumes.

Bei den übrigen Parametern, dem C-reaktiven Protein, den Interleukinen 6 und 10 sowie dem Procalcitonin ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die Unterschiede zwischen Verum- und Placebogruppe waren bezüglich Alter, Geschlecht, Länge des Beobachtungszeitraumes, Mortalität, Erkrankungsschwere und Infektionsinzidenz vergleichbar.

Die Verlaufscores konnten zu keinem Zeitpunkt signifikant zwischen den Verum- und Placebopatienten trennen, die MOD-Scorewerte lagen jedoch in der Verumgruppe tendenziell höher als in der Placebogruppe.

Durch die Gabe von GM-CSF zeigte sich ein Unterschied bezüglich der Thrombozytenzahl, die in der Verumgruppe signifikant niedriger war als in der Placebogruppe. Ansonsten wurden durch die GM-CSF Gabe keine relevanten unerwünschten Nebenwirkungen hervorgerufen.

5.2. Methodenkritik

Insgesamt umfassen die Patientenkollektive im Rahmen von klinischen Studien, besonders im Bereich der Intensivmedizin, eine eher kleine Patientenzahl, da bei großen Gruppen die Untersuchungsdauer oft stark ansteigt (Dellinger 1997). Es werden deshalb multizentrische Studien angestrebt, bei denen in kürzerer Zeit ein größeres Patientenkollektiv untersucht werden kann um statistisch aussagefähigere Ergebnisse gewinnen zu können.

Bei multizentrischen Studien besteht jedoch die Gefahr, dass die einzelnen Zentren auf Grund ihrer unterschiedlichen diagnostischen Möglichkeiten, der variablen Behandlungsstrategien sowie der individuellen personellen Voraussetzungen unterschiedliche Untersuchungsergebnisse erhalten, welche die Studienergebnisse beeinflussen können (Angus 2000). Die kleineren Gruppen der Monocenterstudien zeigen häufig weniger Unterschiede in der Diagnostik und Therapie, sie ermöglichen allerdings auch weniger aussagekräftige Schlussfolgerungen. In dieser Studie wurde in einem monozentrischen Studiendesign eine relativ kleine Patientengruppe untersucht. Diesem Problem wurde jedoch durch eine genaue Auswahl der einzuschließenden Patienten und durch die biologische Plausibilität der Hypothese begegnet (Einschlusskriterium = Zielkriterium).

Insbesondere bei der in dieser Studie angewandten Messmethodik, der FACS-Analyse, ist eine multizentrische Studienform nur schwer möglich, da die in den einzelnen Zentren evaluierten Referenzwerte häufig unterschiedlich sind und eine Vergleichbarkeit fehlt. Die hier durchgeführte Methode der FACS-Analyse ist nicht standardisiert, da sie an jedem Zentrum einer lokalen Validierung bedarf und somit zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchführbar ist.

Neben der von uns angewandten Messmethodik sind noch verschiedene andere Messmethoden der HLA-DR Expression gebräuchlich. Die wesentlichen methodischen Unterschiede beruhen einerseits auf der Art der Monozytenerkennung, andererseits auf der Art der Auswertung der Expressionsdichte des HLA-DR Rezeptors, also der Auswertung des HLA-DR positiven Anteils der Monozyten.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode nach Nebe wurde die Monozytenpopulation durch die Markierung mit Anti-CD 14 gemessen. Im Jahre 2000 wurden die Ergebnisse einer Konsensus Konferenz der European Macrophage Society von 1999 zur Definition humaner blutständiger Monozyten veröffentlicht (Ziegler-Heitbrock 2000). Danach wird neben der Verwendung des Oberflächenantigens CD 14 insbesondere die zusätzliche Anwendung weiterer Oberflächenantigene, wie z.B. CD 16 oder CD 64 empfohlen.

CD 16 entspricht dem FcγR-III Rezeptor und gehört zu der Gruppe von Rezeptoren, welche die Fc Fragmente von Immunglobulinen binden. Diesen Vorschlägen lagen Studienergebnisse zugrunde, die zeigten, dass sich die Oberflächenantigenstruktur infolge verschiedener Erkrankungen ändert (Withington et al. 1998; Ziegler-Heitbrock 1996). Gesunde Probanden wiesen in der Regel vor allem CD 14 positive und CD 16 negative Monozyten (CD 14+ / CD 16-) auf. In Folge entzündlicher Erkrankungen nahm die Expression von CD 14 jedoch ab und es wurde eine zusätzliche Expression von CD 16 (CD 14dim / CD 16+) beobachtet.

In einer von Belge et al. veröffentlichten Studie im Jahr 2002 konnte gezeigt werden, dass diese Veränderung der Oberflächenantigene sowohl eine Veränderung der HLA-DR Expression als auch eine funktionelle Alteration der Monozyten zur Folge hat (Belge 2002). In der CD14+ / CD16+ Monozytenpopulation konnte eine gesteigerte TNF Produktion nachgewiesen werden, im Sinne eines erhöhten proinflammatorischen Potentials.

Es steht eine weitere Methode zur Messung der monozytären HLA-Expression mittels eines Kit zur Verfügung (QuantiBRITE™ Anti-HLA-DR PE/Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5 Antibodies; Becton Dickinson Immunocytometry Systems). Die QuantiBRITE™ Methode nutzt zur Markierung der Monozyten einen Antikörper, der sowohl CD 14 als auch CD 64 bindet. Dabei entspricht CD 64 dem FcγR-I Rezeptor und stellt einen IgG Rezeptor der mononukleären Zellen dar. Bereits 1995 beschrieb Riott, dass CD 64 vorwiegend auf Monozyten exprimiert wird (Riott 1995). Durch die Kombination dieser Bereiche wird den Empfehlungen der Konsensuskonferenz von 2000 Rechnung getragen. Eine Veröffentlichung von Grage-Griebenow et al von 2001 zeigt aber, dass auch die Expression von CD 64 infolge bestimmter Erkrankungen verändert wird, die funktionelle Alterationen zur Folge haben (Grage-Griebenow 2001).

Die Standardisierbarkeit dieser beschriebenen Methoden gründet sich vorwiegend darauf, dass die Erfassung der Fluoreszenzintensität in den Zellen geeicht wird. Hierzu werden Kalibrationsbeads verwendet, die mit einer definierten Intensität Licht emittieren um so eine Eichkurve erstellen zu können. Anhand dieser Eichkurve kann die Variabilität aufgehoben werden, die durch die unterschiedlichen Laserstärken in den verschiedenen Durchflusszytometern entsteht. Weiterhin hat der verwendete Antikörper, Anti-HLA-DR, der in beiden beschriebenen Methoden verwendet wird, eine entscheidende Bedeutung, da er mit einem sehr hohen Anteil von 95% Bindungen mit dem Antigen eingeht. Monneret konnte 2002 in einer Studie zeigen, dass die Verwendung unterschiedlicher Meßmethoden zu differenten Ergebnissen bezüglich der HLA-DR Expression führt (Monneret 2002). Dies sind Zeichen dafür, dass bisher noch keine stabilen Oberflächenmarker zur Eingrenzung der Monozytenpopulation gefunden wurden und die Markierung der Monozytenpopulation weiterer Optimierung bedarf. Dabei gilt es zu beachten, dass durch den Verlust von CD 14 / CD 64 Oberflächenantigenen aufgrund infektiöser Erkrankungen die Eingrenzung der Monozytenpopulation nicht nur erschwert, sondern auch verändert wird. Zum anderen wird durch diese Veränderungen der erfassten Zellpopulation auch eine funktionell veränderte Population erfasst. Diese Aussage wird durch eine Markierung mit zusätzlichen infektionsunabhängigen Oberflächenmarkern in der Messung beeinflusst. Insbesondere im Hinblick auf die HLA-DR Expression könnte dies zu deutlich abweichenden Ergebnissen führen.

