

Universitätsklinikums Hamburg - Eppendorf

Aus der Klinik für Intensivmedizin des Zentrums für

Anästhesiologie und Intensivmedizin

(Direktor: Prof. Dr. med. Kreymann)

Methodenvergleich zur durchflußzytometrischen Bestimmung von monozytärem HLA-DR bei septisch erkrankten Intensivpatienten

Dissertation

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

Vorgelegt von
Annett Heydorn, geb. Job
aus Wolgast

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 09.09.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. K.- G. Kreymann

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Panzer

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. med. J.- M. Pollok

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abbildungsverzeichnis	IV
	Tabellenverzeichnis	VI
1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung	2
2.1	Das Immunsystem	2
2.2	Sepsis und systemische Entzündung	3
2.3	Therapieoptionen und Immunmonitoring	6
2.4	Funktion von Monozyten und HLA-Rezeptor bei Immunantworten	7
2.5	Das HLA-DR Antigen	9
2.5.1	Genloci und Struktur	9
2.5.2	Funktion von HLA-DR	11
2.5.3	Prozessierung	12
2.5.4	Regulation der Expression	13
2.5.5	Bedeutung von HLA-DR	13
2.6	Durchflußzytometrie	14
2.6.1	Monoklonale Antikörper	14
2.7	CD Klassifikation und Oberflächenantigene	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Patientenpopulation und Einschlusskriterien	17
3.2	Messung der HLA-DR Expression auf Monozyten (Testprinzip)	18
3.3	Material	18
3.3.1	Reagenzien	18

3.3.2	Einwegmaterialien	19
3.3.3	Geräte und Software	19
3.4	Methoden	19
3.4.1	Grundlagen der Durchflußzytometrie	19
3.4.2	Die verwendeten Antikörper und ihre Funktion	23
3.4.3	Methode nach Nebe (modifiziert)	24
3.4.3.1	Färbungen	24
3.4.3.2	Geräte Setup	25
3.4.3.3	Messung und Auswertung der Oberflächenmarkierungen	26
3.4.4	Methode nach QuantiBRITE™ BD	28
3.4.4.1	Färbung nach Produktinformation QuantiBRITE™ BD	28
3.4.4.2	Geräte Setup	29
3.4.4.3	Geräte Kalibration	29
3.4.4.4	Messung und Auswertung der Oberflächenmarkierungen	30
3.4.5	Erhebung der Scorewerte	31
4	Ergebnisse	36
4.1	Demographie	36
4.2	Ergebnisse der monozytären HLA-DR Expression	37
4.2.1	Ergebnisse der Kontrollgruppe	37
4.2.2	Ergebnisse der Kontrollgruppe im Vergleich zur Studiengruppe	38
4.2.3	Ergebnisse der Methode nach Nebe	39
4.2.4	Ergebnisse der QuantiBRITE™ Methode	43
4.2.5	Vergleich der Methoden untereinander	44
4.3	Ergebnisse der klinischen Scores	47

5	Diskussion	50
5.1	Kernaussage	50
5.2	Methodenkritik	50
5.3	Diskussion der Ergebnisse im Einzelnen	54
6	Zusammenfassung und Ausblick	62
7	Literaturverzeichnis	63
8	Danksagung	72
9	Lebenslauf	73
10	Eidesstattliche Erklärung	74

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Zusammenhang von Sepsis, SIRS und Infektion	4
Abb. 2	Auslösung einer Entzündungsantwort	5
Abb. 3	Genloci der Humanen Leukozyten Antigene	10
Abb. 4	Struktur des HLA Klasse I und II Moleküls	11
Abb. 5	Antigenprozessierung	12
Abb. 6	Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers	20
Abb. 7	Spektralüberlappung der einzelnen Fluorochrome	26
Abb. 8	Gating der Monozyten	27
Abb. 9	Festlegung des Schwellenwertes für ein positives Fluoreszenzsignal	27
Abb. 10	Messung der Patientenprobe	27
Abb. 11	Histogrammdarstellung der Patientenprobe	28
Abb. 12	Histogrammdarstellung der Messergebnisse der QuantiBRITE™ PE Beads	29
Abb. 13	Erstellung der Eichkurve mit linearer Regression	30
Abb. 14	Gating der Monozyten	31
Abb. 15	Histogrammdarstellung der Patientenprobe	31
Abb. 16	Mortalitätswahrscheinlichkeit des APACHE II	32
Abb. 17	Mortalitätswahrscheinlichkeit des SAPS II	33
Abb. 18	Mortalitätswahrscheinlichkeit MODS	34
Abb. 19	Analyse der HLA-DR [MFI] Werte für Kontroll- und Studiengruppe an Tag 1	38
Abb. 20	Analyse der HLA-DR [%] Werte für Kontroll- und Studiengruppe an Tag 1	39
Abb. 21	Analyse der HLA-DR [AB/C] Werte für Kontroll- und Studiengruppe an Tag 1	39
Abb. 22	Analyse der HLA-DR [MFI] Werte des Patientenkollektivs an Tag 1	40
Abb. 23	HLA-DR [MFI] Expression im Verlauf	41
Abb. 24	Analyse der HLA-DR [%] Werte des Patientenkollektivs an Tag 1	42
Abb. 25	HLA-DR [%] Expression im Verlauf	42

Abbildungsverzeichnis

Abb. 26	Analyse der HLA-DR [AB/C] Werte des Patientenkollektivs an Tag 1	43
Abb. 27	HLA-DR [AB/C] Expression im Verlauf	44
Abb. 28	Korrelationsanalyse der HLA-DR Expression [MFI] und [%]	46
Abb. 29	Korrelationsanalyse der HLA-DR Expression [MFI] und [AB/C]	46
Abb. 30	Korrelationsanalyse der HLA-DR Expression [AB/C] und [%]	47
Abb. 31	MODS Werte im Verlauf	48
Abb. 32	SOFA Werte im Verlauf	48
Abb. 33	ELEBUTE Werte im Verlauf	49

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Diagnosekriterien des SIRS	3
Tab. 2	Definitionen der Folgeerscheinungen von SIRS und Sepsis	4
Tab. 3	Zuordnung der primären Signalerfassung durch die verschiedenen Photomultiplier	25
Tab. 4	Demographische Daten der eingeschlossenen Patienten	36
Tab. 5	Verteilung der Hauptdiagnosen der Studienpatienten	37
Tab. 6	Die Verteilung der Infektionsdiagnosen der Studienpatienten	37
Tab. 7	Mittelwerte, Standardabweichungen und Spannen der Kontrollgruppe	37
Tab. 8	Mittelwerte, Standardabweichungen und Spannen der Studiengruppe an Tag 1	38
Tab. 9	Zusammenfassung der Ergebnisse der monozytären HLA-DR Expression an Tag 1 des Intensivaufenthaltes	45
Tab. 10	Sensitivität und Spezifität bezüglich der ICU Mortalität für das Merkmal der prolongierten HLA-DR Suppression	45
Tab. 11	Korrelationsparameter der drei untersuchten Bestimmungsmethoden	46
Tab. 12	APACHE II und SAPS II Score am Aufnahmetag für verstorbene und überlebende Patienten	47

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Der sich ständig erweiternde Erkenntnisstand über die physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen des humanen Immunsystems weckt zunehmend die Hoffnung auf neue erfolgreiche Therapiestrategien bei schweren klinischen Krankheitsbildern wie der Sepsis, dem systemisch-inflammatorischen Reaktionssyndrom oder dem Multiorganversagen, die durch eine generalisierte Stimulation des Immunsystems hervorgerufen werden.

Zur Entwicklung neuartiger Therapiekonzepte, aber auch zur Kontrolle bereits angewandter therapeutischer Interventionen bei der Behandlung von Dysfunktionen des Immunsystems bedarf es adäquater biologischer Testverfahren, die es erlauben den Zustand des Immunsystems zuverlässig zu beurteilen.

Bisherige Studien konnten zeigen, dass die monozytäre HLA-DR Expression ein Parameter ist, der die Reaktionslage des Immunsystems verlässlich widerspiegelt.

Die Monozyten sind als Bestandteil der angeborenen Immunität zentrale Elemente bei immunologischen Abwehrprozessen. Neben ihren phagozytierenden Eigenschaften, die einen wesentlichen Aspekt der unspezifischen Immunantwort darstellen, tragen sie als antigenpräsentierende Zellen zur Aktivierung von T-Helfer Zellen bei und sind somit Vermittler zwischen der angeborenen und erworbenen Immunität. Für diese Funktionalität ist das Oberflächenantigen HLA-DR von großer Bedeutung. Es stellt darüber hinaus einen Aktivierungsmarker für Monozyten dar, dessen reduzierte Expression zu Störungen der Immunantwort führt.

Die optimale Messmethode für diesen Parameter konnte jedoch noch nicht identifiziert werden und Unterschiede in Präanalytik und Analytik haben einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der Messung, wodurch auch ein Vergleich der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen erschwert ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei sowohl in der Methodik der Durchführung als auch der Analyse unterschiedliche Verfahren zur Bestimmung der HLA-DR Expression auf Monozyten zu vergleichen. Zentrale Fragestellungen sind die Vergleichbarkeit der Methoden untereinander sowie die Aussagekraft beider Methoden im Hinblick auf Erkrankungsschwere sowie Prognose von septisch kranken Intensivpatienten.

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Das humane Immunsystem ist ein im gesamten Körper verteiltes Organ, das aus ca. 1×10^{12} mobilen Einzelzellen wie T-, B-Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen sowie den lymphatischen Organen besteht. Die Immunantwort des Menschen lässt sich in die angeborene und die erworbene Immunität untergliedern.

Die angeborene, direkte Immunität beruht auf Resistenzfaktoren, die keinen vorhergehenden Kontakt mit den Pathogenen benötigen. Sie setzt sich aus mechanischen Barrieren, wie z.B. Epithelzellen der Haut und mukösen Belägen der Schleimhäute sowie aus humoralen Faktoren (pH, Lipide, Enzyme, Komplementfaktoren, Interleukine, Akutphasenproteine) zusammen. Darüber hinaus zählen hierzu die zellulären Abwehrmechanismen durch phagozytierende Zellen wie Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen. Evolutionär handelt es sich um Basisabwehrmechanismen, die mit vergleichsweise unspezifischer Mustererkennung arbeiten, deren Vorteil aber eine besonders kurze Reaktionszeit ist.

Die adaptive, erworbene Immunität beruht auf antigenspezifischen Erkennungsmechanismen, deren volle Wirkung zu einem späteren Zeitpunkt auftritt und aus einem Zusammenspiel von rezeptortragenden Makrophagen, T- und B-Lymphozyten besteht. Die bedeutsamste Eigenschaft der adaptiven Immunität ist die Ausbildung des so genannten immunologischen Gedächtnisses, das durch die Bildung von Antikörpern aufrechterhalten wird. Bei einem erneuten Antigenkontakt können schnellere und spezifische Abwehrreaktionen erfolgen, da die Immunfaktoren bereits in größeren Mengen vorliegen. Im engeren Sinn ist Immunität (lat.: immunis = frei, unberührt, rein) die erworbene Resistenz vor Infektionskrankheiten.

Auch die spezifische Immunabwehr lässt sich in zelluläre und humorale Mechanismen unterteilen. Die Komponenten der zellulären T-Zell Antwort (zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen) und der humoralen Abwehr (B-Zellen, Antikörper) rekrutieren und konzentrieren Effektorproteine (Zytokine, Chemokine) spezifisch dort, wo Antigene vorkommen.

So ergibt sich aus der Kombination angeborener Mechanismen wie der Aktivierung von Makrophagen, natürlichen Killerzellen und Komplement und der direkten Erkennung durch das adaptive System aus B- und T-Lymphozyten mit nachfolgender

hochspezifischer Erkennung durch Antikörper und zytotoxischen T-Lymphozyten eine äußerst effiziente Immunantwort.

2.2 Sepsis und systemische Entzündung

Sepsis ist definiert als das Vorliegen einer Infektion in Verbindung mit einer systemischen Entzündungsreaktion. Der sich in der Folge entwickelnde systemische Entzündungsprozess kann unterschiedliche Verläufe nehmen: Selbstlimitierung der Entzündungsreaktion nach Beseitigung des Pathogens, Triggerung einer chronisch verlaufenden Entzündung, und schließlich letaler Ausgang durch die Folgen einer überschießenden oder ungenügenden Immunantwort. Klinische Korrelate einer exzessiven Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen sind der septische Schock und das Multiorganversagen.

Einige Arbeitsgruppen publizieren seit Mitte der achtziger Jahre, dass sich diese klinischen Syndrome auch ohne vorliegende mikrobielle Infektionen entwickeln können (Bone 1991; Goris, te Boekhorst et al. 1985; Marshall und Sweeney 1990).

Von einer Konsensuskonferenz der Society of Critical Care Medicine (SCCM) und des American College of Chest Physicians (ACCP) wurde 1992 für dieses klinische Bild der Begriff des systemisch inflammatorischen Reaktionssyndroms (SIRS) eingeführt (Bone, Balk et al. 1992). Ziel dieser Konferenz war es, eine Vielfalt von Begrifflichkeiten, die zur Beschreibung des so genannten septischen Syndroms und seiner Folgezustände genutzt wurden, neu und einheitlich zu definieren.

Die Diagnose eines SIRS beinhaltet den Nachweis von Veränderungen der Herzfrequenz, der Körpertemperatur, der Atemfrequenz oder der Anzahl der Leukozyten (Tab. 1).

Körpertemperatur	>38 °C oder <36 °C
Herzfrequenz	>90 /min
Atemfrequenz	>20 /min oder PaCO ₂ < 32mmHg oder kontrollierte Beatmung
Leukozytenzahl	>12000 /µl oder < 4000 /µl oder >10% unreife Neutrophile

Tab. 1: Diagnosekriterien des systemisch inflammatorischen Reaktionssyndroms (SIRS).

Ursächlich liegen einem SIRS neben Infektionen auch nichtinfektiöse Erkrankungen wie beispielsweise Pankreatitis, Ischämie oder Polytrauma zugrunde (Abb. 1). SIRS mit positivem Erregernachweis wird als Sepsis bezeichnet.

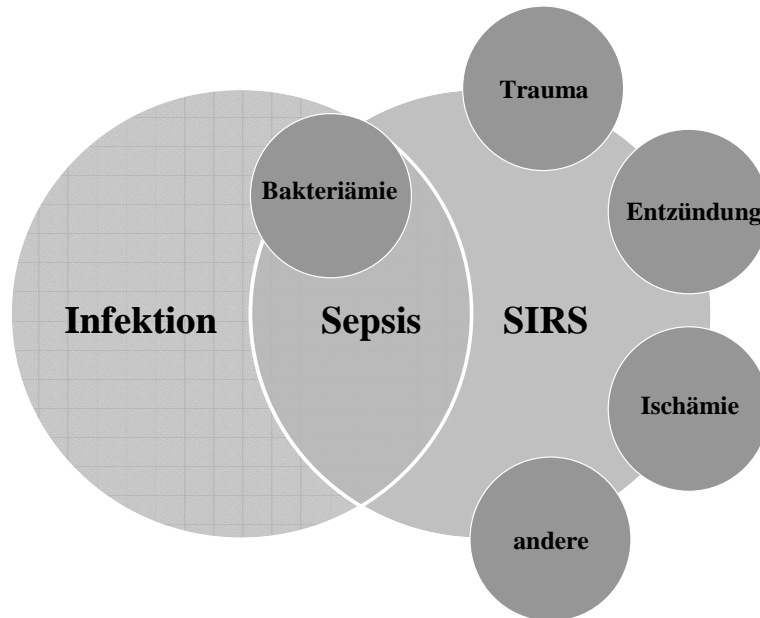


Abb. 1: Die Zusammenhänge von Infektion, Sepsis und SIRS (Bone, Balk et al. 1992).

Die Folgen eines SIRS oder einer Sepsis, wie schwere Sepsis, septischer Schock, eine Multiorgandysfunktion oder das Multiorganversagen, stellen ein Kontinuum von klinischen und pathophysiologischen Schweregraden dar. In Tabelle 2 sind die Definitionen dieser Folgeerscheinungen nach der Konsensuskonferenz von 1992 zusammengefasst.

Schwere Sepsis	Sepsis mit assoziierter Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotension.
Septischer Schock	Sepsis mit Hypotension trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr und Zeichen des Vorliegens von Perfusionsstörungen.
Multiorgandysfunktion	Vorliegen von verschiedenen Organdysfunktionen, die eine Aufrechterhaltung der Homöostase ohne Intervention unmöglich machen.
Multiorganversagen	Auftreten von gleichzeitigen oder in rascher Abfolge entstehenden Ausfällen mehrerer Organsysteme.

Tab. 2: Definitionen der Folgeerscheinungen von SIRS und Sepsis (Bone, Balk et al. 1992).

Mikroorganismen, die in den Körper eindringen, lösen eine Entzündungsreaktion aus, die die unmittelbare Umgebung der Infektion verändert. Bei der Antwort auf eine Entzündung werden viele Zellen aktiviert und moduliert (Abb. 2).

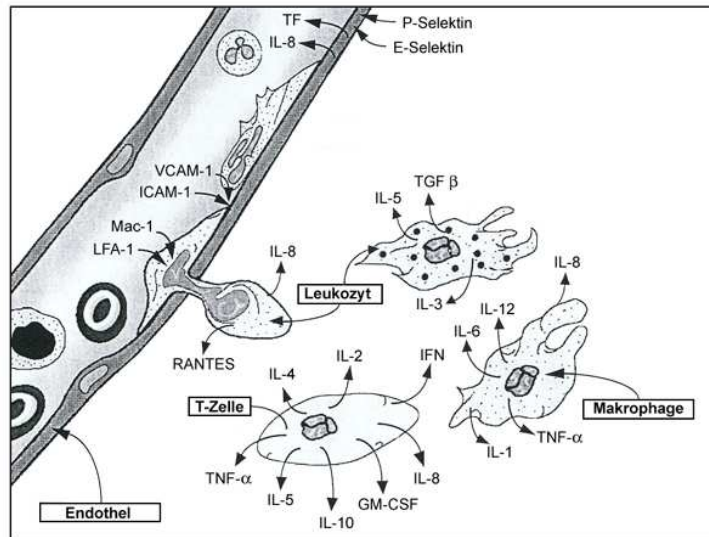


Abb. 2: Auslösung einer Entzündungsantwort.

Aktivierte vaskuläre Endothelien im Gewebe exprimieren verschiedene Mediatoren, die zirkulierende Leukozyten an den Ort der Entzündung führen. Aktivierte Leukozyten exprimieren verschiedene Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, die zu der Auslösung der Entzündung beitragen. (verändert nach Manning and Rao, 1999) TF – tissue factor, IL – Interleukin, VCAM/ICAM – vaskuläre Adhäsionsmoleküle, Mac – Leukozytenintegrin, LFA – funktionelles Leukozytenantigen, TGF – transforming growth factor, RANTES – Chemokin der CC-Gruppe (zwei benachbarte Cysteine), TNF – Tumornekrosefaktor, IFN – Interferon, GM-CSF – Granulozyten Makrophagen-koloniestimulierender Faktor

Ortsständige Makrophagen erkennen dabei mit Hilfe ihrer Oberflächenmoleküle Bestandteile bakterieller Membranen, beispielsweise Lipopolysaccharid, und werden nach Bindung an diese aktiviert. Daraufhin phagozytieren sie das Pathogen und beginnen mit der Synthese und Freisetzung der Zytokine Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin 1, 6 und 12 (IL 1, IL 6, IL 12) sowie des Chemokins Interleukin 8 (IL 8).

Diese Substanzen, besonders aber TNF α , verursachen eine Endothelzellaktivierung mit Produktion von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche, die die Anhaftung von Leukozyten fördern, und zu einer erhöhten Permeabilität führen, so dass es zu den charakteristischen Merkmalen einer Entzündung Rötung, Schwellung, Wärme und Schmerz kommt. Das Chemokin IL 8 besitzt eine ständige chemotaktische Aktivität und

lockt weitere immunmodulatorische Zellen, wie neutrophile Leukozyten und Monozyten an den Ort des Geschehens.

T-Lymphozyten werden von Makrophagen über die Ausschüttung von IL 6 und IL 1 aktiviert und exprimieren ebenfalls Zytokine, wodurch sie auf die B-Zellaktivierung (IL 4), das Wachstum und die Differenzierung von dendritischen Zellen (GM-CSF) und der myelomonozytären Zelllinie wirken.

Im Verlauf kommt es darüber hinaus zur Aktivierung der Gerinnungskaskade, die zu einer Verlegung des lokalen Endstromgebietes führt, wodurch eine Ausbreitung der Infektion über das Blut verhindert werden soll.

Flüssigkeiten und Zellen werden über das Lymphsystem in die regionalen Lymphknoten abgeleitet, um dort adaptive Immunreaktionen zu initiieren.

Gelingt es dem Organismus durch die beschriebenen Mechanismen nicht, die Infektion zu beherrschen und entsteht eine generalisierte Entzündungsreaktion, resultiert eine Sepsis, wobei es zu einer allgemeinen Aktivierung der immunologischen Effektorzellen und zur systemischen Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren kommt. Dabei verliert der Organismus die Fähigkeit, die Entzündungsantwort durch Produktion von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren zu regulieren. Die Stimulation von Monozyten/Makrophagen bewirkt eine exzessive Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$, IL 6 und IL 10. Diese führen zu einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und zur Bildung von Sauerstoffradikalen. Weiterhin kommt es zu einer systemischen Aktivierung der Gerinnungskaskade und Schädigung von Endothel- und Parenchymzellen.

Gleichzeitig setzt eine ausgeprägte antiinflammatorische Gegenregulation ein, die zu einer Immunsuppression und einer damit verbundenen ungenügenden Infektabwehr führen kann, in deren Folge es zu Gewebeschädigungen, Multiorganversagen und schließlich zum Tod des Patienten kommen kann.

2.3 Therapieoptionen und Immunmonitoring

Die Behandlung einer Sepsis umfasst die Behandlung der zugrunde liegenden Infektion durch gezielte antimikrobielle Therapie sowie durch die chirurgische Sanierung des Infektionsherdes. Zusätzlich wird die intensivmedizinische Therapie zur Kreislaufstabilisierung, Erhaltung der Mikrozirkulation, Unterstützung gestörter Organfunktionen und Beseitigung der Azidose angewendet.