Neben einem bestimmten Altersrahmen dienten als Einschlusskriterien das Krankheitsbild der schweren Sepsis und des septischen Schocks sowie eine niedrige HLA-DR Expression und fallende Interleukin 6 Spiegel im Plasma. Das Krankheitsbild der schweren Sepsis oder des septischen Schock umfasst im Vergleich zur einfachen Sepsis oder SIRS ein weitaus kleineres Kollektiv der Intensivpatienten. Es erfasst einen sehr heterogenen Anteil von Patienten und ist sehr unspezifisch im Bezug auf die zu Grunde liegenden Erkrankungen. Die Verwendung einheitlicher Definitionen bei den Einschlusskriterien bietet allerdings den Vorteil der besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Gruppen.

Die einzigen zur Zeit zur Verfügung stehenden, allgemein anerkannten Definitionen für das Krankheitsbild der Sepsis bzw. schweren Sepsis und des septischen Schocks sind die Definitionen der ACCP/SCCM-Konferenz von 1992. Erneut überarbeitet wurden sie in einer Konferenz der verschiedenen Organisationen (SCCM, ESICM, ACCP, ATS, SIS) im Jahr 2001. Hier wurde die sepsis-spezifische Symptomliste deutlich erweitert, um die klinische Einordnung zu erleichtern. Die Diagnosefindung der Sepsis mit Hilfe verschiedener Biomarker wurde diskutiert, aber als noch nicht ausgereift verworfen und das PIRO Konzept (Angus 2003) als Stagingmodell der Zukunft vorgestellt. Die Definitionen der Sepsis, der schweren Sepsis und des septischen Schocks blieben unverändert (Levy 2003).

Die zusätzlichen Einschlusskriterien der vorliegenden Studie (niedrige HLA-DR Expression, fallende Interleukin 6 Spiegel im Plasma), führten zu einer guten immunologischen Vergleichbarkeit und Homogenität der Patientengruppen.

Die niedrige HLA-DR Expression als Einschlusskriterium bezieht sich auf die Ergebnisse zahlreicher Studien, bei denen bei vielen schwer kranken Patienten eine niedrige Expression der HLA-DR Rezeptoren auf Monozyten beobachtet werden konnte (Volk 1996, Haveman 1999). Ebenso konnte eine monozytäre Deaktivierung der Monozyten während eines systemisch inflammatorischen Syndroms, einer Sepsis und eines septischen Schocks aufgezeigt werden, die im engen Zusammenhang mit einem Anstieg der Morbidität und einem schlechteren Outcome steht (Muller Kobold 2000, Oberhoffer 1999).

Der interne Richtwert der HLA-DR Expression von ≤ 200 MFI seit mindestens 48 Stunden richtet sich nach den Erfahrungen und den Ergebnissen der Pilotstudie von Nierhaus et al. (Nierhaus 2003, Frings 2001).

Durch das weitere Einschlusskriterium der fallenden Interleukin 6 Spiegel im Plasma sollte vermieden werden, in der proinflammatorischen Phase der Sepsis zu intervenieren. In einer Interventionsstudie mit Interferon- γ konnte gezeigt werden, dass die Gabe dieses Zytokins in der proinflammatorischen Phase gesundheitsschädliche Folgen nach sich ziehen kann (Kox 1997). Um solche Zwischenfälle und Nebenwirkungen zu vermeiden sollte das proinflammatorisch wirksame GM-CSF nur nach Abklingen der initialen hyperinflammatorischen Phase des Krankheitsgeschehens verabreicht werden.

In dieser Studie wurden die Patienten doppelblind randomisiert und einer Placebo- oder Verumgruppe zugeordnet. Die randomisiert-kontrollierte Studie (randomized controlled trial = RCT) gilt als das Studiendesign der Wahl für eine möglichst objektive Beurteilung einer medizinischen Intervention. Der große Vorteil des RCT besteht darin, dass systematische Unterschiede zwischen den Gruppen durch eine Zufallszuteilung der Patienten zu der jeweiligen Gruppe weitgehend ausgeschlossen werden können. Die Randomisierung gewährleistet Gruppen, die so identisch wie möglich sind sowie die Zufallsverteilung von bislang unbekanntem Unterschieden. Der Begriff „kontrolliert“ besagt, dass die Ergebnisse in der Interventionsgruppe mit denen der Kontrollgruppe, also einem Referenzwert ohne Intervention, verglichen werden können. Schließlich erlaubt die randomisierte Studie eine spätere Metaanalyse mehrerer derartiger Studien multizentrischer Art. Randomisierte Studien gelten andererseits auch als zeitaufwändig und teuer und benötigen oft hohe Patientenzahlen um relevante Aussagen zu ermöglichen (Ioannidis 2001). Durch die doppelblinde Randomisierung und Zuordnung zu einer Verum- oder Placebogruppe durch einen unabhängigen Mitarbeiter der Apotheke des Krankenhauses war weder den behandelnden Ärzten, den Betreuern oder anderen Mitarbeitern der Studie bewusst, ob es sich um ein Verum- oder Placebopräparat handelte. Durch diese Verblindung wurden systematische Verzerrungen verhindert. Beim genauen Beobachten der Immunparameter, unter Kenntnis der Wirkung von rhGM-CSF, konnten allerdings Rückschlüsse auf die Gruppenzugehörigkeit getroffen werden. Sowohl die täglichen Messungen der Leukozytenzahl, die unter rhGM-CSF Gabe deutlich stiegen, als auch die ansteigenden Interleukin 6 Werte im Plasma sprachen für die Zugehörigkeit des Patienten zur Verumgruppe.

Der Patientenzahl für diese Arbeit liegt eine Pilotstudie von Nierhaus et al. zugrunde (Nierhaus 2003). Hier wurde bereits im Rahmen einer prospektiven, nicht randomisierten Studie der Effekt von rhGM-CSF Gabe bei Patienten mit sicherer Sepsis und einer niedrigen HLA-DR Expression evaluiert. In diese Pilotstudie wurden neun Patienten konsekutiv eingeschlossen. Um die nötige Patientenzahl zu errechnen, die für diese Studie nötig ist um aussagefähige

Ergebnisse zu erhalten wurde die Power berechnet. Diese Berechnungen wurden mittels des „Sample Size Calculator“ (dt.: Rechner für den durchschnittlichen Stichprobenumfang) durchgeführt (www.dssresearch.com). Die eingesetzten, erwarteten Mittelwerte bezogen sich auf die Ergebnisse der Pilotstudie. Für die Placebogruppe wurde der erwartete Mittelwert von 150, für die Verumgruppe der erwartete Mittelwert von 400 eingesetzt. Die Standardabweichung wurde mit 200 für die jeweilige Gruppe angegeben. Der errechnete Stichprobenumfang betrug 14 für beide Gruppen. Um gegebenenfalls auftretende Ausfälle auszugleichen ergab sich eine tatsächliche Gruppenstärke von jeweils 16 Patienten für Verum- und Placebogruppe mit insgesamt 32 Patienten.