Ungeachtet des immensen Fortschrittes in den diagnostischen, chirurgischen und intensivmedizinischen Möglichkeiten, den weiterentwickelten Antibiotikatherapien sowie des besseren Verständnisses der pathophysiologischen Vorgängen bei einer Sepsis, sind Morbidität und Mortalität der Erkrankung und ihrer Folgezustände nahezu unverändert hoch (Brun-Buisson 2000; Brun-Buisson, Doyon et al. 1995; Hotchkiss und Karl 2003; Todd, Acha-Orbea et al. 1988).

Darüber hinaus wird eine genauere Selektion der Patientenkollektive bezogen auf die Erkrankungsschwere und die Grunderkrankung gefordert (Fisher und Zheng 1996).

Nach einer Metaanalyse und kritischen Betrachtung der immunmodulatorischen Sepsisstudien der letzten 30 Jahre fasst Graf 2002 die Ursachen für das Scheitern vieler klinischer Untersuchungen wie folgt zusammen: Ein ungenügendes Verständnis der pro- und antiinflammatorischen Interaktionen, fehlende adäquate präklinische Modelle zur Evaluation gezielter Therapien, ungenügende Populationsgröße zum Nachweis glaubwürdiger Unterschiede sowie methodische Mängel bei der Planung und Durchführung klinischer Studien (Graf, Doig et al. 2002).

Bereits 2001 wurden von einer Arbeitsgruppe um Cohen neue Richtlinien vorgestellt, die zur Verbesserung der methodischen Durchführung klinischer Studien führen sollten (Cohen, Guyatt et al. 2001). Neben einer genauen Selektion der Patienten wurde die Orientierung am biologischen Test, wie zum Beispiel der Erhebung der monozytären HLA-DR Expression als Marker der zellulären Immunantwort, gefordert, bevor eine Intervention vorgenommen wird.

Jeder Immun*therapie* sollte somit ein Immun*monitoring* vorausgehen.

2.4 Funktion von Monozyten und HLA bei Immunantworten

Aus der myeloischen Vorläuferzelle differenzieren sich während der Hämatopoese Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Mastzellen. Makrophagen sind eine der drei phagozytierenden Zelltypen des Immunsystems und stellen die gereifte Form der Monozyten dar. Diese zirkulieren als größte Zellen des weißen Differenzialblutbildes mit einem polymorphen Kern in nicht granuliertem, hellblau erscheinendem Plasma frei im Blut und bilden den Pool, aus dem sich die Makrophagen fortwährend differenzieren, sobald sie durch Migration in die Gewebe eindringen. Sie sind in sämtlichen Geweben des Organismus vorhanden, besonders zahlreich liegen sie aber im Bindegewebe, in Verbindung mit dem Verdauungstrakt, in der Lunge, als

Kupffer-Zellen entlang bestimmter Blutgefäße in der Leber und überall in der Milz vor, wo sie gealterte Blutzellen abbauen (Schiebler, Schmidt et al. 1999).

Makrophagen sind die ersten Zellen, die im Gewebe mit einem Pathogen, das die mechanischen Barrieren der Haut und Schleimhaut überwunden hat, in Kontakt kommen. Gemeinsam mit den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten sind sie bei der angeborenen Immunität von entscheidender Bedeutung, da sie zahlreiche Krankheitserreger ohne die Unterstützung durch die adaptive Immunantwort erkennen, aufnehmen und zerstören können. Makrophagen und neutrophile Zellen erkennen Krankheitserreger mit Hilfe von mustererkennenden Rezeptoren auf ihren Zelloberflächen, die zwischen Oberflächenmolekülen von Pathogenen und körpereigenen Zellen unterscheiden können. Beispiele solcher Rezeptoren sind der Makrophagen-Mannoserezeptor, der Scavenger-Rezeptor sowie der CD14-Rezeptor für bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), der hauptsächlich bei Monozyten/Makrophagen vorkommt (Janeway, Travers et al. 2002).

Das Erkennen und Binden der Krankheitserreger an Oberflächenrezeptoren führt zur Phagozytose, einem aktiven Prozess, bei dem das Pathogen als membranumhülltes Vesikel aufgenommen wird. Anschließend verschmilzt es intrazellulär mit so genannten Lysosomen, wobei dessen antimikrobielle Substanzen das Pathogen zerstören. Bei diesen Vorgängen erzeugen Makrophagen und neutrophile Zellen weitere toxische Produkte, die durch ihre direkten toxischen Effekte beim Abtöten der aufgenommenen Mikroorganismen mitwirken, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Superoxidanion (O^{2-}) und Stickstoffmonoxid (NO).

Eine weitere wichtige Reaktion bei der Wechselwirkung zwischen Pathogen und Makrophagen ist die Zellaktivierung, die zur Synthese und Freisetzung von Zytokinen und anderen Mediatoren führt, darunter Interleukine (IL 1, IL 6, IL 12) und $TNF\alpha$, die durch ihre im wesentlichen proinflammatorischen Wirkungen zur Entzündungsreaktion beitragen, Chemokine, z.B. IL 8, die zur Chemotaxis, der Anlockung weiterer Abwehrzellen dienen sowie costimulierende Moleküle, die bei der Initiierung und Steuerung der adaptiven Immunantwort in späteren Phasen einer Infektion von wesentlicher Bedeutung sind (Benacerraf 1988; Lin, Astiz et al. 1994).

Darüber hinaus haben die Monozyten/Makrophagen als Verbindungsglied zwischen angeborener und erworbener Immunität entscheidende Funktionen im Ablauf von Immunreaktionen. Nach enzymatischem intrazellulärem Abbau der pathogenen Antigenstrukturen werden kurze spezifische Peptidsequenzen, die an HLA-Moleküle

gebunden sind, auf der Zelloberfläche der Monozyten präsentiert. Damit wird gegenüber anderen Zellen eine Identifizierung als Selbst- oder Fremdartigen erst möglich. Die kurzen Peptidfragmente des Antigens werden von verschiedenen Subpopulationen der T-Lymphozyten mit anschließender Signaltransduktion erkannt. Als Zellen, die sowohl im Rahmen der angeborenen, unspezifischen, als auch bei der adaptiven, spezifischen Immunantwort mitwirken, nehmen die Monozyten eine zentrale Stellung in immunologischen Prozessen ein (Janeway, Travers et al. 2002).

2.5 Das HLA-DR Antigen

Das Humane Leukozyten Antigen (HLA) ist ein Glykoprotein der HLA-Familie auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen (APC), das von einer großen Gruppe von Genen codiert wird.

Zuerst wurden diese Gene 1958 von Dausset beschrieben, als er ihren Einfluss auf die Immunantwort in der Folge von Gewebs- und Organtransplantationen erkannte. Aus diesem Grund wird diese Gruppe von Genen der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) oder auch Transplantationsantigene genannt (Dausset 1958).

Die HLA-Antigene werden in verschiedene Klassen eingeteilt. HLA-Klasse I Antigene kommen auf den Oberflächen aller kernhaltigen Zellen vor und präsentieren intrazellulär synthetisierte Aminosäuresequenzen. HLA-Klasse II Antigene werden ausschließlich auf immunkompetenten Zellen wie Monozyten/Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Sie präsentieren körperfremdes antigenes Material gegenüber den Effektorzellen des Immunsystems.

2.5.1 Genloci und Struktur

Der MHC (HLA) Genkomplex, der sich beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 befindet, beinhaltet mehr als 200 Gene, von denen wiederum mehr als 40 für die Humanen Leukozyten Antigene kodieren. Die entsprechenden Antigene umfassen das HLA System sowie in enger Nachbarschaft zu den HLA Genloci weitere Geneorte für einige Proteine des Komplementsystems, Blutgruppenantigene, Enzyme und TNF (Todd, Acha-Orbea et al. 1988). Die MHC Gene werden in die Klassen I und

II unterteilt (MHC Klasse I; MHC Klasse II), die sich sowohl strukturell als auch funktionell unterscheiden.

MHC Klasse I verfügt über drei Genorte: HLA-A mit ca. 20, HLA-B mit ca. 40 und HLA-C mit ca. 10 Allelen. MHC Klasse II determiniert den mindestens ebenfalls aus drei Genorten bestehenden HLA-D Locus. Zunächst waren die Allele des D-Locus nur mittels Lymphozytenmischkultur zu bestimmen. Als man allelspezifische Antisera für diese Genkomplexe fand, konnte man für den Genorte HLA-DR 12 Allele und für HLA-DQ sowie HLA-DP je 4 Allele serologisch differenzieren (Klein und Sato 2000) (Abb. 3).

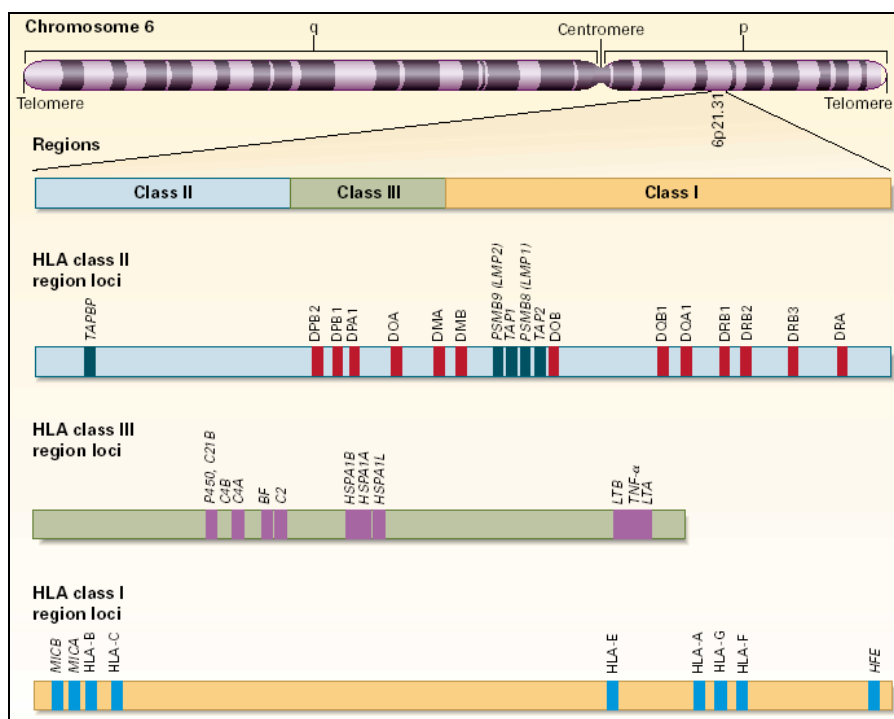


Abb. 3: Genloci der Humanen Leukozyten Antigene (Klein und Sato 2000).

Die funktionell bedeutsamste Eigenschaft der MHC Gene ist ihre genetische Vielfalt, die sich auf der Polygenie (für jede Klasse von HLA Molekülen codieren mehrere Gene) und einem hohen Polymorphismus (jedes der Gene besitzt zahlreiche Varianten) begründet.

Die MHC Klasse I Gene kodieren die α -Polypeptidkette der HLA Klasse I Antigene, wohingegen die β -Kette vom β_2 -Mikroglobulin Gen auf Chromosom 15 codiert wird. Die α -Kette hat fünf Domänen: zwei peptidbindende ($\alpha 1$ und $\alpha 2$), eine immunoglobulinähnliche ($\alpha 3$), eine Transmembranregion und einen zytosolischen Teil (Abb. 4). Im Gegensatz dazu codieren die MHC Klasse II Gene für die α - und β -

Glycopeptidketten der HLA Klasse II Antigene. Jede der HLA Klasse II α - und β -Ketten hat vier Domänen: die peptidbindende Domäne ($\alpha 1$ oder $\beta 1$), eine immunglobulinähnliche ($\alpha 2$ oder $\beta 2$), eine Transmembranregion sowie einen zytosolischen Teil (Klein und Sato 2000) (Abb. 4).

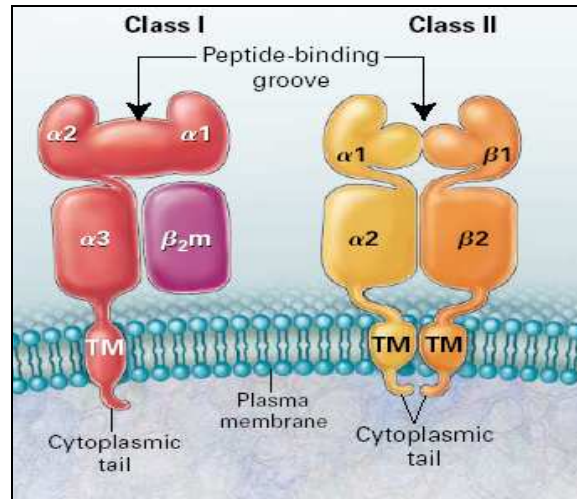


Abb. 4: Struktur der HLA Klasse I und HLA Klasse II Moleküle (Klein und Sato 2000).

Inzwischen konnte durch Röntgenstrukturanalysen auch der Aufbau der molekularen HLA Strukturen geklärt werden (Janeway, Travers et al. 2002).

2.5.2 Funktion von HLA-DR

Als Moleküle der HLA Klasse II Antigene, die vorwiegend auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden, leisten HLA-DR Oberflächenantigene einen entscheidenden Beitrag zur immunologischen Kennzeichnung der Zelle als "Selbst". Dies ist eine Grundvoraussetzung für das Immunsystem eine Fremderkennung zu gewährleisten. Darüber hinaus fungieren sie als zentrales Vermittlermolekül zwischen angeborener und erworbener Immunität. HLA-DR bindet intrazellulär Peptidfragmente, die von endozytotisch/phagozytotisch aufgenommenen Pathogenen stammen, um sie auf der Zelloberfläche zu präsentieren (Benacerraf 1988).

Diese Form des HLA-DR Peptid Komplexes stellt einen T-Zell Rezeptorliganden dar und wird spezifisch von CD4 T-Helferzellen erkannt. Diese Subpopulation von T-Lymphozyten ist darauf spezialisiert, andere Zellen zu aktivieren und bildet wiederum zwei funktionelle Klassen: die T_H1 -Zellen (gelegentlich auch inflammatorische T-Zellen genannt) aktivieren hauptsächlich Makrophagen, die daraufhin diese

intravesikulären Bakterien in ihrem Inneren abtöten sowie die T_H2 -Zellen oder T-Helferzellen, die B-Lymphozyten zur Bildung von Antikörpern anregen (Janeway, Travers et al. 2002).

2.5.3 Prozessierung

Der Biosyntheseweg der HLA Klasse II Moleküle beginnt, wie bei anderen Glykoproteinen der Zelloberfläche auch, mit der Translokation in das endoplasmatische Retikulum. Dabei muss eine Bindung der ebenfalls im endoplasmatischen Retikulum zahlreich vorkommenden neu synthetisierten körpereigenen Polypeptidketten an die offene peptidbindende Furche des HLA Moleküls verhindert werden. Die peptidbindende Furche wird daher durch ein Protein, der MHC Klasse II assoziierten invarianten Kette, blockiert. Eine weitere Funktion der invarianten Kette scheint darin zu bestehen, den Transport der HLA Moleküle zum endosomalen Kompartiment zu dirigieren. Nachdem beide Vesikel verschmolzen sind, wird die invariante Kette über mehrere Schritte wieder abgespalten, womit nun eine Beladung des HLA Klasse II Moleküls mit den pathogenen Peptidfragmenten möglich ist. Die Freigabe des letzten Fragmentes der invarianten Kette (CLIP Fragment) sowie die Beladung mit antigenen Peptiden wird von einem HLA Klasse II ähnlichem Molekül (HLA-DM) katalysiert. Anschließend verschmelzen Vesikel und äußere Zellmembran, wodurch das peptidbeladene HLA Klasse II Molekül außen auf der Zellmembran zu liegen kommt und seine Funktion der Antigenpräsentation wahrnehmen kann (Abb. 5).

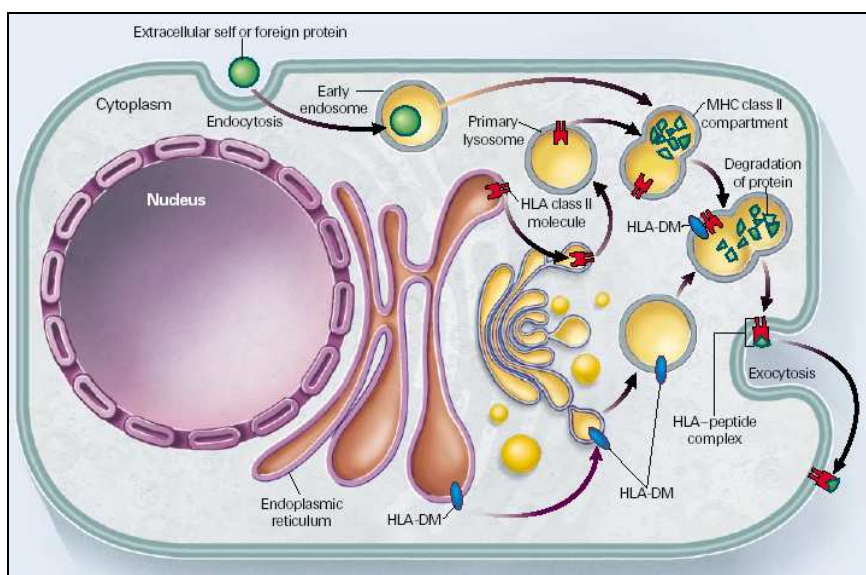


Abb. 5: Antigenprozessierung (Klein und Sato 2000).

2.5.4 Regulation der Expression

Entsprechend der zentralen Stellung der HLA Klasse II Antigene unterliegt ihre Expression auf den antigenpräsentierenden Zellen und somit auch auf den peripheren Blutmonozyten einer stringenten Regulation. Verschiedene Zytokine, die insbesondere die zelluläre Immunantwort stimulieren, wie Interferon γ , Interleukin 12 oder GM-CSF, die bevorzugt aus Lymphozyten freigesetzt werden, bewirken direkt oder indirekt eine Stimulation der monozytären HLA-DR Expression. Inhibierende Immunmediatoren wie Interleukin 10, TNF α , TGF β und Prostaglandin E2 hemmen sie dagegen. Darüber hinaus verringern auch immunsupprimierende Medikamente wie Glukokortikoide oder Cyclosporin A auf direktem oder indirektem Weg (Hemmung der Interferon γ Synthese, Induktion immunsuppressiver Mediatoren wie IL 10 oder TGF β 1) die Expression von HLA-DR auf Monozyten.

Die HLA-DR Expression auf den Monozyten spiegelt daher in besonderer Weise den aktuellen Status der zellulären Immunkompetenz wider.

2.5.5 Bedeutung von HLA-DR

Eine starke Verminderung der monozytären HLA-DR Expression wird häufig in der Folge schwerer Operationen, Traumata, systemischer Infektionen sowie bei hochdosierten immunsuppressiven Therapien beobachtet und als Zeichen für eine global eingeschränkte Immunkompetenz gewertet (Ditschkowski, Kreuzfelder et al. 1999; Giannoudis, Smith et al. 2000; Hershman, Cheadle et al. 1990; Satoh, Miura et al. 2002). Persistiert diese verminderte HLA-DR Expression über einen längeren Zeitraum besteht ein hohes Risiko für den Patienten, an bakteriellen oder mykotischen Infektionen zu erkranken und zu versterben (Volk, Reinke et al. 1996).

Bei iatrogen immunsupprimierten Transplantationspatienten mit einer stark verminderten monozytären HLA-DR Expression konnten septische Komplikationen durch eine Reduktion der immunsuppressiven Therapie überwunden werden, ohne die Rejektion des Transplantates zu induzieren. Das bedeutet, dass durch eine verminderte HLA-DR Expression das Immunsystem weder in der Lage ist, eine Infektion abzuwehren, noch ein Allograft abzustößen. Ein Andauern dieser so genannten „Immunparalyse“ ist mit der Integrität eines Organismus und somit mit dem Überleben nicht vereinbar (Volk, Reinke et al. 2000).

Immunologisches Korrelat der Immunparalyse ist die Monozytendeaktivierung, deren wesentlicher Parameter eine stark verminderte HLA-DR Expression ist. Darüber hinaus ist aber auch ihre Kapazität zur Bildung verschiedener proinflammatorischer Zytokine vermindert, wohingegen die Produktion antiinflammatorischer Zytokine oft erhalten bleibt (Volk, Reinke et al. 1989).

2.6 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie stellt ein modernes Messverfahren zur Beurteilung von Partikeln in wässrigen Suspensionen dar, das bis vor wenigen Jahren ausschließlich in der Grundlagenforschung Anwendung fand. Die Optimierung auf dem Gebiet der Herstellung monoklonaler Antikörper, die Entdeckung geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe, sowie die Verbesserung der Zytometer, verbunden mit einer einfacheren Gerätebedienung, ermöglichten es der Durchflußzytometrie zu einer weiten Verbreitung in der klinischen Routine zu gelangen (Eckhardt 1994).

Das Durchflußzytometer bietet als optisches System vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. Es können Zelleigenschaften von Zellgröße und Granularität sowie RNA- und DNA-Gehalt, über Antigeneigenschaften von Zellen bis hin zu Zellfunktionen wie Phagozytose oder Apoptose analysiert werden.

2.6.1 Monoklonale Antikörper

Köhler und Milstein entwickelten in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts ein Verfahren, das es ihnen ermöglichte gegen nahezu jedes Antigen monoklonale Antikörper zu produzieren (Köhler und Milstein 1975).

Die Herstellung monoklonaler Antikörper erfolgt mittels der Hybridomtechnik. Hierzu werden Lymphozyten aus der Milz einer immunisierten Maus isoliert und mit Myelomzellen fusioniert. Unter den entstandenen unsterblichen Hybridomen werden diejenigen selektiert, die Antikörper mit der höchsten Spezifität gegen das gesuchte Antigen produzieren. Anschließend werden sie durch Klonierung vermehrt (Steward und Male 1995).

Das Hauptanwendungsgebiet monoklonaler Antikörper findet sich in der Immunfluoreszenztechnik, wo sie u.a. zur Markierung von Zelloberflächenstrukturen eingesetzt werden. Dazu werden sie entweder direkt oder indirekt an einen

Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Bei der indirekten Markierung wird ein zweiter monoklonaler Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, zur Immunfluoreszenzmarkierung benötigt. Vorteil direkter Färbungen ist eine schnelle und einfache Durchführung im Gegensatz zu indirekten Färbemethoden. Ein Nachteil besteht allerdings in der unter Umständen nicht ausreichenden Fluorochromkonjugation für den Nachweis schwach exprimierter Antigenstrukturen. Im Routinelabor häufig verwendete Farbstoffe sind Phycoerythrin (PE) mit einer Fluoreszenz im roten Bereich (578 nm) des sichtbaren Lichtes sowie Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) mit einer Fluoreszenz im grünen Bereich (525 nm), die beide mit einem Argonlaser (488nm) angeregt werden können. Weiterhin ist bei der Wahl der Farbstoffkombinationen auf die relative Sensitivität der Fluorochrome zu achten. Da PE eine 10fach höhere Empfindlichkeit als z.B. FITC aufweist, empfiehlt es sich für schwach exprimierte Antigenstrukturen PE-konjugierte Antikörper einzusetzen (Raffael, Nebe et al. 1994).

2.7 CD Klassifikation und Oberflächenantigene

Nach der Etablierung des Verfahrens zur Herstellung monoklonaler Antikörper entstanden viele nebeneinander existierende Nomenklaturen von Antikörpern, hervorgerufen aus der Entwicklung verschiedener Labore und kommerzieller Hersteller. Um eine Systematik in die Vielfalt der Reagenzien zu erlangen, werden seit 1980 regelmäßig internationale Workshops veranstaltet.

Monoklonale Antikörper, die das gleiche Zelloberflächenantigen erkennen, wurden zu so genannten Cluster of differentiation (CD) zusammengefasst. Nach der CD Klassifizierung folgen die typischen Zellpopulation und das Molekulargewicht des spezifischen Antigens in Kilodalton. Die voranstehenden Buchstaben p (protein), gp (glycoprotein), gl (glycolipid), CHO (carbohydrate) oder u (unknown) beschreiben das Antigen.

Aufgrund spezifischer Antigenmuster auf Zelloberflächen können so durch den Einsatz monoklonaler Antikörper verschiedene Zellpopulationen nicht nur in ihrer Art, sondern auch in ihrem Aktivierungszustand unterschieden werden.

3 Material und Methoden

Nach Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg wurden konsekutiv 60 Patienten zweier operativer sowie einer internistischen Intensivstation des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf innerhalb von 8-24 Stunden nach Aufnahme auf die Erfüllung vorgegebener Einschluss- bzw. Ausschlusskriterien untersucht und gegebenenfalls in die Studie eingeschlossen, sofern die erwartete Aufenthaltsdauer mehr als drei Tage betrug.

Der Beobachtungszeitraum umfasste die Dauer des Intensivaufenthaltes und endete spätestens nach 14 Tagen oder mit der Verlegung von der Intensivstation bzw. dem Versterben des Patienten.

Zur Ermittlung von Normalwerten wurde bei 25 gesunden Probanden die monozytäre HLA-DR Expression bestimmt. Vorbestehende immunologische Erkrankungen wurden anamnestisch ausgeschlossen.

Beginnend mit dem Einschlusstag wurde an jedem Wochentag (Montag bis Freitag) die Expression von HLA-DR auf Monozyten durch zwei unterschiedliche Methoden durchflußzytometrisch bestimmt. Dies ist zum einen eine modifizierte Methode nach Nebe (Nebe 1998), zum anderen die Methode nach Becton Dickinson, bei der ein kommerzielles Testkit zur Anwendung kommt. Diese wurde erstmals von einer Arbeitsgruppe um Volk und Döcke an der Charité Berlin beschrieben (Döcke 2001).

Zur Beurteilung der Erkrankungsschwere wurde für die Patientengruppe sowohl der Acute Physiology And Chronic Health Evaluation Score (APACHE II) (Knaus, Draper et al. 1985), als auch der Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) (Le Gall, Lemeshow et al. 1993) für die ersten 24 Stunden des Intensivaufenthaltes erhoben. Zur Verlaufsbeurteilung wurden ab dem ersten Tag für jeden Aufenthaltstag die Punktwerte des Multiple Organ Dysfunction Score (MODS), (Marshall, Cook et al. 1995) und des Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) (Vincent, Moreno et al. 1996) sowie des ELEBUTE (Elebute und Stoner 1983) bestimmt.

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe von SPSS für Windows (Statistical Package for the Social Science; Version 10.0, Chicago, USA) ausgewertet. Hierzu wurden mit dem Kolmogorow-Smirnow Test die Datenreihen auf ihre Verteilung geprüft. Zum Vergleich unabhängiger, nichtparametrischer Stichproben wurde der U-Test von Mann, Whitney und Wilcoxon durchgeführt. Um mehr als zwei abhängige Stichproben zu

vergleichen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen angewendet. Die Signifikanzen über den Verlauf des Beobachtungszeitraumes wurden mit der Methode des allgemeinen linearen Modells ermittelt.

Zur Berechnung dichotomer Zielgrößen wurde auf der Grundlage eines Vierfelder-Testes mittels eines χ^2 -Testes auf Unabhängigkeit geprüft. Anhand des Spearman'schen Korrelationskoeffizienten wurde der Zusammenhang zwischen den Merkmalen beschrieben. Der untere Grenzwert der HLA-DR Expression auf Monozyten wurde anhand einer beschreibenden graphischen Darstellung der Mittelwerte über den Beobachtungszeitraum bestimmt.

Zum Vergleich der Aussagekraft zweier dichotomer Merkmale bezüglich eines Ereignisses wurde das jeweilige relative Risiko berechnet.

3.1 Patientenpopulation und Einschlusskriterien

Einschluss in die Studie fanden 60 konsekutive Patienten im Alter zwischen 18 und 80 Jahren mit dem Krankheitsbild einer Sepsis. Nach Aufnahme auf die Intensivstation wurden die Patienten innerhalb eines Zeitfensters von 8-24 Stunden auf die Erfüllung vorbestimmter Einschlusskriterien untersucht. Zur Definition der Sepsis wurden die etablierten ACCP/SCCM Kriterien (Bone, Balk et al. 1992), wie sie in der Tab. 1 dargestellt sind, herangezogen: Vorliegen eines Systemischen Inflammatorischen Response Syndroms (SIRS) mit positivem Infektionsnachweis. Die Infektionsdiagnosen, die zum Einschluss in die Studie beitrugen, wurden nach den Richtlinien des Center of Disease Control (CDC) gestellt (Garner, Jarvis et al. 1988).

Patienten mit angeborenen oder erworbenen Immundefekten, iatrogener Immunsuppression oder Behandlung mit koloniestimulierenden Faktoren/IFN γ wurden ebenso von der Studie ausgeschlossen wie Patienten mit hämatologischen Erkrankungen der weißen Blutzellreihe. Eine Überlappung des Patientenkollektives mit anderen Studien wurde vermieden.

Die Blutproben zur Bestimmung der immunologischen Verlaufsparemeter wurden mindestens montags bis freitags täglich entnommen.

Als Beobachtungszeitraum wurden die ersten 14 Tage des Intensivaufenthaltes festgelegt, vorzeitiges Verlassen der Intensivstation beendete die Studienteilnahme.

Die Patienten oder deren Angehörige wurden durch ein Informationsblatt über den Inhalt der Studie und die damit verbundenen Blutentnahmen aufgeklärt.

3.2 Messung der HLA-DR Expression auf Monozyten (Testprinzip)

Das Prinzip der HLA-DR Bestimmung auf Monozyten basiert auf einer Antigen Antikörper Reaktion. Die zu untersuchenden Zellen mit den membrangebundenen Molekülen HLA-DR, CD14 und CD64 werden im EDTA Vollblut, mittels fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper, markiert und anschließend im Durchflußzytometer gemessen und computergestützt ausgewertet.

3.3 Material

3.3.1 Reagenzien

FACS™ Lysing Solution, 10fach konzentriert (Becton Dickinson, Heidelberg, Cat.Nr.349202)

FacsFlow™ (Becton Dickinson, Heidelberg, Cat.Nr.342003)

Phosphat Buffered Saline (PBS), pH 7,2, Mg²⁺ und Ca²⁺ frei

Monoklonale Antikörper:

IgG1 PE Isotypkontrolle

Klon 679.1Mc7 (Immunotech, Marseille, Cat.Nr. IM0670)

CD14 FITC

Klon MφP 9 (Becton Dickinson, Heidelberg, Cat.Nr .347 493)

Anti-HLA-DR PE

Klon L 243 (Becton Dickinson, Heidelberg, Cat.Nr. 347 367)

QuantiBRITE™ Anti-HLA-DR PE/Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5
(Becton Dickinson, Heidelberg, Cat.Nr. 340 827)

Kalibration

CaliBRITE™ 3-Beads (Becton Dickinson, Heidelberg, Cat.Nr. 349502)

QuantiBRITE™ PE-Beads (Becton Dickinson, Heidelberg, Cat.Nr. 340495)

3.3.2 Einwegmaterialien

Falcon R 5 ml Polysterenanalyseröhrchen Falcon 2052 (Falcon, Oxnard CA, USA)

3.3.3 Geräte und Software

Durchflusszytometer FACS Calibur System (Becton Dickinson, Heidelberg)

FACSCComp Software Version 4.2 (Becton Dickinson, Heidelberg)

CellQuest Pro Software (Becton Dickinson, Heidelberg)

QuantiCALC Software (Becton Dickinson, Heidelberg)

Datenverarbeitungssystem: Apple Macintosh, Power Mac

Kühlzentrifuge Heraeus (Sepatech, Osterode)

Mixer Vortex-Genie (Bender und Hobein, München)

Transferpipetten und austauschbare Kunststoffspitzen (Eppendorf, Hamburg)

Wasserstrahlpumpe

3.4 Methoden

3.4.1 Grundlagen der Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie unterliegt methodisch einem prinzipiellen Ablauf, der für alle analytischen Fragestellungen analog anzuwenden ist.

Zur Messung kommen vorwiegend Einzelzellen aus verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie z.B. Blut, Punktate oder Spülflüssigkeiten, wobei die Herkunft nicht relevant ist, solange die Zellen als Suspension von 0,5 bis 20 Mio. Zellen pro Milliliter vorliegen. Diese müssen den Analysepunkt, d.h. den Ort, an dem das Laserlicht und der Flüssigkeitsstrahl senkrecht aufeinander treffen, passieren. Nur Zellen, die diesen Punkt

passieren, können korrekt erfasst, analysiert und klassifiziert werden (Raffael, Nebe et al. 1994). Um dies zu gewährleisten bedient man sich des Verfahrens der hydrodynamischen Fokussierung, das sich aus zwei Flüssigkeitszugängen zusammensetzt. Über einen Zugang wird mittels einer Pumpe kontinuierlich Trägerflüssigkeit in die aus Quarzglas bestehende Messküvette gepumpt. Die Zellsuspension wird über einen zweiten Zugang, entweder über ein Ansaugsystem oder mittels Überdruck in die Messkammer überführt. Das Ende der zweiten Kapillare ist auf das Zentrum der Messküvette gerichtet. Unmittelbar nachdem die Zellsuspension die Kapillare verlässt, wird sie von der Trägerflüssigkeit erfasst. Beim Zustrom auf die Messküvette erfährt der Probenstrom so eine Beschleunigung von wenigen Zentimetern pro Sekunde auf etwa sieben Meter pro Sekunde, so dass die Einzelzellen hintereinander aufgereiht, wie an einer Perlenkette, den Analysepunkt passieren und detektiert werden (Ormerod 1990; Longobardi Givan 1992).

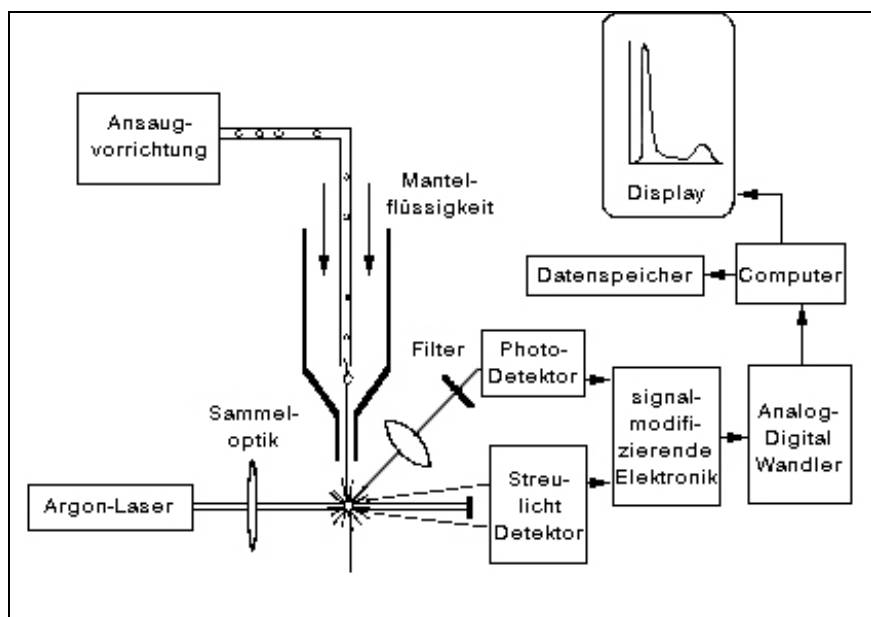


Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Durchflußzytometers.

Die Lichtquellen, die in der Durchflußzytometrie eingesetzt werden, müssen verschiedene Anforderungen erfüllen. Die häufigste Anwendung finden monochromatische Laser, wie z.B. der Argon-Ionenlaser oder Helium-Neon-Ionenlaser. Eine hohe Energiedichte und konstante Strahlenleistung sind erforderlich, um ausreichende Fluoreszenz- und Streulichtsignale zu induzieren. Reflektionsspiegel an beiden Enden der Röhre verstärken die Stimulation und durch Einstellung eines Prismas

am hinteren Ende der Röhre lässt sich eine bestimmte Wellenlänge (z.B. 488 nm beim Argonlaser) herausfiltern. Ein an der Vorderseite der Röhre befindlicher Spiegel lässt einen Teil des Lichtes passieren. Dieser Teil des Laserstrahls wird durch eine optische Einrichtung fokussiert und auf die Messküvette mit der Zellsuspension ausgerichtet (Ormerod 1990).

Am Kreuzungspunkt zwischen dem Lichtstrahl und jeder einzelnen Zelle entstehen charakteristische Fluoreszenz- und Streulichteffekte in verschiedenen Raumwinkeln, die durch ein Signalverarbeitungssystem erfasst und quantifiziert werden. Dadurch werden unterschiedliche Eigenschaften der Zellen bzw. Partikel wiedergegeben. Üblicherweise wird die Lichtstreuung im Vorwärtsstreulicht $0^\circ - 10^\circ$ (forward scatter = FSC) und im Seitwärtsstreulicht von 90° (side scatter = SSC) detektiert. Das Vorwärtsstreulicht gibt Zellgrößenrelationen wieder, Seitwärtslichtstreuung beruht auf unterschiedlichen Eigenschaften der Zelle und liefert Informationen über Zellmembran, Zellkern und intrazelluläre Bestandteile (Granularität), wodurch sich die einzelnen Subpopulationen voneinander abgrenzen lassen.

Unter Fluoreszenz versteht man die Eigenschaft von bestimmten Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlen mit einer rasch abklingenden Lichtemission zu reagieren, wobei die verschiedenen Farbstoffe (Fluorochrome) auf unterschiedliche Frequenzbereiche als Anregungsspektren reagieren. Diese Eigenschaft der Fluorochrome wird genutzt, indem man die zu analysierenden Zellen zuvor entweder direkt mit den Fluorochromen anfärbt, die selbst eine spezifische Affinität zu bestimmten Zellstrukturen haben, wie z.B. Propidiumjodid (PI) mit roter Fluoreszenz für DNA-Messungen oder es können Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) an monoklonale Antikörper gebunden werden, die spezifisch für die zu untersuchenden Strukturen sind (Ormerod 1990; Raffael, Nebe et al. 1994).

Die Farbstoffe werden zumeist mit einem blaugrün leuchtenden Argonlaser (488 nm) und/oder einem rot strahlenden Heliumneonlaser (633 nm) angeregt. Die verwendeten Fluorochrome müssen also hier ihr Absorptionsmaximum besitzen. Wählt man Fluorochrome, die sich in ihrer emittierten Wellenlänge (Fluoreszenzfarbe) unterscheiden, kann man eine Mehrfarbenfluoreszenzmessung bei einer Anregungswellenlänge durchführen. Um eine exakte Trennung der Signale zu gewährleisten, muss ein Unterschied in der Absorptions- und Emissionswellenlänge (Stokes shift) bei der Mehrfarbenfluoreszenzanalyse vorhanden sein. Darüber

hinausgehende Untersuchungen, die aufgrund des Aufwandes nur zum Teil in der Routine zum Einsatz kommen, werden z.B. durch den Einsatz von Tandem-Farbstoffen oder mehreren Laser verschiedener Wellenlänge möglich. Bei der Verwendung verschiedener Fluorochrome kommt es vor, dass sich deren Emissionsspektren überlappen, so dass eine manuelle Korrektur (Kompensation) der Messung notwendig wird (Abb. 7).

Nach jeder Interaktion einer Zelle mit dem Laserstrahl werden FSC, SSC und die Fluoreszenz(en) gemessen. Dazu kommen zwei Arten von Detektoren zur Anwendung: erstens die Photodiode, die ein Detektor mit einer geringen Lichtempfindlichkeit ist und Verwendung bei der Messung relativ intensiver Lichtsignale, wie dem Vorwärtsstreulicht findet. Zweitens der Photomultiplier (Photoröhre), der in der Lage ist, ein sehr schwaches Lichtsignal um mehrere Größenordnungen zu verstärken. Zur Verstärkung der schwächeren Fluoreszenz- und Seitwärtsstreulichtsignale werden daher Photomultiplier eingesetzt.

Die Wahl der Signalverstärkung hängt von der zu untersuchenden Zellpopulation und deren Eigenschaften ab. So stehen zwei Arten der Signalverstärkung, eine lineare und eine logarithmische, zur Verfügung. Bei Parametern, die einen großen Bereich von Kanälen benötigen, kommt die logarithmische Verstärkung in einem Bereich von vier Dekaden (1 bis 10.000 logarithmischen Skalenkanälen) zum Einsatz. Aufgrund der Eigenschaft biologischer Merkmale, häufig lognormal verteilt zu sein, ist für die Immunfluoreszenz zumeist eine logarithmische Verstärkung des detektierten Signals notwendig, um die Unterschiede bei geringer Merkmalsausprägung, wie z.B. der Dichte eines Antigens auf der Zelloberfläche, besser unterscheiden und einen breiten dynamischen Bereich erfassen zu können. Für die meisten Anwendungen werden Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht jedoch linear und die Fluoreszenz logarithmisch verstärkt (Raffael, Nebe et al. 1994).

Die Signalverarbeitung erfolgt mittels eines Analog Digital Wandlers (ADC), der das gegebenenfalls zunächst logarithmisch verstärkte, analoge Signal in ein digitales konvertiert. Die Fluoreszenzintensitäten müssen in einem zweiten Schritt mit Hilfe der Software in logarithmische Werte zurückverwandelt werden. Die gemessenen Signale werden dabei je nach Auflösung des ADC in 256 bzw. 1024 Kanäle getrennt. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, einen elektronischen Schwellenwert (threshold), der sich auf einen bestimmten Auslöseparameter bezieht (z.B. Vorwärtsstreulicht),

miteinzubeziehen. Diese Einstellung wird häufig genutzt, um Rausch- und Störsignale zu reduzieren (Eckhardt 1994; Longobardi Givan 1992).

Für die Analyse dieser Daten werden leistungsfähige Computerprogramme benötigt, welche die Möglichkeit bieten, die Einzelparameter in beliebigen Kombinationen darzustellen. Die einfachste Art der graphischen Wiedergabe der Messwerte ist die Histogramm- oder Häufigkeitsverteilung (Einparameterdarstellung) in linearer oder logarithmischer Auflösung. Korrelierte Zweiparameterdarstellungen zeigen die Relation zweier verschiedener Eigenschaften einer Zelle. Hierfür bieten sich die Darstellung im Punkthistogramm (dot plot) sowie Konturlinien- und dreidimensionale Darstellungen an. In den so genannten Dotplots, die xy-Diagramme darstellen, in denen jede gemessene Zelle durch einen Punkt markiert wird, entstehen im zwei- oder mehrdimensionalem Raum Punktwolken, die Zellen oder Partikel mit gleichen oder ähnlichen Eigenschaften repräsentieren.

Während der Messung besteht weiterhin die Möglichkeit, durch Vorgabe einer Begrenzung (gate) nur solche Zellen zuzulassen, die aufgrund ihrer Parameter einer bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden können (Eckhardt 1994). Durch dieses Festlegen elektronischer Regionen, d.h. Markierung der Punktwolken, können in einem heterogenen Gemisch wie Blut einzelne Zellpopulationen z.B. Monozyten unterschieden werden.

3.4.2 Die verwendeten Antikörper und ihre Funktion

IgG1 PE Isotypkontrolle

Der monoklonale Antikörper Klon 679.1Mc7 bindet unspezifisch an hämatopoetische Zellen und Zellbruchstücken. Da nur wenige Antikörper gebunden werden, ist die Fluoreszenzemission gering. Das Signal wird als Hintergrundrauschen verstanden, und im Sinne einer Negativkontrolle gewertet.

Werden Antikörper spezifisch an Zelloberflächen gebunden, ergibt sich aufgrund ihrer Anzahl und Dichte ein intensives Fluoreszenzsignal, das deutlich über dem der Negativkontrolle liegt. Anhand der Negativkontrolle wird also der Grenzwert für ein positives Signal festgelegt.

CD14 FITC

Der Klon M ϕ P 9 des monoklonalen Anti-Leu-M3 Antikörpers wurde aus der Immunisierung hybridisierter Mäusezellen mit peripheren Blutmonozyten eines an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten gewonnen. Die antigene CD14 Struktur ist auf den meisten Monozyten exprimiert, aber auch auf einem geringen Teil der Granulozyten, und entspricht der Membranstruktur des Glykoproteins 55, das Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand gramnegativer Bakterien bindet.