Als Endpunkt wurden in dieser Studie die 28 Tage-Mortalität gewählt. Unter der Leitung von Dellinger wurde in einer Konferenz verschiedener Organisationen, des National Institutes of Health (NIH) und des American College of Chest Physicians (ACCP) im Jahre 1997 festgestellt, dass es sich bei der 28 Tage-Mortalität um einen angemessenen Zeitraum handelt, da sich die meisten sepsisbedingten Todesfälle in dieser Periode ereignen und spätere Todesfälle häufig nicht sepsisbedingt sind (Dellinger 1997). Somit handelt es sich bei der Bestimmung der 28 Tage-Mortalität um einen relevanten und aussagefähigen Parameter.

Infektion als entscheidender Faktor der Sepsis ist eines der Hauptprobleme auf Intensivstationen. Besonders die Erfassung und die Infektionserhebung stellt für jede klinische Studie, insbesondere bei Intensivpatienten ein großes Problem dar. Zur Zeit der Studie lag keine Einigkeit über Definitionen vor, die es ermöglichen, insbesondere bei septischen Patienten das Vorliegen verschiedener Infektionen zu identifizieren.

Für die Infektionserhebung in dieser Studie wurden die allgemeinen CDC-Kriterien herangezogen. Diese Definitionen entscheiden über das Vorhandensein verschiedener Infektionen nach unterschiedlichen Kriterien. Es können sowohl objektive Befunde, wie mikrobiologische Ergebnisse, diagnostische Untersuchungen (Röntgen, CT, MRT, Biopsien) verwendet werden, es ist aber auch allein die Diagnose des behandelnden Arztes gültig,

die als subjektiv zu werten ist. Insgesamt werden die Definitionen der einzelnen Infektionen allgemein gehalten, sie gelten für alle Patienten und es werden keine speziellen Leitlinien für Infektionen bei Intensivpatienten genannt. Mit einer 2005 von Calandra und Cohen veröffentlichten Arbeit wurde eine neue, praktikable Möglichkeit der Infektionserfassung septischer Patienten aufgezeigt. In einer Konsensus-Konferenz 2003 wurden standardisierte Definitionen für Infektionen als Schlüsselkomponente der Sepsis auf Intensivstationen erarbeitet. Es wurden genaue Leitlinien für die häufigsten Infektionen, darunter auch die Pneumonie, die intraabdominelle Infektion, sowie die Wundinfektion, angegeben. Weiterhin geben die Experten hier genaue Angaben für Symptome und Zeichen, sowie Labor- und Untersuchungsergebnissen der Infektionen an. Es werden Richtlinien genannt, welche die klinische Arbeit und die Erarbeitung von klinischen Studien erleichtern soll (Calandra 2005).

5.3. Diskussion der Ergebnisse

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Studie im Einzelnen lässt sich folgendes feststellen:

Das Patientenkollektiv ist hinsichtlich seiner Zusammensetzung im Bezug auf Erkrankungsschwere, Mortalität, Alter, Geschlecht und Grunderkrankung repräsentativ für die Zusammensetzung der Patienten von operativen Intensivstationen eines Krankenhauses der Maximalversorgung.

Die Erkrankungsschwere zeigte keine Unterschiede bezüglich der Placebo- oder Verumgruppe auf. Die Gesamtmortalität mit 38%, sowie die einzeln aufgeführte Mortalität der Placebogruppe mit 31% und die Mortalität der Verumgruppe mit 44% entsprechen der erwarteten Mortalität eines Patientenkollektivs mit entsprechender Erkrankung.

Zum Vergleich soll im Folgenden auf die Ergebnisse der 2006 veröffentlichten SOAP (Sepsis Occurrence in the Acutely ill Patient) Studie von Vincent hingewiesen werden. Es handelt sich hierbei um eine große multizentrische Studie, an der fast zweihundert Intensivstationen aus 24 europäischen Ländern teilnahmen und an der auch diese Arbeitsgruppe mitwirkte. Vergleichend zu

den Studienergebnissen werden in den Resultaten der SOAP Studie die Gesamtmortalität der Sepsis für Deutschland mit 51% beschrieben. Die Gesamtmortalität des Intensiv Aufenthaltes liegt bei unseren Ergebnissen bei 31%, in der SOAP Studie bei 39 %.

Das höhere Lebensalter von Intensivpatienten als einen Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität beschrieben Hughes et al. bereits 2001. Somit ist auch das Durchschnittsalter in unserer Studie, sowohl für die Placebo als auch die Verumgruppe, als durchaus typisch für ein Patientenkollektiv der Intensivstation einzuschätzen. In den Ergebnissen der SOAP Studie wird das Durchschnittsalter mit 64 Jahren angegeben mit einem Patientenanteil von 62 % männlichen Patienten. Die Vergleiche zeigen sowohl für das Kollektiv als auch für die beiden einzelnen Gruppen repräsentative Ergebnisse (Vincent 2006).

Als Grunderkrankungen des Patientenkollektivs überwiegen infektiöse Erkrankungen des Abdomens mit 31 %, gefolgt von Pneumonien mit 25 % als häufigste Diagnosen. Vergleichend mit den Grunderkrankungen, die in der SOAP Studie am häufigsten auftraten, sind hier die Erkrankungen der Lunge mit 68 % zu nennen. Abdominelle Infektionen traten nur in 20 % der Fälle auf. Hierzu muss man anmerken, dass sich der überwiegende Teil der Patienten der SOAP Studie zu über der Hälfte aus internistischen Patienten rekrutiert (Vincent 2006), wohingegen es sich bei dieser Studie um Patienten einer operativen Intensivstation handelt.

Es zeigte sich als mediane Intensiv Aufenthaltsdauer ein Zeitraum von 28 Tagen mit einer großen Spanne von 2-218 Tagen. Insgesamt muss man auf fünf Patienten hinweisen, die mit einem Zeitraum von über 100 Tagen eine lange Intensiv Aufenthaltsdauer aufwiesen, wobei man einen alleinigen Ausreißer mit 218 Tagen in der Placebogruppe gesondert erwähnen muss. Vergleichend mit der mittleren Verweildauer der Patienten der SOAP Studie mit nur 3 Tagen und einer Spanne von 2-7 Tagen ergibt sich somit eine verlängerte Aufenthaltsdauer für die Patienten unserer Studie.

Die Einschlusskriterien dieser Studie bezogen sich auf Symptome und Zeichen einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks, wohingegen der überwiegende Teil der Patienten der SOAP Studie an einer einfachen Sepsis erkrankt waren. Somit handelte es sich um einen anderen Schweregrad des

Krankheitsbildes der Patienten, womit sich die längere durchschnittliche Intensivaufenthaltsdauer im Vergleich erklären lässt.

Die GM-CSF Gabe bewirkt einen deutlichen Anstieg der HLA-Expression bei der Verumgruppe an den ersten beiden Tagen, an den folgenden Tagen liegt die mittlere monozytäre HLA-DR Expression der Verumgruppe signifikant über den Werten der Placebogruppe.

Insgesamt muss auch darauf hingewiesen werden, dass auf wenig Literatur bezüglich der monozytären HLA-DR Expression unter dem Einfluss der GM-CSF Gabe in vivo bei septischen Patienten zurückgegriffen werden kann.

Flohé beschrieb eine Wiederherstellung der HLA-DR Expression in vitro bei Patienten mit niedrigen MFI-Werten nach Trauma (Flohé 2003), Williams zeigte bereits 1998, dass eine ex vivo Stimulation mit GM-CSF die Monozytenfunktion im septischen Schock verbessert (Williams 1998). Beide zeigten jedoch keine Unterschiede zu einer Vergleichsgruppe auf und es handelte sich um ex vivo Stimulationen. Im weiteren Verlauf kommt es bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes zu einem Angleichen der MFI-Werte der beiden Gruppen und somit zu einer spontanen Erholung der monozytären HLA-DR Expression in der Placebogruppe. In einer anderen Untersuchung bei chirurgischen Patienten konnte gezeigt werden, dass die HLA-DR Expression durch operative Interventionen bereits postoperativ supprimiert ist und sich bei infizierten Patienten langsamer, aber dennoch spontan erhöht (Wakefield 1993). Unsere Gruppe konnte bei einem Kollektiv von 40 Intensivpatienten mit Sepsis und schwerer Sepsis die spontane Erholung der HLA-DR Expression auf Monozyten während der Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation beobachten. Dieser Anstieg war mit einer verbesserten Überlebensrate assoziiert (Zapfe 2004).

In dieser Studie ließ sich bei der Leukozytenzahl im Verlauf ein signifikanter Unterschied zwischen der Verum- zur Placebogruppe feststellen, bei den übrigen Parametern konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der beiden Gruppen aufgezeigt werden.

Der Anstieg der Leukozytenzahl ist ein klassisches Zeichen einer systemischen Inflammation (Adnet 1997, Oberhoffer 1999). In beiden Studiengruppen dieses Patientenkollektivs lagen erhöhte Leukozytenzahlen im Blut zu Beginn des Beobachtungszeitraumes vor, und man konnte eine höhere Leukozytenzahl im Verlauf bei der Verumgruppe im Unterschied zur Placebogruppe beobachten. Bei Patienten mit Sepsis als Zeichen einer systemischen Infektionen, wie sie in dieser Studie beschrieben werden, ist eine erhöhte Leukozytenzahl zu erwarten, wie sie auch schon zu Beginn des Beobachtungszeitraumes vorlag. Die Leukozytenzahl ist Bestandteil der Kriterien zur Sepsisdefinition und somit ein Bestandteil der Einschlusskriterien. Ebenso wurde ein weiterer Anstieg der Leukozyten in der Verumgruppe durch die Gabe von GM-CSF erwartet. Dieser Einfluss von rhGM-CSF als hämatologischer Wachstumsfaktor zeigt sich durch den insgesamt signifikant höheren Verlauf der Leukozytenzahl in der Verumgruppe.

In der Literatur werden Leukozytosen als häufige Wirkung des verwendeten Präparates Sagramostim genannt (Liescke 1989, Ganser 1989), wie sie auch in dieser Studie zu beobachten sind. Bei der Gabe von rhGM-CSF bei Neonaten mit Sepsis und Neutropenie wurde eine vergleichsweise stärkere Leukozytose in der Behandlungsgruppe gegenüber Kontrollgruppe gezeigt (Bilgin 2001). Weiterhin wurde in der Literatur von dem Auftreten leukopenischer Blutbilder durch die Gabe von GM-CSF berichtet. Es handelte sich hier um initiale Leukopenien die im weiteren Verlauf wieder hohe Werte erreichten, die über den Ausgangswerten lagen (Thomsen 2005). Auch das Auftreten von Leukopenien im gesamten Patientenkollektiv wäre nach den bekannten Kriterien zur Diagnose der Sepsis in dieser Studie nichts Ungewöhnliches (Bone 1992). Als Ursache hätte man sowohl das septische Krankheitsbild in der Placebo oder Verumgruppe, als auch die Gabe von rhGM-CSF in der Placebogruppe heranziehen können. In keiner der beiden Gruppen traten jedoch initiale Leukopenien oder niedrige Leukozytenzahlen im Verlauf auf.

Die Persistenz der erhöhten CRP-Werte ist ebenso Zeichen einer fortbestehenden systemischen Entzündungsreaktion.

Beim CRP konnte in einigen Untersuchungen ein Zusammenhang mit dem Schweregrad einer Sepsis nachgewiesen werden (Povoa 1998, Yentis 1995),

ebenso konnte dem CRP teilweise eine brauchbare Aussagekraft in der Verlaufsbeschreibung verschiedener Patienten nachgewiesen werden (Young 1991). In anderen Veröffentlichungen zeigte sich jedoch keine prognostische Aussagekraft bei Patienten mit septischen Krankheitsbildern bezüglich der CRP-Plasmaspiegel (Hermann 2000), weiterhin war es hier nicht möglich mittels der CRP-Werte zwischen SIRS und Sepsis zu unterscheiden (Selberg 2000).

In dieser Studie zeigt sich in beiden Gruppen unabhängig von Placebo- oder Verumgabe ein erhöhter CRP Spiegel im Verlauf.

Aufgrund der Erfahrungen aus der medizinischen Praxis mit erhöhten CRP-Werten bei Patienten mit systemischen Entzündungen haben wir bei unserem Patientenkollektiv unabhängig von der Placebo- oder der Verumgruppe höhere CRP-Plasmaspiegel bei Einschluss und im Verlauf erwartet. Unklar hingegen war der Einfluss durch die Gabe von GM-CSF auf die CRP-Werte. Leider stand keine aktuelle Literatur zur Verfügung, die den Einfluss von GM-CSF oder ähnlichen Wachstumsfaktoren auf die CRP-Plasmaspiegel untersucht und somit Vergleiche ermöglicht. Es mag daran liegen, dass CRP zwar als Marker im klinischen Alltag noch häufige Verwendung findet, aber bei wissenschaftlichen Untersuchungen zunehmend von anderen, spezifischeren Parametern wie zum Beispiel dem Procalcitonin abgelöst wird.

In dieser Studie zeigen sich beim Interleukin 6, bis auf zwei deutliche Spitzen im Verlauf bei der Verumgruppe, ähnliche Kurvenverläufe mit erhöhtem Interleukin 6 Werten in den beiden Gruppen. Betrachtet man andere Studien konnte in einigen Arbeiten eine statistische Signifikanz bezüglich der prognostischen Bedeutung für erhöhte IL 6 Plasmaspiegel gezeigt werden (Patel 1994, Casey 1993). Weiterhin stellte sich ein Zusammenhang zwischen den IL 6 Plasmaspiegel über die Zeit im Verhältnis zur Mortalität dar (Barriere 1995). In einer anderen Studie konnte Rodriguez-Gaspar zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen den maximalen IL 6 Konzentrationen und der Prognose der Patienten besteht (Rodriguez-Gaspar 2001).

Bei Einschluss in die Studie zeigten alle Patienten fallende Werte für Interleukin 6 im Plasma, die im Verbund mit der erniedrigten HLA-DR Expression als Ausdruck einer antiinflammatorischen Phase betrachtet werden können. Im

weiteren Verlauf zeigten sich auch höhere Plasmaspiegel in beiden Gruppen, die im Rahmen einer proinflammatorischen Reaktion bei dem Krankheitsbild der Sepsis erwartet wurden.

Die zwei Gipfel in den zeitlichen Kurvenverläufen der Interleukin 6 Plasmaspiegel scheinen mit der Gabe von GM-CSF im Zusammenhang zu stehen, da diese nur in der Verumgruppe auftraten. Möglicherweise lassen sich aufgrund der proinflammatorischen Eigenschaften und der Ähnlichkeiten des GM-CSF zu Rezeptoren von anderen Wachstumsfaktoren wie dem des Interleukin 6 (Lopez 1992) die Plasmaspiegelspitzen in der Verumgruppe erklären. Zahlreiche andere Arbeiten zeigten, dass die anhaltend hohen IL 6 Plasmaspiegel mehr Aussagekraft bezüglich des Outcome zu haben scheinen als initial hohe Konzentrationen oder Einzelspitzen (Pinsky 1993, Calandra 1990).