Anti-HLA-DR PE

Anti-HLA-DR bindet spezifisch an das DR-Epitop des humanen MHC Klasse II Moleküls. Es weist keine Kreuzreaktivität mit HLA-DQ oder HLA-DP auf. HLA-DR wird auf antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen, aber auch auf aktivierten T- und B-Zellen sowie humanen Stammzellen exprimiert. Der monoklonale Anti-HLA-DR Antikörper, Klon L 243, wird aus hybridisierten Mäusezellen hergestellt, die mit humanen Lymphoblasten der B-Zelllinie immunisiert wurden.

QuantiBRITE™ Anti-HLA-DR PE/ Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5

Dieser Antikörper setzt sich aus der spezifischen Anti-HLA-DR PE Sequenz, wie im oberen Abschnitt beschrieben, und einer Anti-Monozyten PerCP-Cy 5.5 Komponente zusammen. Anti-Monozyten PerCP-Cy 5.5 erkennt Monozyten durch zwei diskrete Spezifitäten. Dies ist zum einen CD14, ein humanes Monozyten/Makrophagen Antigen, welches auf der Mehrheit der Monozyten zu finden ist, zum anderen CD64, welches ein Fc Rezeptor auf Monozyten/Makrophagen darstellt. Durch die Kombination dieser Spezifitäten ist es möglich die gesamte Monozytenpopulation, insbesondere jedoch eine Monozytenpopulation mit verminderter CD14 Expression in einem Testansatz zu erfassen.

3.4.3 Methode nach Nebe (modifiziert)

3.4.3.1 Färbungen

- Ansätze:
1. Anti-IgG1 PE / Anti-CD14 FITC
 2. Anti-HLA-DR PE / Anti-CD14 FITC

100 µl eines zuvor auf eine Leukozytenzahl von 10.000 Zellen pro Mikroliter eingestellten EDTA Blutes werden mit je 5 µl Anti-HLA-DR PE Antikörper und Anti-CD14 FITC Antikörper versetzt und nach gründlichem Mischen für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Daraufhin werden dem Reaktionsansatz 2 ml einfach konzentrierte FACS™ Lysing Solution zugefügt, gemischt und nach erneuter Inkubation für 5 Minuten bei 1800 RPM zentrifugiert. Anschließend wird die Probe nach dem Absaugen des Überstandes mit einer Wasserstrahlpumpe mit 2 ml PBS gewaschen und wiederum 5 Minuten bei 1800 RPM zentrifugiert.

Nach Entfernung des Überstandes wird die Probe in 1 ml PBS durch gründliches Mischen resuspendiert und der durchflußzytometrischen Messung zugeführt.

Analog zum Reaktionsansatz erfolgt zeitgleich die Herstellung einer Negativkontrolle.

Dazu werden wiederum 100 µl desselben Patientenmaterials (einschließlich der entsprechenden Vorverdünnung) mit je 5 µl Anti-IgG1 PE Antikörper sowie Anti-CD14 FITC Antikörper angesetzt.

Im Weiteren verfährt man mit dem Kontrollansatz wie oben beschrieben.

3.4.3.2 Geräte Setup

Die Geräteeinstellung des Durchflußzytometers wird mittels FACSComp™-Software und CaliBRITE™-Beads in einer Lyse/wash Option ohne Optimierung durchgeführt.

Das Durchflußzytometer erfasst Lichtsignale über verschiedene Detektoren oder Photomultiplier (PMT) sowohl als Fluoreszenz- als auch als Streulichtsignale.

Die CaliBRITE™-Beads sind Suspensionen aus kleinen Partikeln, die mit jeweils einem Fluorochrom beladen sind (FITC, PE, PerCP sowie unmarkierte Beads). Da sich diese Mikropartikel wie ungefärbte Zellen und mit fluorochromkonjugierten Antikörpern markierte Zellen verhalten, dienen sie der Justierung der Instrumenteneinstellung sowie der Überprüfung der Instrumentenempfindlichkeit. Die folgende Tabelle (Tab. 3) stellt die Photomultiplier-Lichtsignalerfassung dar.

Photomultiplier	primäre Signalerfassung
Fluoreszenz-1 (FL 1)	FITC (gelbgrün)
Fluoreszenz-2 (FL 2)	PE (rotorange)
Fluoreszenz-3 (FL 3)	PerCP / PerCP-Cy5.5 (rot)

Tab. 3: Zuordnung der primären Signalerfassung durch die verschiedenen Photomultiplier.

Werden die Fluorochrome durch das Laserlicht angeregt, emittieren sie Licht über einen Wellenlängenbereich, der über das Emissionsmaximum hinausgeht. Daher wird ein Teil des FITC-Signals durch den FL2-Photomultiplier und ein Teil des PE-Signals durch den FL1- und den FL3-Photomultiplier detektiert. Lediglich das PerCP- oder PerCP-Cy5.5-Signal wird nicht vom FL2-Photomultiplier erkannt. Dieses so genannte Phänomen der Spektralüberlappung (Abb. 7) muss durch elektronische Kompensation korrigiert werden.

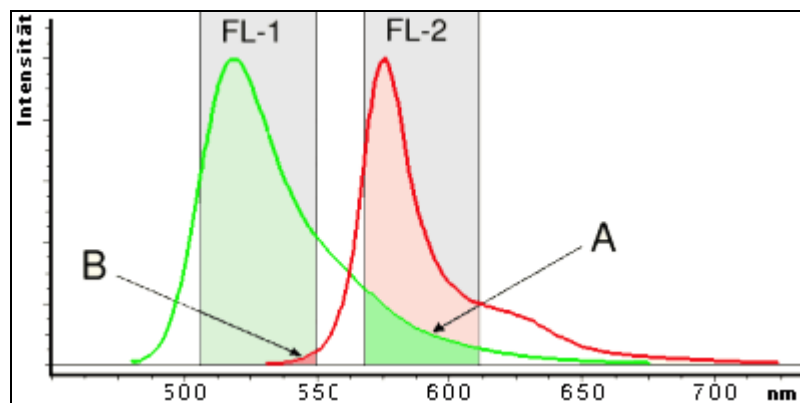


Abb. 7: Darstellung der Spektralüberlappung der einzelnen Fluorochrome. Region A wird fälschlich vom FL 2 Detektor und Region B vom FL 1 Detektor erfasst. FL – Fluoreszenz, nm - Nanometer

Zur Ermittlung der geeigneten Kompensationseinstellung nutzt man die CaliBRITE™-Beads.

3.4.3.3 Messung und Auswertung der Oberflächenmarkierungen

Zur durchflußzytometrischen Analyse wird zunächst der Kontrollansatz (1. Ansatz) in einem Dotplot mit den Achsen SSC/CD14 FITC zur Darstellung gebracht. In dieser Ansicht wird die Population der Monozyten, die sich durch ein starkes Fluoreszenzsignal für CD14 FITC deutlich von den anderen Populationen der weißen Blutzellreihe abhebt, durch das Setzen einer elektronischen Begrenzung (Gating) eingefasst (Abb. 8). Die weitere Analyse bezieht sich ausschließlich auf diese Zellpopulation.

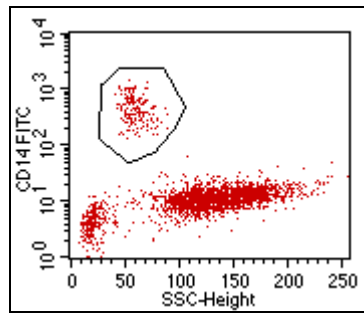


Abb. 8: Gating der Monozytenpopulation in einem Dotplot mit der Achsendarstellung SSC/CD14 FITC. CD – Cluster of differentiation, SSC – Sidescatter, FITC – Fluorescein-Isothiocyanat, HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR

In einem zweiten Dotplot mit den Achsendarstellungen CD14 FITC/IgG1 PE wird der Anteil der unspezifischen PE-Fluoreszenz detektiert (Negativkontrolle) und somit der Schwellenwert für ein positives Fluoreszenzsignal festgelegt, der auf das Dotplot für die Patientenmessung kopiert wird (Abb. 9 und Abb. 10).

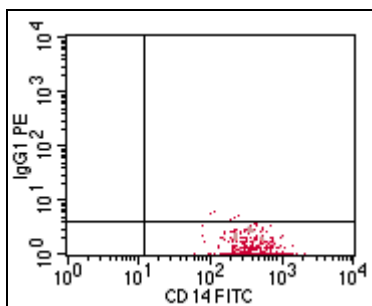


Abb. 9: Festlegen des Schwellenwertes für ein positives Fluoreszenzsignal. HLA-DR – DR Humanes Leukozytenantigen, CD – Cluster of differentiation, FITC – Fluorescein-Isothiocyanat, PE - Phycoerythrin

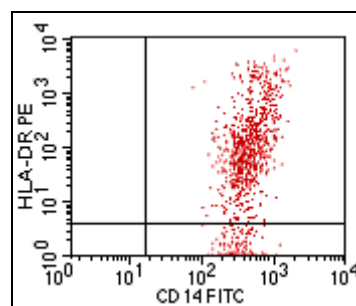


Abb. 10: Messung der Patientenprobe. HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, CD – Cluster of differentiation, FITC – Fluorescein-Isothiocyanat, PE - Phycoerythrin

Bei der Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) werden nun ausschließlich die Zellen ausgewertet, deren Fluoreszenzsignal oberhalb dieses Schwellenwertes liegt. Zur Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität werden die Zellen der Patientenprobe (2. Ansatz) als Histogramm gegen die Fluoreszenz von PE dargestellt (HLA-DR) und die MFI über die gesamten Zellen errechnet (Abb. 11).

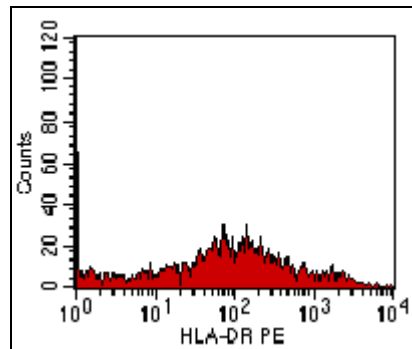


Abb. 11: Histogramm der gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Patientenprobe. HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, PE - Phycoerythrin

Zur zusätzlichen Auswertung des prozentualen Anteils der HLA-DR positiven Monozyten wird zunächst der erste Ansatz erneut in einem Dotplot dargestellt: Achsendarstellung CD14 FITC/IgG1 PE. Darin wird ein Kreuzgate oberhalb der unspezifischen PE-Fluoreszenz eingetragen und somit wiederum der Schwellenwert für ein positives Fluoreszenzsignal festgelegt. Dieses Kreuzgate wird dann in ein weiteres Dotplot zur Darstellung von CD14 FITC/HLA-DR PE kopiert und daraus per Quadrantenstatistik der Anteil HLA-DR positiver Monozyten bestimmt (Abb. 9 und Abb. 10). Der Anteil der Monozyten, deren Fluoreszenzsignal oberhalb des Schwellenwertes liegt, wird als Prozentsatz der insgesamt detektierten Monozyten angegeben.

3.4.4 Methode nach BD

3.4.4.1 Färbung nach Produktinformation BD

Es werden 50µl EDTA Blut mit 20 µl des Anti-HLA-DR PE / Anti-MonocytePerCP-Cy5.5 zum Ansatz gebracht und nach gründlichem Mischen für 25 bis 35 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Anschließend wird dem Reaktionsansatz 500 µl einfach konzentrierte FACS™ Lysing Solution zugesetzt und nach Mischen und Inkubation für weitere 15 bis 60 Minuten im Dunkeln, der Analyse mittels Durchflußzytometer zugeführt.

3.4.4.2 Geräte Setup

Analoges Verfahren wie unter Punkt 3.4.2.2, jedoch in einer automatischen Lyse no wash Option ohne Optimierung.

Anschließend erfolgt eine zusätzliche manuelle Optimierung der Kompensation FL3-FL2 anhand einer mit Anti-HLA-DR PE/Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5 markierten Kontroll Vollblutprobe im CellQUEST Programm.

3.4.4.3 Geräte Kalibration

Die Erstellung einer Eichkurve zur HLA-DR Quantifizierung auf Monozyten erfolgt durch die Messung der QuantiBRITE™PE-Beads in der Kalibrationsoption der CellQuest Software. Die Beads sind mit definierten Mengen an PE Molekülen markiert und werden in der gleichen Geräteeinstellung gemessen wie die Patientenproben (Abb.12). Die Fluoreszenzintensitäten der Beads werden gegen die definierte Menge an PE Molekülen/Bead aufgetragen, woraus über Softwareoptionen die lineare Regression berechnet wird und so die Übertragung der Fluoreszenzintensität der HLA-DR Messung in PE Moleküle/Monozyt (Antibodies bound per cell) erlaubt. Die Voraussetzung dafür ist die Verwendung eines Anti-HLA-DR Antikörpers, der in einem Verhältnis 1:1 mit PE Molekülen konjugiert ist.

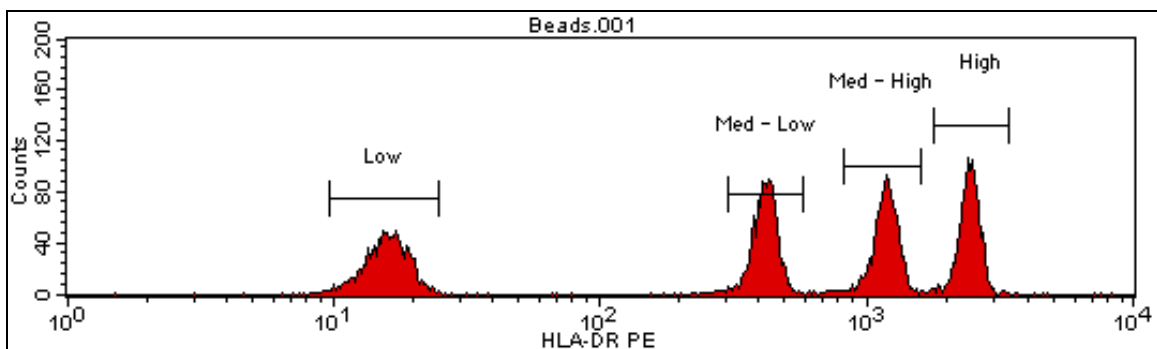


Abb. 12: Histogrammdarstellung der Messergebnisse der QuantiBRITE™ PE Beads. HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, PE – Phycoerythrin

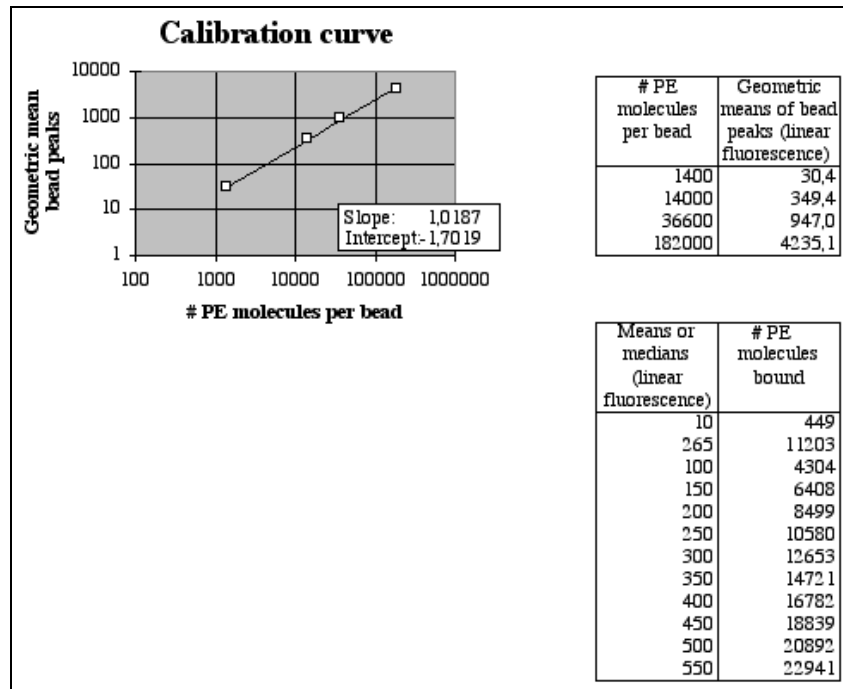


Abb. 13: Erstellung der Eichkurve mit linearer Regression. PE - Phycoerythrin

3.4.4.4 Messung und Auswertung der Oberflächenmarkierungen

Die durchflußzytometrische Messung der HLA-DR Oberflächenmoleküle erfolgt nach einer ersten Überprüfung der Kompensation im Dotplot mit der Achsendarstellung FSC/SSC. Dabei ist darauf zu achten, dass die einzelnen Zellpopulationen gut voneinander abgrenzbar sind.

Danach kann in einem zweiten Dotplot mit der Achsendarstellung CD14 PerCP-Cy5.5 die Monozytenpopulation eingegrenzt (Abb. 14) und anschließend gemessen werden. Die graphische Darstellung der Messergebnisse erfolgt in einem Histogramm, in welchem die PE Fluoreszenz gegen die Anzahl der Zellen gezeigt ist (Abb. 15). Die Software errechnet über die Abtragung der ermittelten Fluoreszenzintensitäten gegen die Anzahl der gebundenen PE Moleküle, die Menge der HLA-DR Moleküle auf der Zelloberfläche der Monozyten.

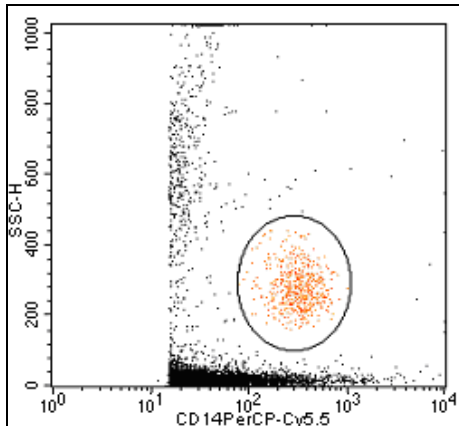


Abb. 14: Gating der Monozyten. SSC – Sidescatter, CD – Cluster of differentiation, PerCP-Cy – Peridinin-Chlorophyll Protein- Cyanin, HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR

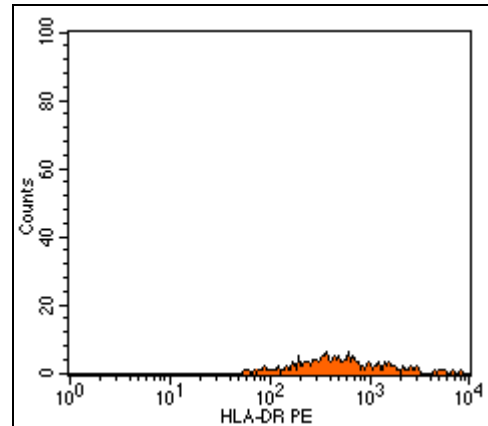


Abb. 15: Histogrammdarstellung der Patientenmessung. PE – Phycoerythrin

3.4.5 Erhebung der Scorewerte

Die Anwendung von Scoresystemen dient der objektiven Erfassung der Schwere oder Ausprägung von Erkrankungen sowie der Abschätzung der Mortalitätswahrscheinlichkeit von Patientengruppen im Rahmen von wissenschaftlichen Studien. Ihre Anwendung zur Beurteilung von individuellen Überlebensprognosen ist auf Grund der inhärenten statistischen Unschärfen jedoch nicht möglich.

Das Prinzip von Scores besteht darin, durch Addition einzelner Punktwerte den Ausprägungsgrad eines Zustands zu beschreiben. Punktwerte können durch anatomische, physiologische, biochemische oder therapeutische Parameter repräsentiert werden, wobei in den meisten Scores durch eine steigende Punktzahl die zunehmende Abweichung des Parameters von der Norm gewichtet wird. Aus der Summe der Punktwerte der Einzelpapameter ergibt sich in der Regel der Gesamtscore. Diesem Verfahren liegt die Annahme zugrunde, dass die Ausprägung bestimmter Parameter direkt oder indirekt mit der Schwere und Prognose einer Erkrankung korreliert.

Scoresysteme lassen sich in Aufnahmescores, die nur für den Zeitraum der ersten 24 Stunden repräsentativ sind, und Verlaufscores, die der Entwicklung von Krankheitsbildern Rechnung tragen, unterteilen.

Der Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (APACHE) und Simplified Acute Physiology Score (SAPS) sind Prototypen im Sinne von Aufnahmescores für die Erfassung und Gewichtung von Untersuchungsbefunden der Hämodynamik,

Lungenfunktion, Körpertemperatur, Bewusstseinslage sowie routinemäßig erhobener laborchemischer Parameter.

Der APACHE Score wurde 1981 von Knaus vorgestellt und stellt mit seiner 1985 veröffentlichten modifizierten Version (APACHE II) (Knaus, Draper et al. 1985) das gegenwärtig am weitesten verbreitete Scoresystem dar. Er setzt sich aus drei Komponenten zusammen, einem physiologischen Score, einem altersbezogenen Score sowie einem Score zur Beurteilung chronischer Vorerkrankungen. Seine prognostische Aussagekraft bezüglich der Mortalität wurde an ca. 6000 Intensivpatienten validiert, wobei sich die Validierung lediglich auf die Datenerhebung über die ersten 24 Stunden des Intensivaufenthaltes bezieht. In Abbildung 16 ist die Mortalitätswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von den ermittelten Punktwerten dargestellt.