Bei IL 10, dem anderen in dieser Studie gemessenen Interleukin, zeigen sich insgesamt höhere Plasmaspiegel im Verlauf für die Verumgruppe als für die Placebogruppe.

Zahlreiche Studien in den 90er Jahren charakterisierten die IL 10 Reaktionen bei Patienten mit Sepsis. Sie beschrieben höhere Konzentrationen von IL 10 bei Patienten mit septischen Schock als bei Patienten mit einfacher Sepsis (Marchant 1994, 1995, Lehmann 1995). Friedman beschrieb die Korrelation der IL 10 Plasmaspiegel mit der Häufigkeit des Auftretens und der Schwere von Organdysfunktionen (Friedman 1997). Diese Erkenntnisse wurden von Neidhardt und Ertel untermauert, die zeigten, dass Patienten, die an schweren Verletzungen starben oder posttraumatische Komplikationen, wie etwa ein Multiorganversagen entwickelten, höhere IL 10 Plasmaspiegel hatten als Patienten, die einen unkomplizierten posttraumatischen Verlauf nahmen (Neidhardt 1997).

Flohé und Lendeman untersuchten den Effekt von GM-CSF bei Patienten nach schwerem Trauma. In beiden Studien ließ sich durch die Wirkung von GM-CSF eine Erhöhung der IL 10 Spiegel nachweisen (Flohé 2003, Lendemans 2006). Hierzu muss man anmerken, dass es sich im Gegensatz zu dieser Studie um eine Messung der Blutplasmaspiegel ex vivo nach LPS Stimulation handelt. Möglicherweise lassen sich aber auch die in dieser Studie beobachteten

erhöhten Plasmaspiegel des Interleukin 10 sowie die initial erhöhten Werte durch die Gabe von rhGM-CSF erklären.

Die Procalcitoninkurve zeigt, bis auf die initial erhöhten Werte in der Verumgruppe an den ersten neun Tagen, einen sehr ähnlichen Verlauf an den weiteren Tagen des Beobachtungszeitraumes.

Die Verumgruppe zeigt diese erhöhten Plasmaspiegel des proinflammatorischen Parameters Procalcitonin vermutlich als Reaktion auf die Stimulation von Monozyten und Zytokinen, hervorgerufen durch die Applikation des Wachstumsfaktors GM-CSF. In der Literatur werden diese Reaktionen des Procalcitonins als proinflammatorischer Marker bei Infektionen und Sepsis dargestellt (Brunkhorst 1998), bisher wurden aber nicht das Verhalten und die Reaktionen unter der Behandlung mit einem hämatopoetischen Wachstumsfaktor beschrieben.

Neben den erwarteten häufigsten Nebenwirkungen in Form von hämatologischen Veränderungen wie Leukozytosen und Thrombozytopenien (Liescke 1989, Ganser 1989) traten in dieser Studie keine unvorhergesehenen Ereignisse bei den Patienten nach der Gabe von rhGM-CSF auf.

Bezüglich nachteiliger Auswirkungen bei Gabe von GM-CSF werden kaum Beobachtungen in anderen Arbeiten beschrieben. Presneill beschreibt in seiner randomisierten Studie, in der eine intravenöse Gabe von GM-CSF an fünf aufeinanderfolgenden Tagen erfolgte, eine reversible Niereninsuffizienz mit einem Kreatininanstieg. In seiner Studie traten keine Unterschiede bezüglich der Leukozytenzahl auf (Presneill 2002).

In einer randomisierten Studie bei der die subcutane Gabe von rekombinanten GM-CSF an Neonaten durchgeführt wurde, traten keine unerwünschten Reaktionen auf. Bei ihren Untersuchungen wurde ebenfalls ein Anstieg der Leukozytenzahl in der Verumgruppe beobachtet, allerdings zeigte sich hier auch ein Anstieg der Thrombozytenzahl (Bilgin 2001). Auch in der Pilotstudie von Nierhaus et al. konnten nach der Gabe von rhGM-CSF keine allergischen Reaktionen oder andere unerwünschte Ereignisse beobachtet werden (Nierhaus 2003).

Von einem Fieberanstieg, der auf die Applikation von rhGM-CSF zurückzuführen ist, wurde in keiner der bekannten Studien berichtet. Auch in dieser Studie zeigte sich keine Auswirkung der rhGM-CSF Gabe auf die Körpertemperatur.

Es wurde auch keine Verschlechterung des Gasaustausches durch die Gabe von GM-CSF aufgezeigt. Eine Veränderung der respiratorischen Funktion wurde anhand des Delta MODS Wertes, der sich an den Oxigenierungsindex anlehnt, beurteilt. Diese Berechnung wurde nur an den ersten Tagen des Beobachtungszeitraumes durchgeführt. Später erfolgte keine weitere Evaluation in dieser Art. Da es sich aber bei unserem Patientenkollektiv um beatmete und schwer kranke Patienten handelte, wurden sie auch weiterhin mittels Blutgasanalysen und anderen Parametern der Lungenfunktion überwacht. Preisnell untersuchte in einer doppelblind randomisierten Studie an Patienten mit Sepsis und respiratorischer Dysfunktion die Auswirkungen von GM-CSF auf die pulmonale Situation, gemessen an dem Oxigenierungsindex. Es zeigte sich keine Verschlechterung des Gasaustausches innerhalb der beiden Behandlungsgruppen auf.

Betrachtet man die Aufnahmediagnosen und die damit verbundenen Infektionsdiagnosen in dieser Studie, erkennt man typische Infektionsbilder für Patienten auf einer operativen Intensivstation. Weiterhin lassen sich keine Unterschiede bezüglich der Verum- oder Placebogruppe aufzeigen.

Nebenbefundlich betrachteten wir das Auftreten von Pilzinfektionen innerhalb der beiden Gruppen. Hier zeigte sich eine unerwartete Verteilung. Während sich in beiden Gruppen die *Aspergillus* spp. als Erreger feststellen ließen, imponierte ein vermehrtes Auftreten von Candidainfektionen in der Verumgruppe. Dieses Phänomen lässt sich hier nur mit einer zufälligen Häufung erklären und wurde in der Literatur zuvor nicht beschrieben.

Die Auswertung der erhobenen klinischen Verlaufscores, SOFA und MODS, konnte über die Zeit keine signifikante Trennung aufweisen.

Die Scoresysteme wurden dazu entwickelt um Erkrankungsschwere und Therapieerfolg zu objektivieren und vergleichbarer zu machen (Vincent 1996,

Marshall 1995). Für eine individuelle Prognose im Bezug auf die Mortalität sind die Scoresysteme nicht verwertbar (Marshall 2000).

In dieser Studie zeigten sich bei beiden Scoreverlaufskurven insgesamt höhere Werte in der Verumgruppe. Betrachtet man die verschiedenen Organsysteme, die mit Punkten bewertet werden mussten um die Scoringwerte zu erheben, fällt als auslösender Faktor für die Unterschiede zwischen Verum und Placebogruppe das hämatologische System auf. Die Anzahl der Thrombozyten lag in der Verumgruppe signifikant unterhalb der Placebogruppe. Die Thrombozytenzahl ist der Parameter, der für das hämatologische System mit in die Erhebung der beiden Scores eingeht und sich somit auf die Punktwerte der einzelnen Patienten und schließlich auf die Scorewerte der beiden Behandlungsgruppen auswirkt. Um die Aussagekraft der Scores zu verbessern müsste zukünftig eine Einbeziehung der durchgeführten Maßnahmen und Therapien erfolgen (Marshall 2000), besonders wenn es sich wie in diesem Fall um eine Interventionsstudie handelt.