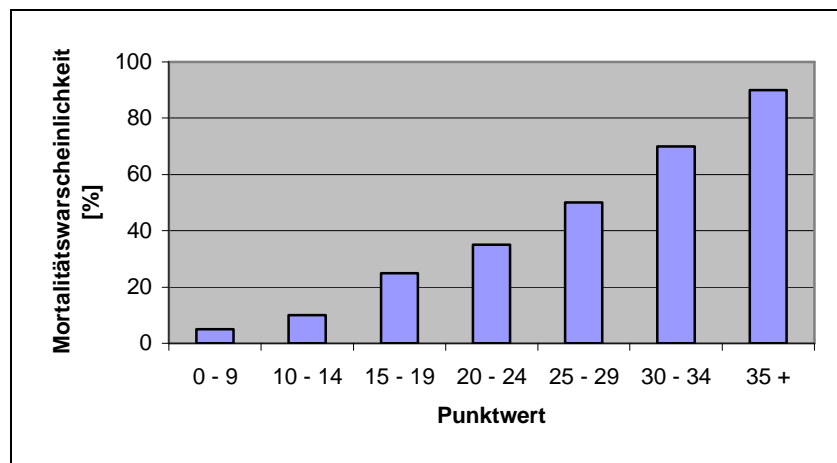


Abb. 16: Darstellung der Intensivmortalitätswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom ermittelten APACHE II Punktwert (Knaus, Draper et al. 1985).

Als Le Gall im Jahre 1984 den Simplified Acute Physiology Score (SAPS) einführte (Le Gall, Loirat et al. 1984), war das hauptsächliche Ziel die Vereinfachung der ersten APACHE Version. Im SAPS wurden die ursprünglich 34 Variablen des APACHE auf 13 reduziert. Darüber hinaus unterscheidet er sich durch eine modifizierte Bewertung des Alters und des neurologischen Status des Patienten. Chronische Vorerkrankungen hingegen finden keine Berücksichtigung mehr (Bein und Unertl 1993).

Auch der SAPS wurde in einer zweiten Version verbessert und findet als SAPS II (Le Gall, Lemeshow et al. 1993) inzwischen ebenfalls weit verbreitete Anwendung. Die prognostische Qualität dieses Scores wurde in prospektiven Studien an sehr großen Patientenkohorten mit ca. 13000 Fällen unter Beweis gestellt. Ein weiterer Vorteil

dieses Scores ist, dass neben nordamerikanischen auch europäische Intensivstationen in die Validierung einbezogen wurden.

Wie beim APACHE werden die Daten zur Ermittlung des SAPS und dem daraus resultierenden statistischen Mortalitätsrisiko (Abb. 17) über die ersten 24 Stunden des Intensivaufenthaltes erhoben.

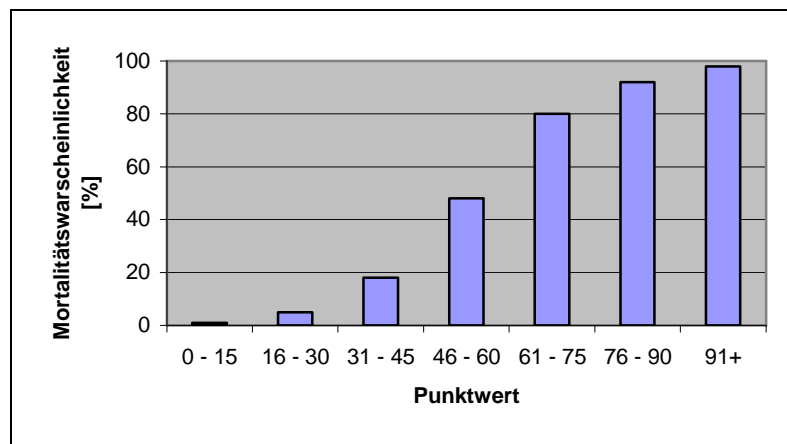


Abb. 17: Darstellung der Intensivmortalitätswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom ermittelten SAPS II Punktwert (Le Gall, Lemeshow et al. 1993).

Im Unterschied zu den beiden bisher vorgestellten prädiktiven, krankheitsübergreifenden Scores gehören der Multiple Organ Dysfunction Score (MODS), der Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) sowie der ELEBUTE Score zu den krankheitsassoziierten Verlaufscores. Als solche erfassen sie die pathophysiologischen Besonderheiten spezifischer Krankheitsbilder, zum Beispiel einer Sepsis, und sind daher gut geeignet, die Ausprägung der Erkrankung zu charakterisieren. Sie dienen nicht nur der Vergleichbarkeit des Schweregrades eines Krankheitsbildes und des damit verbundenen Mortalitätsrisikos, sondern liefern auch objektivierbare Werte zur Beschreibung der Erkrankungsschwere im Verlauf.

Der Multiple Organ Dysfunction Score wurde 1995 von Marshall veröffentlicht.

Die optimalen Variablen, deren Grenzen und Bewertungen wurden zunächst aufgrund eines systematischen Literaturreviews anhand publizierter klinischer Studien über Multiorganversagen der Jahre 1969 bis 1993 identifiziert und nachfolgend bezüglich ihrer Aussagekraft zur Mortalität an einem Patientenkollektiv (n=336) überprüft (Abb.18).

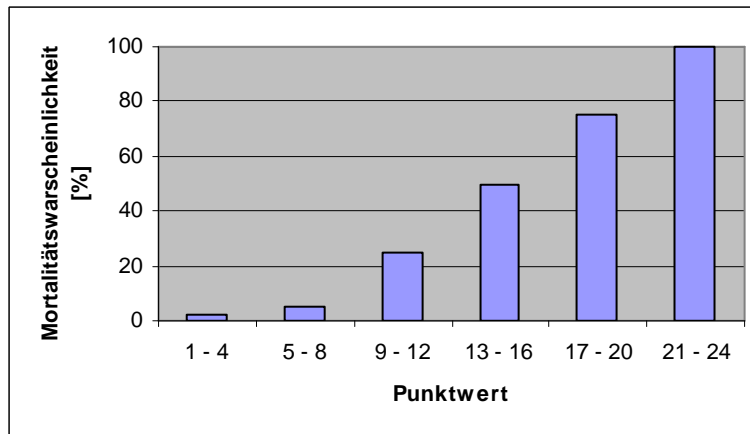


Abb. 18: Darstellung der Intensivmortalitätswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom ermittelten MODS Punktwert.

Es werden sechs Organsysteme (respiratorisches System, hämatologisches System, Herz Kreislauf System, zentrales Nervensystem, Leber- und Nierenfunktion) mit Punktwerten von null bis vier bewertet, wobei null eine physiologische Funktion widerspiegelt und steigende Punktwerte mit zunehmenden Dysfunktionen einhergehen. Im Unterschied zu anderen Scoresystemen werden die Parameter für den MODS zu einer bestimmten Tageszeit erhoben und nicht als schlechteste Ausprägung eines 24 Stundenintervalls. Ein im Verlauf steigender MODS korreliert in dem untersuchten Patientenkollektiv dieser Studie (n=692) sowohl mit der Intensiv- und Krankenhausmortalität als auch mit der Dauer des Intensivaufenthaltes (Marshall, Cook et al. 1995).

Von einer Arbeitsgruppe der European Society of Intensive Care Medicine wurde 1996 ein weiteres Scoresystem, der Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) entwickelt und eingeführt (Vincent, Moreno et al. 1996). Die Rationale dieser Bemühungen war die Notwendigkeit ein einfaches und objektives Instrument zu finden, das die Definition des Schweregrades einer Organdysfunktion oder eines Organversagens ermöglicht und deren Entstehung und Entwicklung im zeitlichen Verlauf darzustellen vermag (Moreno, Vincent et al. 1999).

Dem SOFA Score liegt die Bewertung derselben sechs Organsysteme mit Punktwerten von null (physiologisch) bis vier (Organversagen) wie beim MOD Score zugrunde, aus deren Summe sich der Gesamtwert ergibt.

Seine prädiktive Aussagekraft bezüglich der Mortalität erklärt sich aus der erhöhten Mortalitätswahrscheinlichkeit von Patientengruppen mit Organversagen. Allerdings konnte der SOFA in einer retrospektiven Studie an 1600 septischen Patienten lediglich

am Aufnahmetag signifikant zwischen verstorbenen und überlebenden Patienten trennen.

Elebute und Stoner veröffentlichten 1983 einen Sepsis Score, der auf möglichst einfache Weise den Schweregrad einer Sepsis möglichst genau klassifizieren sollte. Besonderes Augenmerk wurde dabei darauf gelegt Variablen auszuwählen, die auch in kleineren Krankenhäusern problemlos erhoben werden könnten (Elebute und Stoner 1983).

Es wurden vier Klassen selektiert, die mehrere Kriterien beinhalten: lokale Effekte einer Gewebeeinfektion, Körpertemperatur, Sekundäreffekte einer Sepsis und Laborparameter. Jedem einzelnen Kriterium innerhalb dieser vier Klassen wurden, entsprechend seiner Ausprägung null bis sechs Punkte zugeordnet.

4 Ergebnisse

4.1 Demographie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von April 2002 bis März 2003 konsekutiv 60 Patienten zweier operativer sowie einer internistischen Intensivstation in die Studie eingeschlossen und untersucht. Der Altersdurchschnitt lag im Median bei 60 Jahren, wobei die Gruppe der verstorbenen Patienten signifikant älter war als die der Überlebenden. Der Anteil der männlichen Patienten lag mit 37 von 60 (61,7%) höher als der der weiblichen, es konnte aber kein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und dem Überleben gefunden werden. Die mediane Liegezeit betrug 15 Tage. Zwischen der Gruppe der überlebenden und der der verstorbenen Patienten konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Die Einschätzung der Erkrankungsschwere des untersuchten Patientenkollektives erfolgte an Tag 1 mit Hilfe des APACHE II Scores, der im Median 18 (7-35) betrug und eine Mortalität zwischen 25% und 30% erwarten ließ.

Die Gruppe der verstorbenen Patienten wies mit 19 (17-35) einen signifikant höheren APACHE II Punktwert auf als die Gruppe der Überlebenden mit 16 (7-34). Während des Intensivaufenthaltes verstarben insgesamt 17 Patienten (28%), die Mortalitätsrate nach 28 Tagen sowie die Krankenhausmortalität betrug jeweils 32% (19 von 60).

Tabelle 3 zeigt die demographischen Daten und deren Verteilung zwischen überlebenden und verstorbenen Patienten.

	Gesamt	Überlebende	Verstorbene	p- Wert
Patientenanzahl	60	43 (72%)	17 (28%)	-
Alter in Jahren	60	57	65	<0,05
Median (Spanne)	(21-79)	(21-79)	(33-74)	
Geschlecht (m/w)	37 / 23	27 / 16	10 / 7	n. s.
LOS in Tagen	15	15	22	n. s.
Median (Spanne)	(3-135)	(3-135)	(3-104)	
APACHE II	18	16	19	<0,05
Median (Spanne)	(7-35)	(7-34)	(17-35)	

Tab. 4: Demographische Daten der eingeschlossenen Patienten. Die Anzahl der Verstorbenen bezieht sich auf die Mortalität während des Intensivaufenthaltes. m/w – männlich/weiblich, LOS – Length of stay, n.s. – nicht signifikant, APACHE – Acute Physiology And Chronic Health Evaluation

Die Heterogenität des Patientenkollektives findet Ausdruck in dem Spektrum der Hauptdiagnosen, die in Tabelle 4 zusammengestellt sind.

Peritonitis	23 von 60	39%
Polytrauma	11 von 60	18%
Pneumonie	11 von 60	18%
Verschiedene Infektionen	10 von 60	17%
Z.n. Ösophagektomie	5 von 60	8%

Tab. 5: Verteilung der Hauptdiagnosen der Studienpatienten.

Die Verteilung der Infektionsdiagnosen, die zum Einschluss in die Studie beitrugen, ist in Tabelle 5 dargestellt.

Sepsis / sept. Schock	6 von 60	10%
Pneumonie	16 von 60	27%
Harnwegsinfektionen	3 von 60	5%
Peritonitis	24 von 60	40%
Sonstige Infektionen	11 von 60	18%

Tab. 6: Die Verteilung der Infektionsdiagnosen der Studienpatienten.

4.2 Ergebnisse der monozytären HLA-DR Expression

4.2.1 Ergebnisse der Kontrollgruppe

Vor dem Beginn der Studie wurde zunächst Blut einer Kontrollgruppe von 25 gesunden Probanden mittels der alternativen Methoden auf die monozytäre HLA-DR Expression untersucht. Die Mittelwerte, Standardabweichungen und Spannen dieser Kontrolluntersuchungen sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

	HLA-DR [MFI]	HLA-DR [%]	HLA-DR [AB/C]
Mittelwert	1155	99,3	29319
Standardabweichung	403	0,73	8422
Spanne	483 - 1962	97 - 100	17134 - 50507

Tab.7: Mittelwerte, Standardabweichungen und Spannen der Kontrollgruppe (n=25). HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, MFI – Mean fluorescence intensity, AB/C – Antibodybounds per cell

4.2.2 Ergebnisse der Kontrollgruppe im Vergleich zur Studiengruppe

Die Tabelle 7 zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen und Spannen der drei Untersuchungsmethoden der monozytären HLA-DR Expression für die Studiengruppe (n=60) am ersten Tag des Intensivaufenthaltes.

	HLA-DR [MFI]	HLA-DR [%]	HLA-DR [AB/C]
Mittelwert	280	77	10186
Standardabweichung	166	17,3	3944
Spanne	34 - 734	23 - 100	5659 - 23012

Tab. 8: Mittelwerte, Standardabweichungen und Spannen der Studiengruppe an Tag 1. HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, MFI – Mean fluorescence intensity, AB/C –Antibodybounds per cell

Die Ergebnisse der HLA-DR Expression in der Studiengruppe liegen in allen drei Meßmethoden an Tag 1 signifikant unterhalb der der Kontrollgruppe. Eine graphische Gegenüberstellung der Kontroll- und Studiengruppe zeigen die Abbildungen 19, 20 und 21. Das Signifikanzniveau liegt im t-Test für alle drei Methoden bei $p < 0,001$.

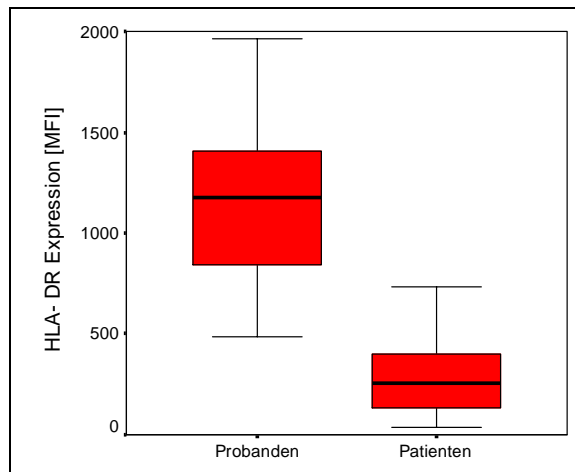


Abb. 19: Box- and Whisker-Plots der HLA-DR [MFI] Werte für die Kontrollgruppe (Probanden) n=25 und die Studiengruppe (Patienten) n=60. Dargestellt sind die Mediane, Quartile und Extremwertgrenzen für Tag 1. $p < 0,001$. HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, MFI – Mean fluorescence intensity

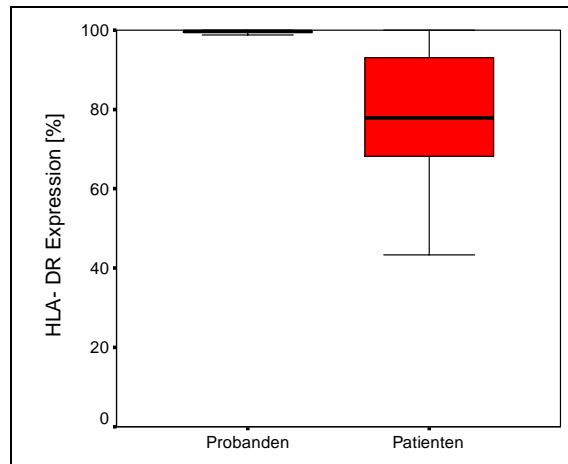


Abb. 20: Box- and Whisker- Plots der HLA-DR [%] Werte für die Kontrollgruppe (Probanden) n=25 und die Studiengruppe (Patienten) n=60. Dargestellt sind die Mediane, Quartile und Extremwertgrenzen für Tag 1. $p < 0,001$. HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR

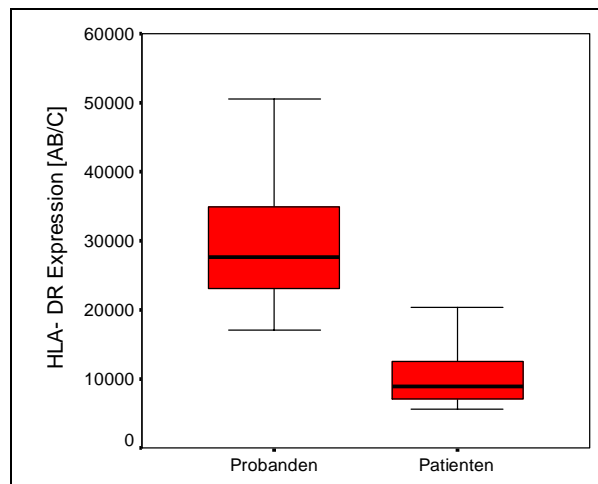


Abb. 21: Box- and Whisker- Plots der HLA-DR [AB/C] Werte für die Kontrollgruppe (Probanden) n=25 und die Studiengruppe (Patienten) n=60. Dargestellt sind die Mediane, Quartile und Extremwertgrenzen für Tag 1. $p < 0,001$. HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, AB/C –Antibodybounds per cell

4.2.3 Ergebnisse der Methode nach Nebe

Für die Gruppe der Studienpatienten zeigt sich am ersten Tag in der Methode nach Nebe ein signifikanter Unterschied der monozytären HLA-DR Expression [MFI] zwischen überlebenden und verstorbenen Patienten. Das Signifikanzniveau im χ^2 -Test nach Pearson liegt bei $p < 0,005$.

Die Lagemaßdaten sind mit Bezug zur Kontrollgruppe in Abb. 22 graphisch dargestellt. Für die Gruppe der überlebenden Patienten betrug der Mittelwert an Tag 1 310 MFI (Standardabweichung 26,9 MFI), für die Verstorbenen 192 MFI (Standardabweichung 23,1 MFI).

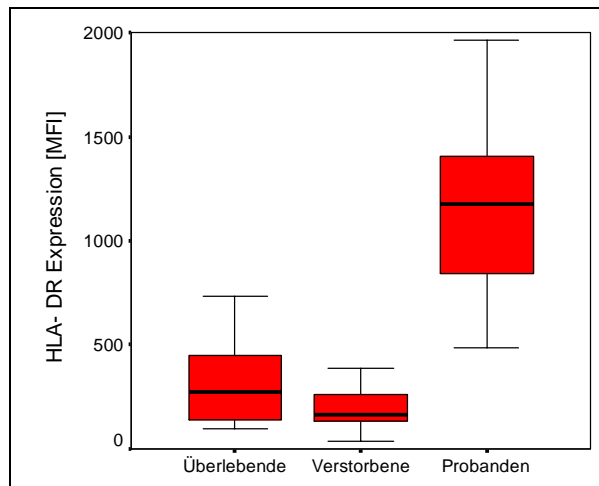


Abb. 22: Box- and Whisker- Plots der HLA-DR [MFI] Werte für Überlebende n=43, Verstorbene n=17 und Probanden n=25. Dargestellt sind die Mediane, Quartile und Extremwertgrenzen für Tag 1. HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, MFI – Mean fluorescence intensity

Weitere signifikant zwischen überlebende und verstorbenen Patienten trennende Ergebnisse der HLA-DR Expression wurden an den Tagen 4, 5, 7 - 12 und 14 des Intensiv Aufenthaltes beobachtet. Diese sind in Abbildung 23 jeweils mit * gekennzeichnet. Das Signifikanzniveau errechnet sich nach Pearson im χ^2 -Test mit $p < 0,005$.

In der Abbildung 23 sind die Ergebnisse der monozytären HLA-DR Expression [MFI] über den Verlauf des gesamten Beobachtungszeitraumes dargestellt. Daraus lässt sich ablesen, dass die Mittelwerte der verstorbenen Patienten (-□-) über die gesamte Beobachtungsdauer unter denen der Überlebenden (-◇-) liegen und sich die beiden Graphen zu keinem Zeitpunkt schneiden. Bis auf die Ergebnisse an den Tagen 13 und 14, liegen die Mittelwerte zudem stets unterhalb von 200 MFI. Daraus kann ein hypothetischer Schwellenwert von 200 MFI angenommen werden, unterhalb dessen das Mortalitätsrisiko stark ansteigt.

So zeigte sich für Patienten, die diesen Grenzwert am ersten Tag ihres Intensiv Aufenthaltes bereits unterschritten, eine Sterbewahrscheinlichkeit von 39% (10/26) und damit ein mehr als doppelt so hohes Mortalitätsrisiko im Vergleich zur Alternativgruppe (16%, 5/32). Für das Unterschreiten dieses hypothetischen Grenzwertes von 200 MFI an Tag 1 berechnet sich eine Sensitivität von 0,7 und Spezifität von 0,6 bezüglich der Mortalität.

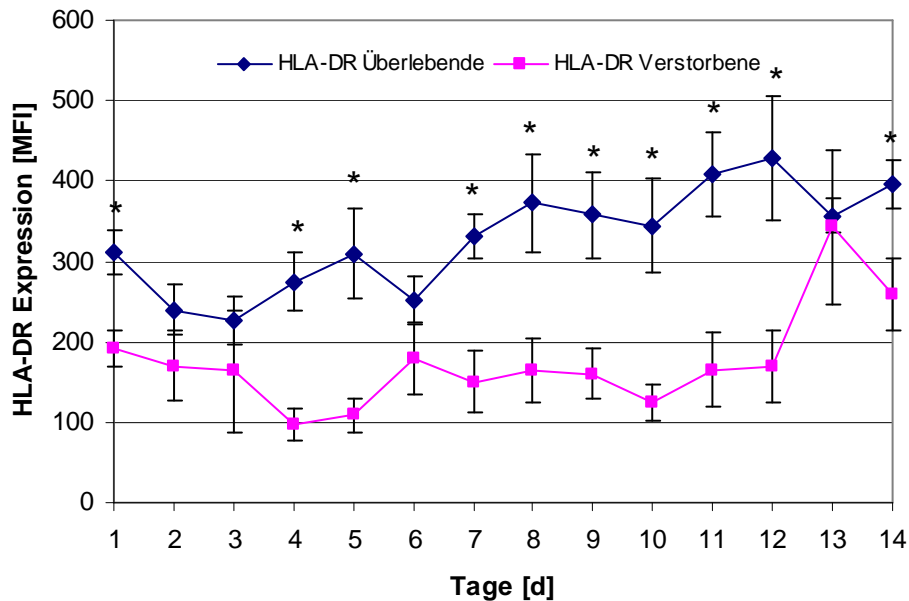


Abb. 23: Mittelwerte und SEM der HLA-DR Expression [MFI] im Verlauf für Überlebende (n=43) und Verstorbene (n=17). HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, MFI – Mean fluorescence intensity

Auch bei den Patienten, die im Verlauf ihres Intensivaufenthaltes für mehr als 48 Stunden eine geringere HLA-DR Expression als 200 MFI aufwiesen, zeigte sich eine erhöhte Mortalität. Die Wahrscheinlichkeit bei Ausprägung dieses Merkmals zu versterben lag in der Studiengruppe bei 42% (15/36) mit einer Sensitivität von 0,9 und eine Spezifität von 0,5. Für die übrigen Patienten lag das Mortalitätsrisiko bei 8% (2/24).