5.4. Einordnung der Ergebnisse in andere Studien

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Wachstumsfaktors GM-CSF auf die monozytäre HLA-DR Expression bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock zu ermitteln.

Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit der Bedeutung der monozytären HLA-DR Expression im klinischen Zusammenhang und der Erkenntnis, dass eine niedrige HLA-DR Expression als Zeichen einer verminderten Immunkompetenz zu werten ist.

Zu den frühesten Untersuchungen zählen die Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um Volk, die neben in vitro Studien auch die Veränderungen der monozytären HLA-DR Expression bei chirurgischen Patienten (Volk 1991) und bei transplantierten Patienten (Döcke 1997) mit septischen Komplikationen untersuchten und bei verminderter HLA-DR Expression eine deutlich erhöhte Mortalitätsrate fanden. In weiteren Studien bei chirurgischen Patienten konnte gezeigt werden, dass die HLA-DR Expression durch große operative Eingriffe bereits unmittelbar postoperativ supprimiert ist und sich zudem bei Patienten

mit einer Infektion langsamer erholt (Wakefield 1993). Die Gruppe um Kobold et al. untersuchte 20 septische Intensivpatienten und stellte heraus, dass eine Reduktion der Monozytenfunktion zum Aufnahmezeitpunkt mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Kobold 2000). In mehreren Studien wurden der Verlauf und die damit verbundene prognostische Aussagekraft der HLA-DR Expression bei Patienten mit Pankreatitis untersucht. Richter et al. zeigten 1996 und 1999, dass eine dauerhaft reduzierte HLA-DR Expression mit einer deutlich erhöhten Mortalität einhergeht (Richter 1996, 1999). Auch Götzing er untersuchte den Einfluss der operativen Versorgung bei Patienten mit schwerer Pankreatitis und bestätigte, dass die HLA-DR Expression in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung deutlich reduziert ist (Götzing er 2000). Eine japanische Arbeitsgruppe um Satoh bestätigte diese Ergebnisse (Satoh 2002).

Die niedrige HLA-DR Expression und damit der Ausdruck einer Minderfunktion des Immunsystems dienten einigen Arbeitsgruppen als Grundlage für weitere Untersuchungen und als Überlegung, zukünftig therapeutische Interventionen im Bezug auf den Immunstatus mit einzubeziehen.

In frühen Studien konnte gezeigt werden, dass verschiedene Zytokine oder Wachstumsfaktoren die HLA-DR Expression auf Monozyten normalisieren können. Döcke zeigte, dass unter dem Einfluss von Interferon γ eine Verbesserung der Monozytenfunktion eintrat und ein Anstieg der HLA-DR Expression erreicht wurde (Döcke 1997). In weiteren bereits erwähnten Studien wurden der Einfluss und die Wirkung von GM-CSF beobachtet.

Williams untersuchte 1998 die Eigenschaften von GM-CSF in vitro erstmalig bei septischen Patienten. Er beschrieb die Wiederherstellung der monozytären Anergie durch die GM-CSF Gabe ex vivo bei Patienten mit septischen Schock (Williams 1998). Bilgin zeigte einen Anstieg der Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten sowie eine erniedrigte Mortalität bei septischen Neonaten durch die Gabe des Wachstumsfaktors (Bilgin 2001).

In weiteren Studien stellte Perry heraus, dass die Plasmaspiegel von GM-CSF bei verstorbenen septischen Patienten signifikant niedriger waren als die gesunder Probanden (Perry 2002). Presneill untersuchte im gleichen Jahr die Auswirkungen von GM-CSF auf die Lungenfunktion bei septischen Patienten und zeigte eine Verbesserung des Gasaustausches. Flohé untersuchte den Einfluss von GM-CSF bei Patienten nach schwerem Trauma und zeigte eine

Verbesserung der Monozytenfunktion nach Gabe des Wachstumsfaktors in vitro.

Wie bereits beschrieben bildete die 2003 veröffentlichte Pilotstudie von Nierhaus et al. bei der erstmalig ein signifikanter Anstieg der HLA-DR Expression bei Erwachsenen mit Sepsis in vivo durch die GM-CSF Gabe demonstriert wurde, die Grundlage für diese Arbeit (Nierhaus 2003).

In neueren Untersuchungen, wie etwa in einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie 2005, konnte Rosenbloom zeigen, dass die GM-CSF Gabe bei septischen Patienten die funktionellen Inflammationsmarker auf Neutrophilen und Monozyten erhöht (Rosenbloom 2005). Lendemans untersuchte die Auswirkung verschiedener Wachstumsfaktoren bei Patienten nach schwerem Trauma. Sie zeigte, dass G-CSF, Interferon γ und auch GM-CSF die HLA-DR Expression auf Monozyten sowie die Interleukin 10 und TNF α Synthese in vitro erhöht (Lendemans 2006). Eine weitere In Vitro Untersuchung veröffentlichte auch Börgermann. Er zeigte, dass eine verminderte monozytäre HLA-DR Expression, als Zeichen eines supprimierten Immunsystems nach kardiopulmonalem Bypass durch die immunstimulierende Wirkung von GM-CSF wiederhergestellt werden kann (Börgermann 2007).

Unsere Untersuchungen konnten einen Einfluss des Wachstumsfaktors GM-CSF auf die monozytäre HLA-DR Expression bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock nachweisen. Durch die Applikation von GM-CSF kam es zu Veränderungen des Blutbildes mit Thrombozytopenie und Leukozytose, weiterhin konnten aber keine relevanten Nebenwirkungen durch die Gabe des Wachstumsfaktors aufgezeigt werden.

Weitere Studien sind nötig um diese Aussagen zu sichern und weiterführende Aussagen über die Mortalität und das Outcome durch diesen Therapieansatz treffen zu können. Es ist ebenfalls nötig die Messmethoden zu standardisieren. Dies gilt insbesondere dann, wenn die Untersuchung des Immunstatus zukünftig therapeutische Interventionen nach sich ziehen soll.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Sepsis, insbesondere schwere Sepsis und septischer Schock gelten weiterhin als Haupttodesursachen in der Intensivmedizin der westlichen Länder. Ein Großteil der Morbidität und Mortalität sind auf die infektiösen Folgeerscheinungen des systemisch-inflammatorischen Reaktionssyndroms zurückzuführen. Trotz immenser Fortschritte bei der Diagnostik und Therapie gestörter Organfunktionen in den letzten Jahren sind die Therapieansätze zur Modulation des Immunsystems bisher wenig Erfolg versprechend. Weiterhin wird daher versucht, einen geeigneten Parameter zu etablieren, der eine Diagnostik ermöglicht und mit dem Erfolg der Therapie korreliert.

Der Monozyt mit seinem Oberflächenantigen HLA-DR erfüllt als Bindeglied zwischen unspezifischer und spezifischer Immunantwort eine Schlüsselrolle im Immunsystem. Unterschiedliche Studien konnten Zusammenhänge zwischen der monozytären HLA-DR Expression und der Mortalität von Intensivpatienten mit septischer Erkrankung aufzeigen. Aufgrund dieser Entwicklung lag es nahe, nach Therapieoptionen zu suchen, welche die HLA-DR Oberflächenantigene beeinflussen.

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass der Wachstumsfaktor GM-CSF eine mögliche Therapieoption darstellt. Durch die Gabe von rhGM-CSF konnte die monozytäre HLA-DR Expression bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock signifikant erhöht werden. In dieser prospektiven, randomisierten Monocenterstudie konnte allerdings aufgrund der Größe des Patientenkollektivs keine Aussage bezüglich der Verbesserung der Mortalität und Morbidität durch die GM-CSF Gabe getroffen werden. Weitere Studien mit höheren Patientenzahlen an verschiedenen Kliniken könnten zeigen, ob der Wachstumsfaktor GM-CSF in Zukunft als Therapieansatz in der Behandlung septischer Patienten mit sekundärer Immunsuppression eine sinnvolle Option darstellt.

7. Literaturverzeichnis

Adnet F et al.: Value of C-Reactive Protein in the Detection of Bacterial Contamination at the Time of Presentation in Drug-Induced Aspiration Pneumonia. *Chest* 1997; 112:466-71

Angus DC: Study Design Issues in Sepsis Trials. *Sepsis* 2000; 4:7-13

Angus DC, Wax RS: Epidemiology of sepsis: An update. *Crit Care Med* 2001; Vol.29, No.7 (Suppl.)

Angus DC et al.: The PIRO concept: P is for predisposition. *Crit Care* 2003 Jun;7(3):248-51

Arndt P, Abraham E: Immunological therapy of sepsis: experimental therapies. *Intensive Care Med* 2001; 27: 104-15

Annane D: Effects of the combination of hydrocortisone (HC)-fludrocortisone (FC) on mortality in septic shock. *Crit Care Med* 2000; 28; A46

Barriere SL, Lowry SF: An overview of mortality risk prediction in sepsis. *Crit Care Med* 1995; Feb: 23(2):376-93

Bein T, Unertl K: Möglichkeiten und Grenzen von Score-Systemen in der Intensivmedizin. *Anaesth.Intensiv.Notfallmed.Schmerzth.* 1993;28;476-83

Belge KU et al. : The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002 ; Apr 1 :168(7) :3536-42

Benacerraf B: Antigen Processing and Presentation. The Biologic Role of MHC Molecules in Determinant Selection. *J Immunology* 1988; 141(7 Suppl)17-20

Benett IL et al.: The effectiveness of hydrocortisone in the management of severe Infection. *JAMA* 1963; 183: 462-65

Berlex Laboratories Inc. Richmond CA. Leukine® Sargramostim; 94804; 2002

Bilgin K et al.: A randomised trial of granulocyte-macrophage colony stimulating factor in neonates with sepsis and neutropenia. *Pediatrics* 2001; 107: 36-41

Blackwell TS, Christman JW : Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth.* 1996 77; 110-7

Bone RC et al.: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-874

Brunkhorst FM et al.: Kinetics of procalcitonin in iatrogenic sepsis. *Int Care Med* 1998; Aug:24(8):888-9

Brunkhorst FM: Definition und Diagnose der Sepsis nach aktuellen Kriterien. *Klinikerzt* 2004 33; 167-172

Brun-Buisson C: The epidemiology of systemic inflammatory response. *Int Care Med* 2000 26; 64-74

Börgermann J et al.: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Restores Decreased Monocyte HLA-DR Expression after Cardiopulmonary Bypass. *Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 55:24-31

Burgess AW et al.: Peptide Growth Factors and Their Receptors. *Springer Verlag* 1990; New York

Calandra T, Glauser MP: Cytokines and septic shock. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990; Sep-Oct;13(5):377-81

Calandra T, Cohen J: The International Sepsis Forum Consensus Conference on Definitions Infections in the Intensive Care Unit. *Crit Care Med* 2005;33:7

Casey LC et al.: Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1993 Oct 15; 119(8): 771-8

CDC-Definitionen Robert Koch-Institut, Berlin 2003

Dellinger RP. From bench to bedside : The future of sepsis research. Executive summary of an ACCP, National Institute of Allergy and Infectious Diseases , and National Heart, Lung and Blood Institute Workshop. *Chest* 1997; 111:744-53

Döcke WD et al.: Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN- γ treatment. *Nat Med* 1997; 3: 678-81

Döcke WD et al.: Immunoparalysis in Sepsis- from Phenomenon to Treatment Strategies. *Transplantationsmedizin* 1997;9:55-65

Engel C et al.: Epidemiology of sepsis in Germany: results from a prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007; 33:606-18

Fijen JW et al.: Leucocyte activation and cytokine production during experimental human endotoxaemia *Eur J Int Med* 2000; 11(2):89-95

Flohé S et al.: Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the immune response of circulating monocytes after severe trauma. *Crit Care Med* 2003; 31:10

Freeman BD, Natanson C: Anti-inflammatory therapies in sepsis and septic shock. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9: 1651-63

Friedman G et al.: Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit Care Med* 1998; 26:2078-2086

Frings DP et al.: Quantitative assessment of HLA-DR expression on monocytes as a key prognostic marker in SIRS and sepsis (abstract). *Crit Care Med* 2001;29:S 206

Ganser A, Karthaus M: Clinical use of hematopoietic growth factors in the myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 1997; Dec:26 Suppl 1:13-27

Godall GJ et al.: A model for the interaction of the GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors with their ligands. *Growth Factors*. 1993; 8(2):87-97

Götzinger P et al.: Severe Acute Pancreatitis Causes Alterations in HLA-DR and CD 14 Expression on Peripheral Blood Monocytes Independently of Surgical Treatment. *Eur J Surg* 2000;166:628-32

Grage-Griebenow E et al.: Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 2001;Jan;69(1):11-20

Harbarth S et al.: Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and Interleukin 8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 164; 396-402

Hartung T et al.: Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. *Blood* 1995; 85: 2482-89

Haveman JW et al.: The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *Neth J Med* 1999 55: 132-141

Hermann W et al.: Comparison of procalcitonin, sCD14 and Interleukin-6 values in septic patients. *Clin Chem Lab Med* 2000 Jan;38(1):41-6

Hughes M et al.: Outcome of long-stay intensive care patients. *Int Care Med* 2001 Apr;27(4):779-82

Ioannidis JP et al.: Comparison of evidence of treatment effects in randomized and nonrandomized studies *JAMA* 2001; Aug 15;286(7):821-30

Knaus W et al: APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13 (10): 818-29

Kox WJ et al.: Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Arch Intern Med* 1997; 157:389-393

Le Gall JR, Lemeshow S et al. : A New Simplified Acute Physiology Score. *JAMA* 1993; 270: 2957-2963

Le Gall JR et al.: A simplified acute physiology score for ICU patients. *Crit Care Med*. 1984; 12(11): 975-77

Lendemans S et al: Differential immunostimulating effect of Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and Interferon γ (IFN γ) after severe trauma. *Inflamm res* 2006; 56:38-44

Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al.: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31:4

Lieschke GJ et al.: Characterization of the clinical effects after first dose of bacterially synthesized recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1989; Dec:74(8):2634-43

Lopez AF, Elliott MJ, Woodcock J, Vadas MA: GM-CSF, IL-3 and IL-5: cross-competition on human haemopoietic cells. *Immunol Today*. 1992; 13(12): 495-500

Marchant A et al.: Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet* 1994; Mar 19:343(8899):707-8

Marshall JC: The Multiple Organ Dysfunction (MOD) Score. *Sepsis* 1997;1:49-52

Marshall JC et al.: Multiple Organ Dysfunction Score: A reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med.* 1995; 23(10):1638-52

Marshall JC: Clinical trials of mediator-directed Therapy in sepsis: what have we learned? *Intensive Care Med* 2000; 26: 75-83

Meisner M: Procalcitonin: A new, innovative infection parameter. Biochemical and clinical aspects. *Georg Thieme Verlag* 2000 Stuttgart

Monneret G et al.: Analytical Requirements for Measuring Monocytizing Human Lymphocyte Antigen DR by Flow Cytometry : Applications to the Monitoring of Patients with Septic Shock. *Clin Chem* 2002 ; 48(9) :1589-92

Muller Kobold AC et al. : Leukocyte activation in sepsis, correlation with disease state and mortality . *Intensive Care Med* 2000; 26: 883-892

Nebe CT: Flow Cytometric Analysis of Immunoparalysis. *Clinical Laboratory* 1998; 44:441-446

Neidhardt R et al.: Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients. *J Trauma* 1997 May; 42(5):863-70:870-1

Nierhaus A et al.: Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2003; 29: 646-651

Oberhoffer M et al.: Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 363-368).