Sowohl für das Merkmal einer HLA-DR Expression < 200 MFI an Tag 1 des Beobachtungszeitraumes, als auch für das Merkmal einer HLA-DR Expression < 200 MFI über mehr als 48h im Verlauf der Beobachtungszeit war das relative Risiko zu versterben gegenüber der jeweiligen Alternativgruppe deutlich erhöht. Für eine HLA-DR Expression < 200 MFI an Tag 1 betrug es 2,5 mit einem 95% Konfidenzintervall (CI) 0,96-6,31, für eine prolongierte HLA-DR Expression < 200 MFI über mehr als 48h sogar 5,0 (95% (CI) 1,25-19,92).

Die zusätzliche Auswertung des prozentualen Anteils der HLA-DR positiver Monozyten liefert für Tag 1 in der Gruppe der Überlebenden einen Mittelwert von 79%, für die Verstorbenen 70%, ohne Signifikanzniveau. In Abbildung 24 sind die Lagemaßdaten für Tag 1 graphisch gezeigt.

Ergebnisse

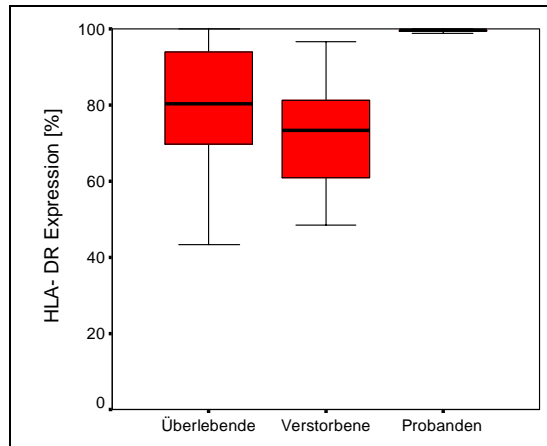


Abb. 24: Box- and- Whisker- Plots der HLA-DR [%] Werte für Überlebende n=43, Verstorbene n=17 und Probanden n=25. Dargestellt sind die Mediane, Quartile und Extremwertgrenzen für Tag 1. HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR

Der Verlauf der Mittelwerte, dargestellt in Abbildung 12, weist auch in dieser Methode für die Verstorbenen durchgängig niedrigere Mittelwerte auf, obwohl die Differenzen zwischen den beiden Gruppe geringer ausfallen und weniger statistisch signifikante Unterschiede nachweisbar sind. Signifikant zwischen den beiden Patientengruppen trennende Ergebnisse mit dem Signifikanzniveau $p < 0,005$ (χ^2 -Test nach Pearson), wurden an den Tagen 4, 5, 7, 8, 11 und 12 errechnet. Diese sind in der Abbildung 25 mit * markiert.

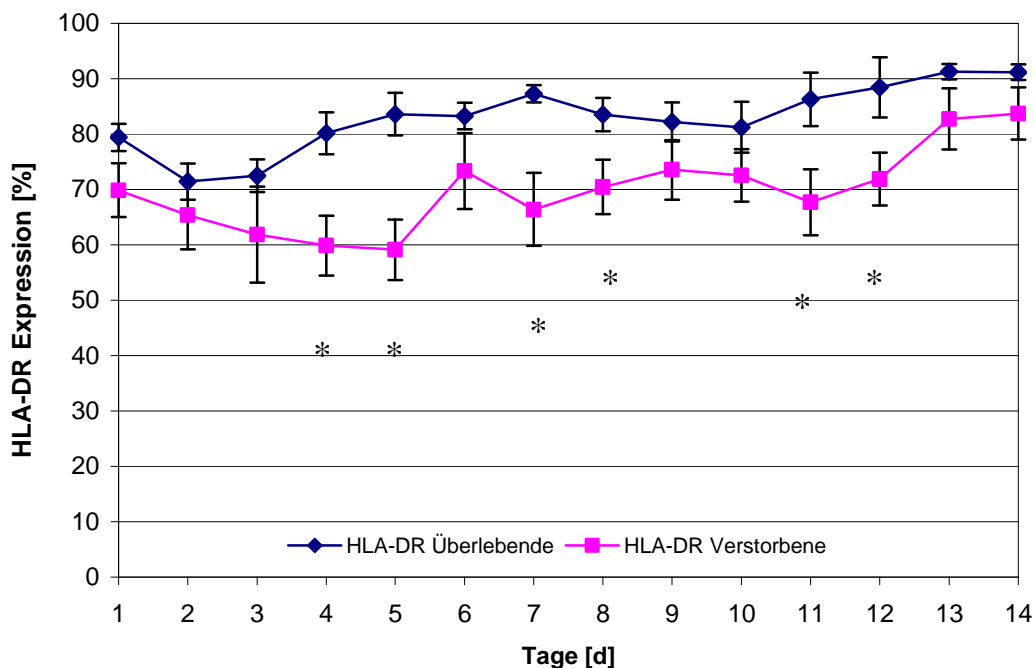


Abb. 25: Mittelwerte und SEM der HLA-DR Expression [%] im Verlauf für Überlebende (n=43) und Verstorbene (n=17). HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR

Auch in dieser Methode lässt sich aus der Beobachtung, dass die Gruppe der verstorbenen Patienten im Durchschnitt bis auf zwei Ausnahmen (Tag 13 und 14) stets unter 75% liegt, ein hypothetischer Schwellenwert ableiten.

Aufgrund dessen errechnet sich für Patienten, die diesen Wert im Verlauf ihres Intensivaufenthaltes für mehr als 48 Stunden unterschritten mit 46% (13 von 28) ein gegenüber der Gruppe ohne dieses Merkmal (5 von 32=16%) deutlich erhöhtes Mortalitätsrisiko. Die Sensitivität beträgt 0,8, die Spezifität 0,7. Das relative Risiko bei Merkmalsausprägung zu versterben beträgt gegenüber der Alternativgruppe 3,7 mit dem Konfidenzintervall (CI) 1,37-10,09.

4.2.4 Ergebnisse der QuantiBRITE™ Methode

In der Gruppe der Studienpatienten zeigte sich mit dieser Methode für Tag 1 kein signifikanter Unterschied in der monozytären HLA-DR Expression zwischen den überlebenden und verstorbenen Patienten. Die Abbildung 26 zeigt die Lagemaße der Messungen an Tag 1. Der Mittelwert für die Überlebenden betrug 10532 AB/C, für die Verstorbenen 9311 AB/C.

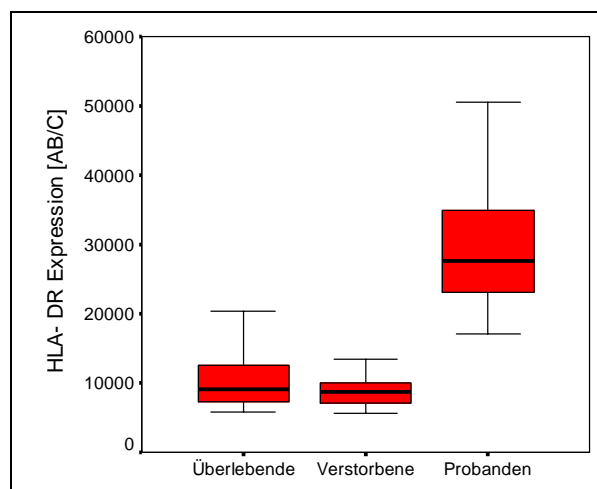


Abb. 26: Box- and Whisker- Plots der HLA-DR [AB/C] Werte für Überlebende n=43, Verstorbene n=17 und Probanden n=25. Dargestellt sind die Mediane, Quartile und Extremwertgrenzen für Tag 1. HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, AB/C – Antibodybounds per cell

Die Darstellung der Mittelwerte im Verlauf (Abb. 27) zeigt auch für diese Methode, bis auf Tag 2, für die verstorbenen Patienten durchgehend niedrigere Ergebnisse als für die Überlebenden. Legt man aufgrund dieser Beobachtung einen Cut-off von 10000 AB/C fest, so errechnet sich für Patienten, die im Verlauf eine länger als 48 Stunden anhaltende HLA-DR Expression von weniger als 10000 AB/C aufweisen, ein höheres

Sterblichkeitsrisiko. Die Wahrscheinlichkeit zu versterben betrug bei Merkmalsausprägung 39,5% (15 von 35). Im Vergleich ergab das Mortalitätsrisiko in der Alternativgruppe, die diese Bedingung nicht erfüllt nur 9% (2 von 22). Für das Merkmal HLA-DR Expression $< 10000 \text{ AB/C} > 48\text{h}$ errechnete sich eine Sensitivität von 0,9 und eine Spezifität von 0,5. Das relative Risiko bei Merkmalsausprägung zu versterben betrug gegenüber der Vergleichsgruppe in dieser Methode 4,3 mit einem Konfidenzintervall (CI) 1,09-17,24.

Mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,005$ konnten für diese Methode an den Tagen 5, 7 – 9 und 11 – 14 signifikant zwischen den alternativen Gruppen trennende Ergebnisse ermittelt werden. In der Abbildung 27 erfolgt diese Darstellung mit *.

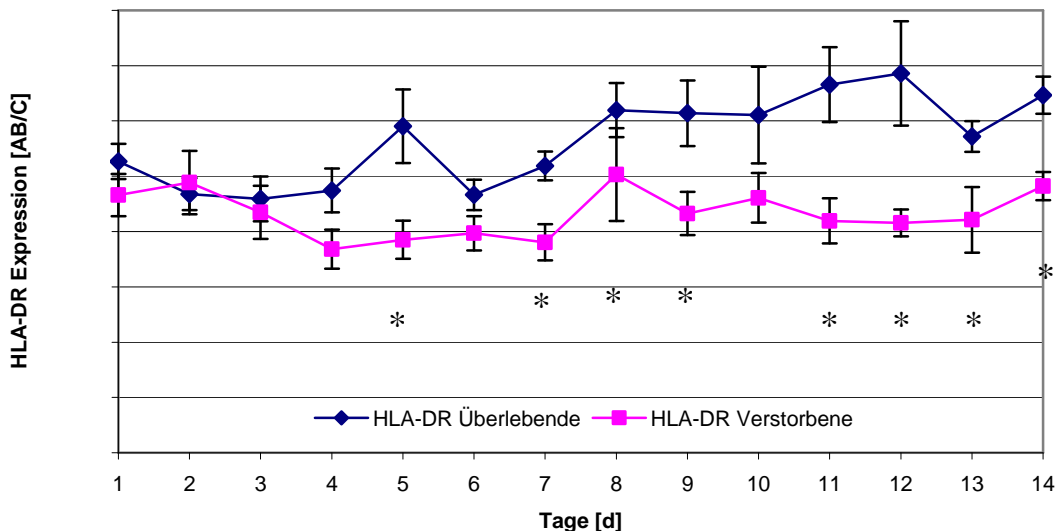


Abb. 27: Mittelwerte und SEM der HLA-DR Expression [AB/C] im Verlauf für Überlebende (n=43) und Verstorbene (n=17). HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, AB/C –Antibodybounds per cell

4.2.5 Vergleich der Methoden untereinander

Die Tabelle 9 zeigt, dass allein die Auswertung der Mittleren Fluoreszenzintensität in der Methode nach Nebe für Tag 1 ein statistisch signifikantes Ergebnis liefert. Somit ist die aktuell am häufigsten angewandte Methode auch diejenige, die durch die vorliegende Studie als guter Prognosemarker bestätigt werden konnte, und als einzige

am ersten Tag des Intensivaufenthaltes signifikant zwischen Überlebenden und Verstorbenen trennt.

	Gesamt	Überlebende	Verstorbene	p-Wert
HLA-DR [MFI]	279 (21,8)	310 (26,9)	192 (23,1)	<0,05
HLA-DR [%]	77 (2,3)	79 (2,5)	70 (4,9)	n.s.
HLA-DR [AB/C]	10136 (509)	10532 (641)	9311 (763)	n.s.

Tab. 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der monozytären HLA-DR Expression an Tag 1 des Intensivaufenthaltes. Mittelwert (SEM). HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, MFI – Mean fluorescence intensity, AB/C – Antibodybounds per cell, n.s. – nicht signifikant

Sowohl die Auswertung der monozytären HLA-DR Expression als prozentualer Anteil positiver Monozyten, als auch in Form der Antikörperbindungen pro Zelle in der QuantiBRITE™ Methode vermögen die Gruppe der Verstorbenen von den Überlebenden an Tag 1 nicht zu trennen.

Bei dem Vergleich der Effizienzmaße zur Beurteilung der allgemeinen Güte der untersuchten Testmethoden zeigt sich auch hier eine deutliche Überlegenheit der Methode nach Nebe [MFI] gegenüber den alternativen Methoden. Eine Übersicht der Gütemaße ist in Tabelle 10 dargestellt. Aufgrund der Trennungsunschärfe der prozentualen Auswertung in der Methode nach Nebe und der QuantiBRITE™ Methode am ersten Beobachtungstag wurde für diesen Vergleich das Merkmal der prolongierten HLA-DR Suppression gewählt.

Prolongierte (> 48h) HLA-DR Suppression in der Methode	Sensitivität	Spezifität	p-Wert
Nebe [MFI] < 200	0,9 (15/17)	0,5 (22/43)	<0,01
Nebe [%] <75	0,8 (13/17)	0,7 (28/43)	<0,05
QuantiBRITE™ [AB/C] < 10000	0,9 (15/17)	0,5 (20/43)	<0,05

Tab. 10: Sensitivität und Spezifität bezüglich der ICU-Mortalität für das Merkmal der prolongierten HLA-DR Suppression. HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, MFI – Mean fluorescence intensity, AB/C – Antibodybounds per cell

Bei der Korrelation der alternativen Methoden errechnet sich für alle Methoden eine mäßige bis gute Korrelation auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$. Dabei korrelieren die Methoden nach Nebe [MFI] und nach QuantiBRITE™ [AB/C] mit 0,62 am schlechtesten und die Methode nach Nebe [MFI] mit der prozentualen Auswertung mit 0,79 am besten (Tab. 11).

Ergebnisse

	Korrelationskoeffizient nach Spearman	p- Wert
MFI versus AB/C	0,62	<0,001
AB/C versus %	0,76	<0,001
MFI versus %	0,79	<0,001

Tab. 11: Korrelationsparameter der drei untersuchten Bestimmungsmethoden. MFI – Mean fluorescence intensity, AB/C –Antibody bounds per cell

In den Abbildungen 28, 29 und 30 sind jeweils die Regressionsgerade sowie das 95% Konfidenzintervall für die einzelnen Methoden gegeneinander abgebildet.

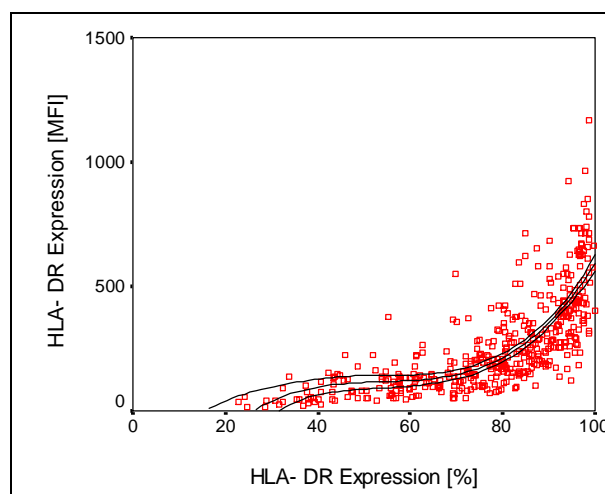


Abb. 28: Scattergramm der HLA-DR Expression [MFI] und HLA-DR Expression [%]. Die Kurven stellen die kubische Regressionsgerade sowie das 95% Konfidenzintervall dar. HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, MFI – Mean fluorescence intensity

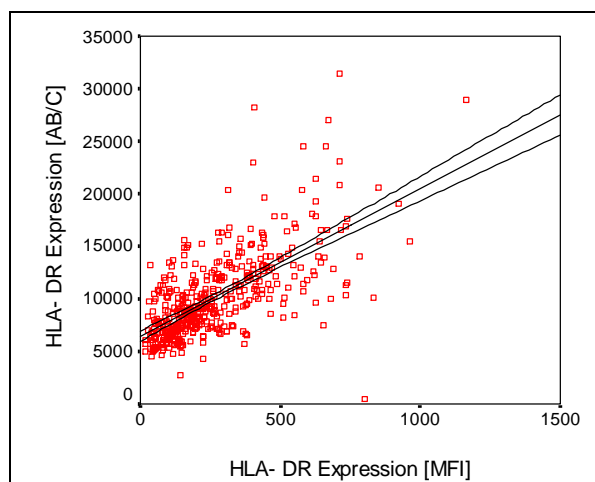


Abb. 29: Scattergramm der HLA-DR Expression [AB/C] und HLA-DR Expression [MFI]. Die Kurven stellen die lineare Regressionsgerade sowie das 95% Konfidenzintervall dar. HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, MFI – Mean fluorescence intensity, AB/C –Antibody bounds per cell

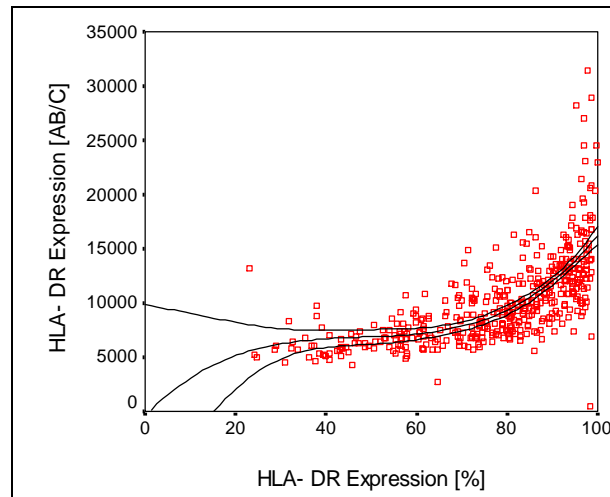


Abb. 30: Scattergramm der HLA-DR Expression [AB/C] und HLA-DR Expression [%]. Die Kurven stellen die kubische Regressionsgerade sowie das 95% Konfidenzintervall dar. HLA-DR – Humanes Leukozytenantigen DR, AB/C –Antibodybounds per cell

4.3 Ergebnisse der klinischen Scores

Der APACHE II und der SAPS II zeigen am Aufnahmetag einen signifikanten Unterschied zwischen Überlebenden und Verstorbenen (Tab. 12). Dabei lagen die Punktwerte der verstorbenen Patienten erwartungsgemäß über denen der Überlebenden. Das Signifikanzniveau beträgt $p=0,05$.

	Überlebende	Verstorbene	p-Wert
APACHE II	16 (7-34)	19 (17-35)	<0,05
SAPS II	32 (15-64)	43 (16-78)	<0,05

Tab. 12: APACHE II und SAPS II Score am Aufnahmetag (Mediane, Spannweiten) für verstorbene und überlebende Patienten. APACHE – Acute Physiology And Chronic Health Evaluation, SAPS – Simplified Acute Physiology Score

Die Verlaufsscores MODS, SOFA und ELEVATE zeigen im Verlauf durchgängig bis auf eine Ausnahme niedrigere Punktwerte für die Gruppe der überlebenden Patienten (Abb. 31, 32 und 33). Signifikant zwischen den alternativen Gruppen trennende Ergebnisse lassen sich aber nicht ermitteln.

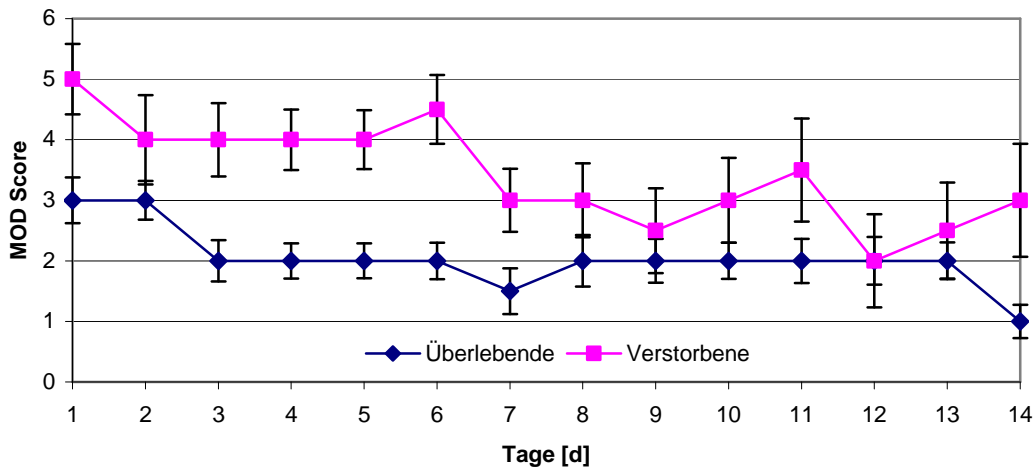


Abb. 31: Mediane und SEM der MODS Punktwerte im Verlauf für Überlebende (n=43) und Verstorbene (n=17).