Oberholzer A et al.: Interleukin 10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med* 2002 30; 58-63

Parker MM et al.: Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med* 1984 100; 483-490

Patel RT et al.: Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis. *Br J Surg* 1994 Sep;81(9):1306-8

Perry S et al.: Low plasma granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is an indicator of poor prognosis in sepsis. *Int Care Med* 2002; 28: 981-984

Pinsky MR et al.: Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 1993; Feb:103(2):565-75

Povoa P et al.: C reactive protein as an indicator of sepsis. *Int Care Med* 1998;24:1052-56

Presneill JJ et al.: A Randomized Phase II Trial of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Severe Sepsis with Respiratory Dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; Vol 166: 138-143

Quantikine®; Human GM-CSF: R und D Systems, Inc. 614 Mc Kinley Place N.E. Minneapolis, MN 55413, USA

Raffael A: Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Schmitz G, Rothe G (Hrsg.) Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik, Schattauer Stuttgart, New York 1994

Richter A et al.: Immune paralysis in acute pancreatitis-HLA-DR antigen expression on CD14+DR+ monocytes. *Langenbecks Arch Chir* 1996;381(1):38-41

Richter A et al.: HLA-DR expressions in acute pancreatitis. *Eur J Surg* 1999 Oct;165(10):947-51

Riott IM (1995) *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*, 3. Aufl. Thieme, Stuttgart New York

Rodriguez-Gaspar M et al.: Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients. *Cytokine* 2001, 15(4):232-6

Root RK, Dale DC: Granulocyte colony-stimulating factor and Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: comparisons and potential for use in the treatment of infections of nonneutropenic patients. *J Infect Dis* 1999; 179: 342-52

Rosenbloom AJ et al.: Effect of Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor Therapy on Leukocyte Function and Clearance of Serious Infection in Nonneutropenic Patients. *Chest* 2005;127/6

Sakamoto KM, Gasson JC : Clinical applications of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Int J Cell Cloning* 1991; 9(6): 531-41

Satoh A et al.: Human Leucozyte Antigen-DR Expressions on Peripheral monocytes as a Predictive Marker of Sepsis During Acute Pancreatitis. *Pancreas* 2002;25(3):245-50

Schuster HP: Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen. aus: Hans-Peter Schuster (Hrsg.) *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen* (1996) S.4-11, 15-16, 2.Aufl. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

Schuster HP: Abriss der Pathophysiologie als Grundlage der Therapie aus: Hans-Peter Schuster (Hrsg.) *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen* (1996) S.29-40 2.Aufl. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

Schuster HP: Systematik der Therapie bei Sepsis und Multiorganversagen. aus: Hans-Peter Schuster (Hrsg.) Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen 2000 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

Selberg O et al.: Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit Care Med* 2000 Aug;28(8):2793-8

Sierra R: C-reactive protein used as an early indicator of infection in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med.* 2004 30; 2038-45

Stone R: Search for sepsis drugs goes on despite past failures. *Science* 1994; 264;365-367

Thomson: MICROMEDEX Pharmakologische Datenbanken für Medizin und Pharmazie; Medizinisches Informationssystem CD-Rom Vol. 123; 3/2005

Unertl K, Kottler BM: Prognostische Scores in der Intensivmedizin. *Anaesthesist* 1997; 46:471-480

Van der Poll T: The use of granulocyte colony-stimulating factor in critically ill patients. *Crit Care Med* 2000; 28: 3758-59

Vincent JL et al.: The SOFA (Sepsis related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Int Care Med* 1996;22:707-10

Vincent JL: Organ Dysfunction as an Outcome Measure: The Sofa Score. *Sepsis.* 1997; 53-54

Vincent JL et al.: Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006; 34:2

Volk HD et al.: Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease-predictive value and new therapeutic strategies. *Behring Inst Mitt* 1991 Feb;(88):208-15

Volk HD et al: Monocyte deactivation- rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med.* 1996; 22: 474-481

Wakefield CH et al.: Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg* 1993 Feb; 80(2):205-9

Weigand MA et al.: Klinisches Management bei Patienten mit Sepsis. *Anästhesist* 2003 52; 3-22

Wilson RF et al.: Hemodynamic measurements in septic shock. *Arch surg* 1965 91; 121-217

Williams MA et al.: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces activation and restores respiratory burst activity in monocytes from septic patients. *J Infect Dis.* 1998 ; 177 : 107-115

Williams MA et al.: Monocyte Anergy in Septic Shock Is Associated with a Predilection to Apoptosis and Is Reversed by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Ex Vivo. *Infectious Diseases* 1998; 178:1421-33

www.cope-with-cytokines.de

www.dssresearch.com

www.sepsis-gesellschaft.de

Yentis SM et al.: C-reactive protein as an indicator of resolution of sepsis in the intensive care unit. *Int Care Med* 1995 ;21 :602-605

Young B et al.: C-Reactive Protein : A Critical Review. *Pathology* 1991 ;23,118-24

Zapfe A et al.: Spontaneous recovery of initial immunoparalysis in sepsis is associated with higher survival rate (*abstract*). *Int Care Med* 2004 ; Sep :30 :1

Ziegler-Heitbrock HW: Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. *Immunol Today* 1996; Sep;17(9):424-8

Ziegler-Heitbrock HW: Definitions of human blood monocytes. *J Leukoc Biol* 2000;67:603-606

8. Glossar

ACCP	American College of Chest Physicians
APACHE	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome
CDC	Center for disease control
CRP	C-reaktives Protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESICM	European Society of Intensive Care Medicin
FSC	Forward Angle Light Scatter
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HICAST	Hamburg Intensive CAre Scoring Tool
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ISS	Injury Severity Score
LOS	Length of stay
M-CSF	Makrophagen Kolonie Stimulierender Faktor
MARS	Mixed Antagonistic Response Syndrom
MHC	Major histocompatibility complex
MODS	Multiple Organ Dysfunction Score
MOV	Multiorganversagen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
ROC	Receiver Operating Characteristic
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	Systemisch Inflammatorisches Reaktionssyndrom
SOFA	Sepsis-related Organ Failure Assessment
SPSS	Statistical Package for the Social Science

SSC	Side Scatter
TGF	Transforming Growth Faktor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

9. Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. K. G. Kreyman für die freundliche Überlassung des Themas bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Dr. med. A. Nierhaus für die herausragende Betreuung und Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit!

Ebenso möchte mich bei Annett Heydorn bedanken die mich in die Geheimnisse der Durchflusszytometrie und Pipettiertechnik eingearbeitet hat.

Vielen Dank an Timo Steigemann für die arbeitsreiche, schöne Zeit und die tolle Teamarbeit!

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. B. Paddags für die unermüdliche Motivation und den Beistand mit Rat und Tat zu jeder Zeit!

10. Erklärung

Ich versichere Ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.