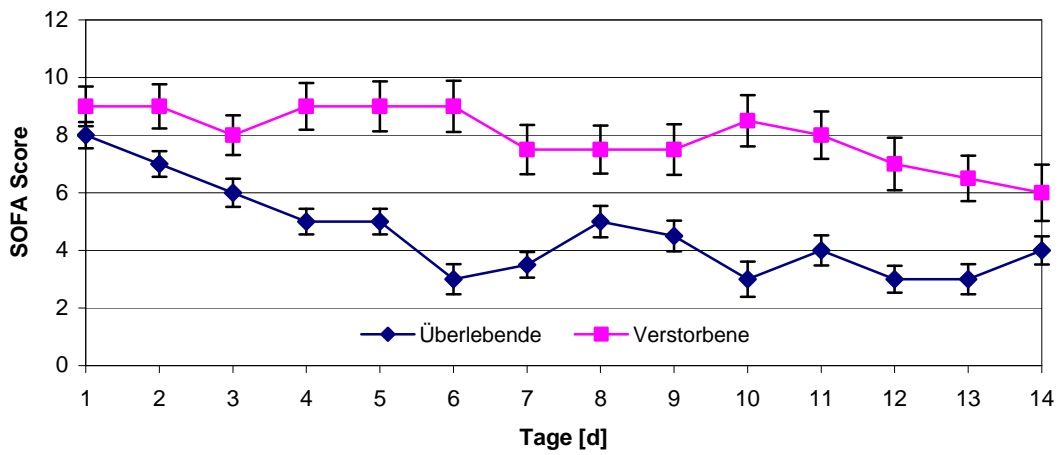


Abb. 32: Mediane und SEM der SOFA Punktwerte im Verlauf für Überlebende (n=43) und Verstorbene (n=17).

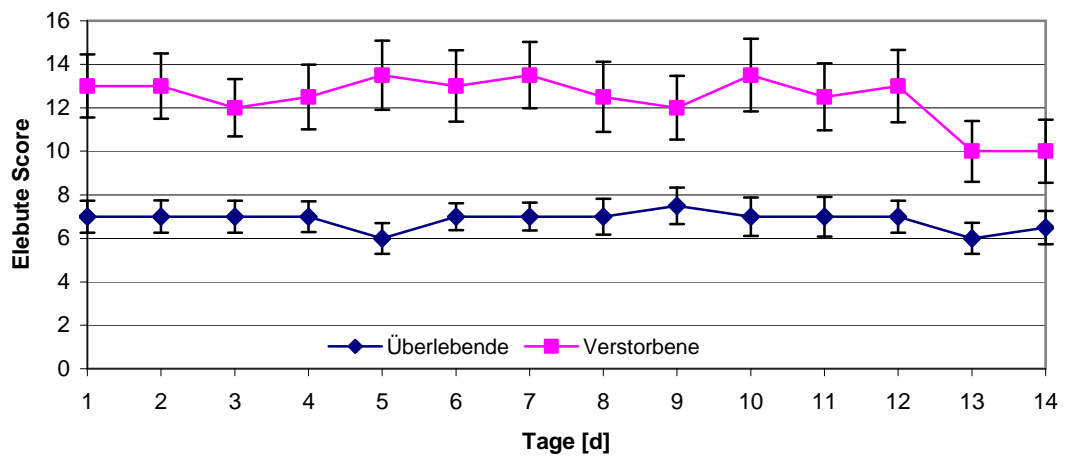


Abb. 33: Mediane und SEM der Elebute Punktwerte im Verlauf für Überlebende (n=43) und Verstorbene (n=17).

5 Diskussion

5.1 Kernaussagen

Der vorliegende Methodenvergleich zur durchflußzytometrischen Bestimmung von HLA-DR auf Monozyten ergibt an Tag 1 des Intensiv Aufenthaltes septisch erkrankter Patienten nur für die Methode nach Nebe (HLA-DR [MFI]) ein signifikant zwischen Überlebenden und Versterbenden trennendes Signal.

Mit Hilfe dieser Methode konnte sowohl die primäre Suppression der Oberflächenantigene, als auch eine länger als 48 Stunden anhaltende Suppression als Prognosemarker für das Outcome des Patienten identifiziert werden.

Sowohl die Auswertung des prozentualen Anteils der monozytären HLA-DR Expression als auch die Methode nach Becton Dickinson ergeben für das untersuchte Patientenkollektiv an Tag 1 keine signifikanten Unterschiede in der Merkmalsausprägung. Lediglich aus dem Verlauf über den Beobachtungszeitraum lassen sich bis auf eine Ausnahme rein deskriptiv stets niedrigere Werte für die Gruppe der Verstorbenen gegenüber den Überlebenden erkennen.

Des Weiteren liefern die beiden prädiktiven Scores APACHE II und SAPS II sowie das Alter der Patienten signifikant zwischen den Patientengruppen trennende Signale. Die Verlaufsscores MODS und SOFA lassen über den Beobachtungszeitraum betrachtet verschiedene Tendenzen erkennen. Zum einen liegen die Punktwerte der verstorbenen Patienten durchgängig über denen der überlebenden, zum anderen lässt sich für die Gruppe der Überlebenden ein deutlicher Punkteabfall innerhalb der ersten Tage des Beobachtungszeitraumes erkennen, wohingegen die Punktwerte der verstorbenen Patienten auf anhaltend hohem Niveau verbleiben.

Statistisch signifikante Unterschiede sind jedoch nicht zu erkennen.

5.2 Methodenkritik

Patientenkollektive klinischer Studien im Rahmen der Intensivmedizin zeichnen sich zum einen durch ihre Heterogenität zum anderen durch eine relativ kleine Fallzahl aus. Wollte man eine größere Patientengruppe untersuchen, würde die Untersuchungsdauer oft zu stark ansteigen (Dellinger 1997). Daher wird die Durchführung multizentrischer Studien angestrebt, bei denen in angemessenen Zeiträumen große Patientenkollektive untersucht werden können. Aufgrund unterschiedlicher Behandlungsstrategien,

diagnostischen Möglichkeiten sowie personellen Voraussetzungen der einzelnen Zentren, ist allerdings zu erwarten, dass die Ergebnisse für verschiedene Erkrankungsformen unterschiedlich ausfallen würden (Angus 2000).

Monozentrische Studien haben jedoch für eine sinnvolle Subgruppenanalyse des heterogenen Patientenkollektivs oft zu geringe Patientenzahlen. Die geringe Variabilität der diagnostischen und therapeutischen Konzepte hingegen ist dabei ein deutlicher Vorteil.

Als Einschlusskriterien für diese Studie wurden neben einem vorbestimmten Altersrahmen und dem Nachweis einer Infektion nach den Kriterien der CDC (Garner, Jarvis et al. 1988), die klinischen Zeichen eines SIRS gewählt. Das SIRS, als mögliches Frühzeichen einer Sepsis, erfasst einen hohen Anteil von Intensivpatienten. Dabei ist es jedoch wenig spezifisch, da ihm diverse Ursachen zu Grunde liegen können (Abb. 1).

Bereits 1997 kritisierte Vincent dieses Konzept aufgrund seiner Übersensitivität, der fehlenden pathophysiologischen Grundlagen sowie einer geringen Spezifität der Definitionen. Darüber hinaus blieben die Konsequenzen für die Behandlung der Patienten unklar und der Nutzen bezüglich der klinischen Forschung fragwürdig (Vincent 1997).

Da es auch Patienten gibt, die trotz einer gesicherten Infektion die SIRS Kriterien nicht erfüllen, wurde in Frage gestellt, ob dieses Konzept ad prioram eine hinreichend hohe Sensitivität für die Sepsis besitzt (Brun-Buisson 2000; Vincent 1997).

Zur Zeit der Studienplanung und –durchführung waren die Definitionen der ACCP/SCCM Konferenz von 1992 jedoch die einzigen zur Verfügung stehenden, allgemein anerkannten Definitionen für den Formenkreis dieser Erkrankungen.

Obwohl die SIRS Kriterien zwischenzeitlich im klinischen Alltag eine weite Verbreitung gefunden haben und als Basis von Einschlusskriterien in einer Vielzahl von Studien genutzt wurden, sprechen sich auch neuere Veröffentlichungen für eine kritische Betrachtung und Modifizierung der Definitionen von 1992 aus. Zum einen, um das bessere pathophysiologische Verständnis dieser Syndrome angemessener zu reflektieren, zum anderen, um die immer noch vorhandenen Unklarheiten bezüglich der Sepsisdefinitionen weiter abzubauen (Marshall 2000; Poeze, Ramsay et al. 2004).

Erst im Jahre 2003 fand ein überarbeitetes Diagnose- und Stagingssystem, entworfen von einer Konsensuskonferenz in den Jahren 2001-2003 (Levy, Fink et al. 2003) in der Literatur Erwähnung.

Ziel dieser Konferenz war es Methoden zu identifizieren, welche die Genauigkeit und Reliabilität der Sepsisdiagnostik erhöhen und eine präzise Charakterisierung und Abstufung von Patienten mit diesen Konditionen erlauben. Das PIRO (Prädisposition, Infektion, Reaktion und Organdysfunktion) System trägt in Anlehnung an das onkologische TNM System grundlegenden Patienteneigenschaften Rechnung, die möglicherweise prognosebestimmend sind.

So wird zum einen das Basisrisiko des Patienten ermittelt und durch sein Potential auf die Therapie zu antworten ergänzt. Obwohl dieses innovative Diagnose- und Stagingssystem noch an seinem Anfang steht und in aufwendigen klinischen Studien verifiziert und standardisiert werden muss (Opal 2005), bleibt die Verwendung von einheitlichen Definitionen bei den Einschlusskriterien und somit der Beschreibung von Studienpopulationen eine Grundvoraussetzung für die Vergleichbarkeit verschiedener Gruppen. Insbesondere bei der Durchführung multizentrischer Studien ist neben möglichst einheitlichen diagnostischen und therapeutischen Konzepten die Verwendung standardisierbarer Testverfahren zwingend erforderlich. Nicht zuletzt bedarf auch die Evaluation therapeutischer Interventionen sowie die Erlangung vergleichbarer Studienergebnisse verschiedener Forschungsgruppen standardisierte Arbeits- und Testverfahren.

Neben einer Vielzahl verschiedener in der Vergangenheit genutzter Messmethoden zur Bestimmung der monozytären HLA-DR Expression liegt mit dieser Arbeit ein Vergleich der bisher einzigen standardisierbaren Methoden vor.

Diese Standardisierung der Methoden beruht in erster Linie auf einer Eichung der Erfassung der Fluoreszenzintensität auf den patienteneigenen Zellen. Hierzu werden Kalibrationsbeads verwendet, die mit einer definierten Intensität Licht emittieren. Durch die Erstellung einer Eichkurve gelingt es so die Variabilität, die durch die Varianz der Laserstärken in verschiedenen Durchflußzytometern entsteht, auszugleichen.

Die Unterschiede der verglichenen Methoden beruhen im Wesentlichen zum einen in der Markierung und Erkennung der Monozytenpopulation zum anderen in der Art der Auswertung der Expressionsdichte des HLA-DR Rezeptors bzw. des HLA-DR positiven Anteils der Monozyten.

In der Methode nach Nebe wurde die Monozytenpopulation durch die Markierung mit Anti-CD 14 beschrieben. 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 CD14 insbesondere die zusätzliche Anwendung weiterer Oberflächenantigene, wie z.B. CD16 oder CD64, empfohlen.

CD16 entspricht dem Fc γ R-III Rezeptor und gehört zu der Gruppe Rezeptoren, die die Fc Fragmente von Immunglobulinen binden. Diesen Vorschlägen lagen Studienergebnisse zugrunde, die zeigten, dass sich die Oberflächenantigenstruktur infolge verschiedener Erkrankungen ändert (Williams, Withington et al. 1998; Ziegler-Heitbrock 1996). Gesunde Probanden wiesen in der Regel vor allem CD14 positive und CD16 negative Monozyten (CD14+/CD16-) auf. In Folge entzündlicher Erkrankungen nahm die Expression von CD14 jedoch ab und eine zusätzliche Expression von CD16 (CD14dim/CD16+) wurde beobachtet.

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

Die QuantiBRITE™ Methode nutzt zur Markierung der Monozyten einen Antikörper der sowohl CD14 als auch CD64 bindet. Dabei entspricht CD64 dem Fc γ R-I Rezeptor und stellt einen IgG Rezeptor der mononukleären Zellen dar. Bereits 1995 beschrieb Roitt, dass CD64 vorwiegend auf Monozyten exprimiert wird (Roitt 1995). Durch die Kombination dieser Domänen 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 CD64 infolge bestimmter Erkrankungen verändert wird, die funktionelle Alterationen zur Folge haben (Grage-Griebenow, Flad et al. 2001).

Monneret weist 2002 in einer Studie nach, dass die Verwendung unterschiedlicher Meßmethoden zu differenten Ergebnissen bezüglich der HLA-DR Expression führt (Monneret, Elmenkouri et al. 2002). Dies sind Zeichen dafür, dass bisher noch keine stabilen Oberflächenmarker zur Eingrenzung der Monozytenpopulation gefunden sind und die Markierung der Monozytenpopulation weiterer Optimierung bedarf. Dabei gilt es zu beachten, dass durch den Verlust von CD14/CD64 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.

Als Endpunkt wurde die ICU Mortalität gewählt, da das primäre Interesse auf die Prognoseleistung der Parameter bezüglich des Überlebens kritischer Krankheitssituationen gerichtet war.

Die Erfassung der 28-Tage Mortalität, die nach einer Konferenz des National Institut of Health (NIH) und des American College of Chest Physicians (ACCP) unter der Leitung von Dellinger bereits 1997 als relevanter Parameter mit angemessener Periodendauer klassifiziert wurde, brachte nach statistischer Auswertung keine zusätzlichen Ergebnisse (Dellinger 1997). Gleiches gilt für die Krankenhaussterblichkeit.

Beide Endpunkte unterschieden sich von der ICU Mortalität um 4% (2 Verstorbene).

5.3 Diskussion der Ergebnisse im Einzelnen

In Bezug auf die Patientenauswahl lässt sich feststellen, dass die Zusammensetzung hinsichtlich des Alters, der Grunderkrankungen und der Erkrankungsschwere repräsentativ für das Kollektiv einer operativen Intensivstation eines Krankenhauses der Maximalversorgung ist. Die beobachtete Mortalität entspricht mit 28% ICU Mortalität (bzw. 32% Krankenhausmortalität und 28 Tage Mortalität) der zu erwartenden Mortalität in einem Patientenkollektiv mit der vorliegenden Erkrankungsschwere (Alberti, Brun-Buisson et al. 2002; Wichmann, Inthorn et al. 2000). Ebenso stellt der geringere Anteil weiblicher Patienten ein bekanntes Merkmal dar.

Ein höheres Lebensalter bei Intensivpatienten ist nach Hughes et al. nach wie vor ein Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität (Hughes, MacKirdy et al. 2001). Daher ist auch dieses Resultat für das beschriebene Patientenkollektiv nicht ungewöhnlich.

Die Inzidenz der aufgetretenen Infektionen spiegelt mit einem hohen Anteil an Peritonitiden (40%) deutlich das Patientenkollektiv des abdominalchirurgischen Operationschwerpunktes der angeschlossenen Abteilung wider. 2002 publizierte Alberti eine multizentrische Kohortenstudie, die Infektionsdaten von 28 vornehmlich europäischen Intensivstationen auswertet und vergleichbare Ergebnisse liefert (Alberti, Brun-Buisson et al. 2002). In dieser Studie finden sich unter den im Krankenhaus

erworbenen Infektionen 37% Pneumonien, 14% Peritonitiden, und 8% Harnwegsinfektionen. In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv lagen 27% Pneumonien und 5% Harnwegsinfektionen vor. Daraus lässt sich eine durchaus repräsentative Infektionsverteilung für diese Studie ableiten.

Seit Mitte der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts stellte die Arbeitsgruppe um Volk und Döcke eine Reihe von Studien vor, welche die monozytäre HLA-DR Expression in vitro und in vivo untersuchten. Es wurden pathophysiologische Grundlagen erarbeitet und mit beobachteten klinischen Veränderungen in Zusammenhang gebracht.

In einer 1985 veröffentlichten Arbeit wird erstmalig die Verminderung der HLA-DR Expression auf Monozyten beschrieben (Volk, Waschke et al. 1985). Den damit einhergehenden Funktionsverlust der Monozyten in vitro konnte Volk in einer Veröffentlichung 1991 zeigen (Volk, Thieme et al. 1991). In der Folge wurde von einigen anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen, dass eine verringerte HLA-DR Expression auf Monozyten mit einem Anstieg des Infektionsrisikos und anderer Komplikationen bei Patienten nach großen chirurgischen Operationen (Ditschkowski, Kreuzfelder et al. 1999), nach schweren Verbrennungen (Sachse, Prigge et al. 1999) oder nach kardiopulmonalen Bypassoperationen (Strohmeyer, Blume et al. 2003) verbunden ist. Gleiches konnte bei Patienten mit Pankreatitis (Richter, Nebe et al. 1999) und nach Transplantationen (Haveman, van den Berg et al. 1999; Hoffman, Weinberg et al. 2004; Kunz, Pross et al. 1998) nachgewiesen werden.

Durch Stimulation mit Interferon γ oder Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) gelang die Erhöhung der HLA-DR Expression und damit die Wiederherstellung der Monozytenfunktion. Das sich daraus ergebende Novum ein Immunmonitoring mit einer Immuntherapie zu verbinden wurde in einer Fallstudie 1997 von Döcke umgesetzt (Döcke, Randow et al. 1997). Für neun Patienten mit verminderter HLA-DR Expression auf Monozyten konnte nach Gabe von Interferon γ ein Anstieg des Oberflächenmarkers und eine Verbesserung der Funktionsfähigkeit nachgewiesen werden. 2003 wurde ein gleichsinniger Effekt durch Stimulation mit GM-CSF in einer Pilotstudie nachgewiesen (Nierhaus, Montag et al. 2003). In einer ersten doppelblinden plazebokontrollierten klinischen Studie konnte in der Folge ein deutlich positiver Effekt auf das Outcome septisch erkrankter Patienten mit supprimierter HLA-DR Expression durch den Einsatz von GM-CSF gezeigt werden (Montag, Zapfe et al. 2004).

Im Hinblick auf die therapeutischen Möglichkeiten, die der Einsatz solcher immunmodulierenden Substanzen bietet, scheint die Evaluierung erster klinischer Studienergebnisse in größeren multizentrischen Studien dringend geboten. Vor diesem Hintergrund wird deutlich, wie unverzichtbar die Anwendung biologischer Testverfahren ist, die in der Lage sind schnell, zuverlässig und standardisiert eine Aussage über den Funktionszustand des Immunsystems zu liefern.

Aus den Daten der vorliegenden Studie ergaben sich bezüglich des untersuchten Kontrollkollektivs gesunder Probanden Ergebnisse, die oberhalb der von Nebe und Döcke ermittelten Normgrenzen für die beiden Methoden liegen (Döcke 2001; Nebe 1998). Nebe schlug 1998 für die HLA-DR Messung [MFI] vor, Werte über 250 MFI als normal anzusehen, Werte zwischen 150 und 250 als intermediär und Werte unter 50 MFI als Korrelat einer schlechten Prognose zu deuten.

Döcke publizierte 2001 nach vorläufigen Ergebnisse sei ein AB/C Wert von mehr als 10000 als normal anzusehen, während Werte unter 5000 AB/C für eine ausgeprägte Monozytendeaktivierung sprächen (Döcke 2001). In einer Folgestudie wurden diese Referenzwerte 2005 an neuere Ergebnisse angepasst, danach spricht ein Wert von größer als 15000 AB/C für Immunkompetenz, Werte zwischen 10000 und 15000 AB/C für eine moderate Immunsuppression und Werte unter 5000 AB/C für eine Immunparalyse (Döcke, Höflich et al. 2005).

Mit 1155 MFI (SD 403 MFI) und 29319 AB/C (SD 8422 AB/C) liegt die gesunde Kontrollgruppe deutlich über diesen Werten.

Die Vergleiche zwischen der Kontroll- und der Studiengruppe ergeben für alle drei Methoden im t-Test signifikant unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 19, 20, 21) auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$. Auch spätere Studien konnten dies insbesondere für die Methode nach QuantiBRITE™ reproduzieren (Sedlackova, Prucha et al. 2005).

Die Untersuchungsergebnisse der monozytären HLA-DR Expression in der Methode nach Nebe [MFI] ergeben für die Tage 1, 4, 5, 7-12 und 14 ein signifikant zwischen überlebenden und versterbenden Patienten trennendes Signal.

Ähnlich gelagerte monozentrische Studien ergaben in der Vergangenheit bereits Assoziationen von geringer monozytärer HLA-DR Expressionsdichte [MFI] mit einer schlechten Prognose (Hershman, Cheadle et al. 1990) oder einem hohen Risiko oder

dem Vorhandensein von Infektionen (Gotzinger, Sautner et al. 2000; Hensler, Hecker et al. 1997; Wakefield, Carey et al. 1993).

Aufgrund der Beobachtung einer dauerhaft unterhalb einer Grenze von 200 MFI liegenden Verlaufskurve der monozytären HLA-DR Expression für die Gruppe der verstorbenen Patienten konnte ein Cut-off Wert von 200 MFI angenommen werden. Dieser Grenzwert zeigt mit einer Spezifität und Sensitivität von 0,6 aber nur eine mäßige Prädiktion für die Mortalität.

Für Patienten, die bereits am ersten Beobachtungstag eine geringere HLA-DR Expression aufwiesen, ergab sich ein doppelt so hohes Mortalitätsrisiko (10 von 26) wie für die Vergleichsgruppe (7 von 34). Lag die HLA-DR Expression über einen Zeitraum von mehr als 48 Stunden unterhalb dieses Wertes, ergab sich für die Patienten sogar ein vierfach erhöhtes Risiko zu versterben (42% versus 8%). Mit einer Sensitivität von 90% und einer Spezifität von 50% auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ verspricht dieser Parameter ein besserer Prädiktor zu sein. Bereits in früheren Untersuchungen konnte Volk et al. eine 82 prozentige Mortalitätsrate nachweisen, wenn das monozytäre HLA-DR über einen Zeitraum von 5 Tagen supprimiert war (Volk, Reinke et al. 1996). Für die vorliegende Studie scheint die prolongierte Suppression eine stärkere Aussagekraft als die primär erniedrigte HLA-DR Expression auf Monozyten zu haben. Im Hinblick auf die pathophysiologischen Konsequenzen einer anhaltend verringerten HLA-DR Expression und dem damit einhergehenden Funktionsverlustes der Monozyten zur Antigenpräsentation (Monneret, Lepape et al. 2006; Wolk, Docke et al. 1999) stellt dieser Zusammenhang ein plausibles Ergebnis dar. Mit der Dauer einer Immunsuppression steigt das Risiko an Infektionen zu erkranken, die zusätzliche Komplikationen darstellen und den Krankheitsverlauf entscheidend beeinflussen können.

Im Gegensatz zu verschiedenen Studien (Hershman, Cheadle et al. 1990; Volk, Reinke et al. 1996; Volk, Thieme et al. 1991) aus der Vergangenheit konnte durch die vorliegende Untersuchung für die Auswertung der monozytären HLA-DR Expression in Prozent für Tag 1 des Intensivaufenthaltes kein prädiktives Prognosepotential nachgewiesen werden. Auch in der Vergangenheit gibt es Untersuchungen, in denen es nicht gelang einen Zusammenhang zwischen erniedrigter monozytärer HLA-DR Expression und der Mortalität herzustellen, zum Beispiel in einer Arbeit von Fumeaux und Pugin aus dem Jahr 2002 (Fumeaux und Pugin 2002) sowie einer Veröffentlichung

von Perry (Perry, Mostafa et al. 2003), die keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Mortalität zwischen den Patienten mit niedriger HLA-DR Expression ($\leq 30\%$) und einer normalen Oberflächenantigenexpression ($\geq 70\%$) findet.

Ob dies ausschließlich auf Auswirkungen unterschiedlicher Studienprotokolle bezüglich der untersuchten Patientenkollektive (chirurgische/internistisch/gemischt) oder auf unterschiedliche Therapieregime in den verschiedenen Zentren zurückzuführen ist, bleibt unklar.

In seiner Veröffentlichung von 2006 diskutiert Monneret, dass die uneinheitliche Studienlage möglicherweise in den pathophysiologischen Abläufen begründet liegt. In seiner Untersuchung an 86 Patienten mit septischem Schock konnte erst im Verlauf (an Tag 3-4) eine signifikant unterschiedliche HLA-DR Expression nachgewiesen werden. Bei seinem Vergleich der Ergebnisvarianten % und MFI zeigte sich die Auswertung als prozentualer Anteil HLA-DR positiver Monozyten der Alternative gegenüber überlegen (Monneret, Lepape et al. 2006).

Denkbar sind aber auch präanalytische bzw. methodische Ursachen, die zu widersprüchlichen Ergebnissen in der aktuellen Studienlage führen.

Lediglich aus der Beurteilung des gesamten Beobachtungszeitraumes errechnen sich für die Tage 4, 5, 7, 8, 11 und 12 signifikant zwischen den beiden Patientengruppen trennende Ergebnisse. Vor dem Hintergrund der Vorstellung eines phasischen Verlaufes bei dem zugrunde liegenden Krankheitsbild der Sepsis und dem zugehörigen Kontinuum aus Folgeerkrankungen lässt sich dieser Zusammenhang verstehen. In der Initialphase einer Sepsis geht man von einer systemischen hyperinflammatorischen Antwort des Immunsystems aus, die mit einer normalen oder ansteigenden monozytären HLA-DR Expression assoziiert ist. In einer gegenregulatorischen späteren Phase der Abwehrreaktion kommt es zu einer Suppression der proinflammatorischen Mediatoren und Produktion von antiinflammatorischen Mediatoren. Daraus resultiert die Herabregulation der HLA-DR Expression auf den Monozyten und deren Deaktivierung und Dysfunktion (Haveman, van den Berg et al. 1999).

Auch die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse der HLA-DR Expression nach der QuantiBRITE™ Methode zeigt für diese Untersuchung, dass der Marker für den ersten Intensivaufenthaltstag keine prognostische Aussagekraft für das Outcome aufweist.

In einer Studie an 85 elektiven kardiochirurgischen Patienten, die ebenfalls diese neue, gut standardisierte Methode benutzte, wurden von Oczeni erste klinische Untersuchungen veröffentlicht (Oczeni, Krenn et al. 2003). Für dieses eher homogene, gut charakterisierte Patientenkollektiv konnte postoperativ kein Zusammenhang zwischen der monozytären HLA-DR Expression und dem Risiko eines postoperativen SIRS, einer Sepsis oder infektiöser Komplikationen nachgewiesen werden.

Fast zeitgleich publiziert Strohmeyer in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Volk und Döcke ebenfalls eine Studie an einer Patientengruppe (n=56) nach kardiopulmonaler Bypassoperation, die den Zusammenhang zwischen der HLA-DR Expression auf Monozyten und dem Infektionsrisiko untersucht (Strohmeyer, Blume et al. 2003). Hier konnte ein signifikanter Unterschied in der Expression des Oberflächenmarkers für die drei definierten Gruppen: Patienten ohne Infektion, Patienten mit Verdacht auf Infektionen und Patienten mit gesicherter Infektion, gefunden werden.

Untersuchungen mit der Fragestellung nach der prädiktiven Aussagekraft bezüglich der Mortalität in einem heterogenen Patientenkollektiv, das septisch erkrankt ist, fehlen bisher.

Auch für diese Methode ergeben sich für die Betrachtung der HLA-DR Expression über den Beobachtungszeitraum im späteren Verlauf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Alternativgruppen.

Die Auswertung der erhobenen klinischen Scoresysteme zeigte für die beiden Outcome Scores APACHE II und SAPS II die erwartete deutliche Trennung zwischen Überlebenden und Verstorbenen. Aus der Höhe der Mittelwerte des Gesamtkollektives ergab sich zudem eine Übereinstimmung zwischen der tatsächlichen und der erwarteten Mortalität.

Die Verlaufscores MODS und SOFA sind entwickelt worden um die Erkrankungsschwere verschiedener Patientenkollektive vergleichbar zu machen und Therapieerfolge objektivieren zu können (Jacobs, Zuleika et al. 1999; Metnitz, Valentin et al. 1999).

So zeigt in dieser Studie der SOFA-Score im Verlauf über den Beobachtungszeitraum für die Gruppe der Überlebenden in den ersten 7 Tagen eine Absenkung von 8 auf 3

Punkte. In der Gruppe der Verstorbenen schwanken die Punktwerte zwischen 9 und 7,5. Erst nach dem 11. Aufenthaltstag ist ein kontinuierlicher Punktabfall zu beobachten.

Dies unterstreicht die Leistung dieser Scores bei der Einschätzung der Erkrankungsschwere sowie des Therapieerfolges über den Behandlungszeitraum, für eine Individualprognose sind sie jedoch wie alle Scoresysteme ungeeignet.

Die Aussagekraft bezüglich der Mortalität könnte zukünftig durch eine Weiterentwicklung des PIRO Konzeptes verbessert werden (Moreno, Metnitz et al. 2008), indem durch die Nutzung eines spezifischen Biomarkers die Antwort (Response) des Organismus auf die Infektion und Behandlung besser erfasst werden kann und so mehr Gewichtung im vorgeschlagenen Score auf der Grundlage des PIRO Konzeptes erhalte.

In verschiedenen Studien zur Bedeutung der monozytären HLA-DR Expression als Prognosefaktor bei septisch erkrankten Intensivpatienten wurden nur selten heterogene Patientenkollektive mit dem Endpunkt Mortalität untersucht.

Zudem fehlt bislang ein Vergleich der derzeit drei alternativ benutzten Methoden bzw. Auswerteverfahren zur prädiktiven Aussagekraft bezüglich des Outcome bei SIRS und Sepsis.

Aufgrund der vorliegenden Arbeit kann hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft kein Vorteil der QuantiBRITE™ Methode gegenüber den Alternativen aufgezeigt werden. So zeigt sich die auch aktuell am häufigsten verwendete Methode nach Nebe als die Methode mit der größten prognostischen Bedeutung. Schwachpunkte bleiben die fehlende Möglichkeit einer Kalibrierung und die damit fehlende geräte- und untersucherunabhängigen Referenzwerte.

Durch verbesserte intensivmedizinische Behandlungsverfahren und Therapieoptionen sind septische Komplikationen in der Frühphase beherrschbar geworden. Allerdings bleibt die Mortalität von SIRS und Sepsis seit Jahren auf einem unverändert hohen Niveau, was nicht zuletzt auf im Verlauf, während der Phase der relativen Immuninkompetenz, erworbene nosokomiale Infektionserkrankungen zurückzuführen ist.

Durch neue immunmodulatorische Therapieansätze lässt sich die Reaktionslage des Immunsystems beeinflussen. Dies setzt aber zwingend eine valide immunologische Charakterisierung des individuellen Patienten voraus.

Um die beste Methode zur Einschätzung der Reaktionslage des Immunsystems zu identifizieren bedarf es weiterer differenzierter, standardisierter und multizentrischer Studien.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Morbidität und Mortalität von Intensivpatienten werden zu einem wesentlichen Teil von Folgezuständen des systemisch inflammatorischen Reaktionssyndroms und von Infektionen verursacht.

Trotz immenser Fortschritte auf dem Gebiet der intensivmedizinischen Behandlungsmöglichkeiten zeigten sich bisher die meisten Therapieansätze zur Beeinflussung des Immunsystems als ineffektiv.

Um eine möglichst genaue Einschätzung der Reaktionslage des Immunsystems zu erhalten, etablierte sich die Bestimmung der monozytären HLA-DR Expression.

Mit der QuantiBRITE™ Methode wurde zudem erstmalig eine standardisierbare und zu kalibrierende Methode auf den Markt gebracht, die, unabhängig von Untersucher und eingesetztem Gerät, eine Durchführung von multizentrischen Studien ermöglichen soll. Die vorliegende Arbeit vergleicht erstmalig verschiedene Methoden der HLA-DR Expressionsbestimmung auf Monozyten.

Hervorstechendes Charakteristikum dieser Arbeit ist die Untersuchung an einem heterogenen Patientenkollektiv mit SIRS und Sepsis einer Intensivstation mit abdominalchirurgischem Schwerpunkt.

Bezüglich der zentralen Fragestellung zeigt sich die Methode nach Nebe in ihrer Fähigkeit zur Prädiktion der Mortalität in einem septisch erkranktem Patientenkollektiv gegenüber der Alternativmethode deutlich überlegen. Beiden Methoden gelingt eine zuverlässige Erfassung einer gegenüber dem Gesunden veränderte Aktivitätslage (Verringerung der monozytären HLA-DR Expression) des Immunsystems.

Weitere Untersuchungen an homogenen Patientengruppen sowie multizentrische Studien sind erforderlich um die neu eröffneten Möglichkeiten zu nutzen.

7 Literaturverzeichnis

Alberti C, Brun-Buisson C, et al. (2002) Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 28(2): 108-121.

Angus D C (2000) Study Design Issue in Sepsis Trials. *Sepsis* 4: 7-13.

Bein T, Unertl K (1993) [Potentialities and limitations of the score system in intensive medicine]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 28(8): 476-483.

Belge K U, Dayyani F, et al. (2002) The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168(7): 3536-3542.

Benacerraf B (1988) Antigen processing and presentation. The biologic role of MHC molecules in determinant selection. *J Immunol* 141(7 Suppl): S17-20.

Bone R C (1991) The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 115(6): 457-469.

Bone R C, Balk R A, et al. (1992) American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20(6): 864-874.

Brun-Buisson C (2000) The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 26 Suppl 1: 64-74.

Brun-Buisson C, Doyon F, et al. (1995) Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *Jama* 274(12): 968-974.

Cohen J, Guyatt G, et al. (2001) New strategies for clinical trials in patients with sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 29(4): 880-886.

Dausset J (1958) [Iso-leuko-antibodies.]. *Acta Haematol* 20(1-4): 156-166.

Dellinger R P (1997) From the bench to the bedside: the future of sepsis research. Executive summary of an American College of Chest Physicians, National Institute of Allergy and Infectious Disease, and National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop. *Chest* 111(3): 744-753.

Ditschkowski M, Kreuzfelder E, et al. (1999) HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma. *Ann Surg* 229(2): 246-254.

Döcke W D (2001) Durchflußzytometrische Quantifizierung der monozytären HLA-DR Expression. Manuskript zum Anwenderkursus: 1-10.

Döcke W D, Höflich C, et al. (2005) Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem* 51(12): 2341-2347.

Döcke W D, Randow F, et al. (1997) Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 3(6): 678-681.

Eckhardt R (1994) Grundlagen der Durchflußzytometrie: Problemerkennung und -bewältigung (Teil 1). *mta* 9: 992-994.

Elebute E A, Stoner H B (1983) The grading of sepsis. *Br J Surg* 70(1): 29-31.

Fisher C J, Jr., Zheng Y (1996) Potential strategies for inflammatory mediator manipulation: retrospect and prospect. *World J Surg* 20(4): 447-453.

Fumeaux T, Pugin J (2002) Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 166(11): 1475-1482.

Garner J S, Jarvis W R, et al. (1988) CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 16(3): 128-140.

Giannoudis P V, Smith R M, et al. (2000) Immediate IL-10 expression following major orthopaedic trauma: relationship to anti-inflammatory response and subsequent development of sepsis. *Intensive Care Med* 26(8): 1076-1081.

Goris R J, te Boekhorst T P, et al. (1985) Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Arch Surg* 120(10): 1109-1115.

Gotzinger P, Sautner T, et al. (2000) Severe acute pancreatitis causes alterations in HLA-DR and CD14 expression on peripheral blood monocytes independently of surgical treatment. *Eur J Surg* 166(8): 628-632.

Graf J, Doig G S, et al. (2002) Randomized, controlled clinical trials in sepsis: has methodological quality improved over time? *Crit Care Med* 30(2): 461-472.

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

Haveman J W, van den Berg A P, et al. (1999) Low HLA-DR expression on peripheral blood monocytes predicts bacterial sepsis after liver transplantation: relation with prednisolone intake. *Transpl Infect Dis* 1(3): 146-152.

Hensler T, Hecker H, et al. (1997) Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun* 65(6): 2283-2291.

Hershman M J, Cheadle W G, et al. (1990) Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *Br J Surg* 77(2): 204-207.

Hoffman J A, Weinberg K I, et al. (2004) Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral blood monocytes and the risk of pneumonia in pediatric lung transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 6(4): 147-155.

Hotchkiss R S, Karl I E (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348(2): 138-150.

Hughes M, MacKirdy F N, et al. (2001) Outcome of long-stay intensive care patients. *Intensive Care Med* 27(4): 779-782.

Jacobs S, Zuleika M, et al. (1999) The Multiple Organ Dysfunction Score as a descriptor of patient outcome in septic shock compared with two other scoring systems. *Crit Care Med* 27(4): 741-744.

Janeway C A, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002) (Hrsg) *Immunologie*, 5. Auflage, Spektrum, Heidelberg, Berlin: 30-96.

Klein J, Sato A (2000) The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 343(10): 702-709.

Knaus W A, Draper E A, et al. (1985) APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 13(10): 818-829.

Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.

Kunz D, Pross M, et al. (1998) Diagnostic relevance of procalcitonin, IL-6 and cellular immune status in the early phase after liver transplantation. *Transplant Proc* 30(5): 2398-2399.

Le Gall J R, Lemeshow S, et al. (1993) A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *Jama* 270(24): 2957-2963.

Le Gall J R, Loirat P, et al. (1984) A simplified acute physiology score for ICU patients. *Crit Care Med* 12(11): 975-977.

Levy M M, Fink M P, et al. (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31(4): 1250-1256.

Lin R Y, Astiz M E, et al. (1994) Relationships between plasma cytokine concentrations and leukocyte functional antigen expression in patients with sepsis. *Crit Care Med* 22(10): 1595-1602.

Longobardi Givan A (1992) Seeing the light: Laser, fluorochromes and filters. In: A. Longobardi Givan und Wiley-Liss (Hrsg) *Flow Cytometry First Principles*. New York: 55-73.

Marshall J C (2000) SIRS and MODS: what is their relevance to the science and practice of intensive care? *Shock* 14(6): 586-589.

Marshall J C, Cook D J, et al. (1995) Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med* 23(10): 1638-1652.

Marshall J C, Sweeney D (1990) Microbial infection and the septic syndrome. *Arch Surg* 125: 17-23.

Metnitz P G, Valentin A, et al. (1999) Prognostic performance and customization of the SAPS II: results of a multicenter Austrian study. *Simplified Acute Physiology Score*. *Intensive Care Med* 25(2): 192-197.

Monneret G, Elmenkouri N, et al. (2002) Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. *Clin Chem* 48(9): 1589-1592.

Monneret G, Lepape A, et al. (2006) Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 32(8): 1175-1183.

Montag B, Zapfe A, et al. (2004) Immunoparalysis in severe sepsis resolves after gm-csf: a double blind, randomized trial. *Intensive care medicine* 30(S1): 134.

Moreno R P, Metnitz B, et al. (2008) Sepsis mortality prediction based on predisposition, infection and response. *Intensive Care Med* 34(3): 496-504.

Moreno R P, Vincent J L, et al. (1999) The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM. *Intensive Care Med* 25(7): 686-696.

Nebe C T (1998) Flow Cytometric Analysis of Immunoparalysis. *Clinical Laboratory* 44: 441-446.

Nierhaus A, Montag B, et al. (2003) Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 29(4): 646-651.

Oczenski W, Krenn H, et al. (2003) HLA-DR as a marker for increased risk for systemic inflammation and septic complications after cardiac surgery. *Intensive Care Med* 29(8): 1253-1257.

Opal S M (2005) Concept of PIRO as a new conceptual framework to understand sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 6(3 Suppl): S55-60.

Ormerod M (1990) Flow cytometry: A Practical Approach. In: O. U. Press (Hrsg) *An introduction to fluorescence technology*. New York: 29-44.

Perry S E, Mostafa S M, et al. (2003) Is low monocyte HLA-DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis? *Intensive Care Med* 29(8): 1245-1252.

Poeze M, Ramsay G, et al. (2004) An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis. *Crit Care* 8(6): R409-413.

Raffael A, Nebe T (1994) Grundlagen der Durchflußzytometrie. In: *Durchflußzytometrie in der klinische Diagnostik*. R. Schmidt und G. Rothe (Hrsg), Schattauer, Stuttgart.

Richter A, Nebe T, et al. (1999) HLA-DR expression in acute pancreatitis. *Eur J Surg* 165(10): 947-951.

Roitt I (1995) (Hrsg) Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 3. Auflage, Thieme, Stuttgart, New York.

Sachse C, Prigge M, et al. (1999) Association between reduced human leukocyte antigen (HLA)-DR expression on blood monocytes and increased plasma level of interleukin-10 in patients with severe burns. *Clin Chem Lab Med* 37(3): 193-198.

Satoh A, Miura T, et al. (2002) Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral monocytes as a predictive marker of sepsis during acute pancreatitis. *Pancreas* 25(3): 245-250.

Schiebler T H, Schmidt W, Zilles K (1999). *Anatomie*. 8. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Sedlackova L, Prucha M, et al. (2005) [Immunological monitoring of sepsis using flow cytometry--quantitation of monocyte HLA-DR expression and granulocyte CD64 expression]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 54(2): 54-61.

Steward M, Male D (1995) Immunologische Testmethoden. In: I. Roitt, J. Brostoff und D. Male (Hrsg) Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Thieme, Stuttgart: 352-354.

Strohmeyer J C, Blume C, et al. (2003) Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients. *Cytometry* 53B(1): 54-62.

Todd J A, Acha-Orbea H, et al. (1988) A molecular basis for MHC class II--associated autoimmunity. *Science* 240(4855): 1003-1009.

Vincent J L (1997) Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you. *Crit Care Med* 25(2): 372-374.

Vincent J L, Moreno R, et al. (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working

Group on Sepsis- Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22(7): 707-710.

Volk H D, Reinke P, et al. (2000) Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem Immunol* 74: 162-177.

Volk H D, Reinke P, et al. (1989) Diagnostic value of an immune monitoring program for the clinical management of immunosuppressed patients with septic complications. *Clin Transplantation* 3: 246-252.

Volk H D, Reinke P, et al. (1996) Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med* 22 Suppl 4: S474-481.

Volk H D, Thieme M, et al. (1991) Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies. *Behring Inst Mitt*(88): 208-215.

Volk H D, Waschke S R, et al. (1985) Decrease of HLA-DR antigen expression by human monocytes during cultivation in absence of exogenous or endogenous interferon-gamma. *Immunol Lett* 10(2): 103-107.

Wakefield C H, Carey P D, et al. (1993) Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg* 80(2): 205-209.

Wichmann M W, Inthorn D, et al. (2000) Incidence and mortality of severe sepsis in surgical intensive care patients: the influence of patient gender on disease process and outcome. *Intensive Care Med* 26(2): 167-172.

Williams M A, Withington S, et al. (1998) Monocyte anergy in septic shock is associated with a predilection to apoptosis and is reversed by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ex vivo. *J Infect Dis* 178(5): 1421-1433.

Wolk K, Docke W, et al. (1999) Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis. *Pathobiology* 67(5-6): 253-256.

Ziegler-Heitbrock H W (1996) Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. *Immunol Today* 17(9): 424-428.

Ziegler-Heitbrock H W (2000) Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol* 67(5): 603-606.

8 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Kreymann möchte ich mich für die freundliche Überlassung des Themas bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn OA Dr. Axel Nierhaus und Frau Dr. Barbara Montag, durch deren kontinuierliche und verlässliche Betreuung diese Arbeit entstehen konnte.

Mein Dank gilt den namentlich nicht erwähnten Kollegen des wissenschaftlichen Assistenzpersonals des klinisch chemischen Labors sowie des Transfusionsmedizinischen Labors für die konstruktive Unterstützung und Hilfestellung bei methodischen und praktischen Fragestellungen.

Meiner Familie danke ich insbesondere für die anhaltende Motivationsleistung und Ermutigungen sowie die geleistete Unterstützung bei der Betreuung unserer Kinder.

9 Lebenslauf

Darf aus datenschutzrechtlichen Gründen entfallen.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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 Fachmann an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift

Annett Heydorn