

**AUS DEM UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

KLINIK FÜR INTENSIVMEDIZIN

DIREKTOR: PRIV.-DOZ. DR. MED. S. KLUGE

**„EINFLUSS VON GM-CSF AUF PARAMETER DER HUMORALEN  
IMMUNANTWORT BEI PATIENTEN MIT SCHWERER SEPSIS UND  
IMMUNPARALYSE“**

**DISSERTATION**

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORS DER MEDIZIN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT HAMBURG

VORGELEGT VON TIMO STEIGEMANN

AUS HAMBURG

HAMBURG 2010

Angenommen von der medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg:

am 29.11.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der  
medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. K.-G. Kreymann

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

PD Dr. O.Mann

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

PD Dr. J. van Lunzen

„Eine neue wissenschaftliche Wahrheit pflegt sich nicht in der Weise durchzusetzen, dass ihre Gegner überzeugt werden und sich als belehrt erklären, sondern vielmehr dadurch, dass ihre Gegner allmählich aussterben und dass die heranwachsende Generation von vornherein mit der Wahrheit vertraut gemacht ist.“

Max Planck

Meinem Vater in großer Dankbarkeit

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	Arbeitshypothese und Fragestellung	5
1.2	Das Immunsystem	6
1.3	Zytokine	9
1.4	Sepsis, SIRS und Immunparalyse	13
1.5	Immunmonitoring und Therapieansätze	19
2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	Patienten, Ein- und Ausschlusskriterien	25
2.2	Studienablauf	26
2.3	Messung von humanem Leukozytenantigen-DR (HLA-DR)	27
2.4	Zytokine	31
2.4.1	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)	31
2.4.2	Tumornekrosefaktor Alpha (TNF $\alpha$ ), basal und stimuliert	34
2.4.3	Interleukin 10 (IL 10)	35
2.4.4	Interleukin 6 (IL 6)	35
2.4.5	Das C-reaktive Protein (CRP)	35
2.4.6	Procalcitonin (PCT)	36
2.5	Leukozyten	36
2.6	Erhebung der klinischen Scores und Erfassung der Infektionen	37
2.7	Statistik	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Demographie	41
3.2	Ergebnisse – Granulozyte Macrophage Colony Stimulating Factor	45
3.3	Ergebnisse – Tumornekrosefaktor Alpha, basal und stimuliert	46
3.4	Ergebnisse – Interleukin 10	48
3.5	Ergebnisse – Routineimmunparameter	49
3.6	Ergebnisse der klinischen Beobachtung	55
3.7	Ergebnisse der klinischen Scores	56
4	DISKUSSION	58
4.1	Kernaussagen	58
4.2	Methodenkritik	59

4.3	Diskussion der Ergebnisse im Einzelnen und Einordnung in den Stand der Wissenschaft	64
5	ZUSAMMENFASSUNG	78
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	80
7	LITERATURVERZEICHNIS	82
8	DANKSAGUNG	88
9	LEBENS LAUF	89
10	TABELLENVERZEICHNIS	91
11	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	92
12	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	93

# 1 Einleitung

## 1.1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Sepsis ist eine Krankheitsentität mit einer weiterhin hohen Morbidität und Mortalität in der Intensivmedizin. In den letzten zwei Jahrzehnten konnte ein deutlich besseres Verständnis für die pathophysiologischen Abläufe, die im Zuge des septischen Geschehens auftreten, entwickelt werden. Dass es sich hierbei um einen Prozess handelt, bei dem sich *hyper-* und *hypoinflammatorische* Phasen mit jeweils verschiedenen Störungen des Organismus abwechseln, hat sich mittlerweile etabliert. In vielen Studien ist in der Vergangenheit mit wenig Erfolg versucht worden, gezielt therapeutisch in den Sepsisverlauf einzugreifen. Die Ursachen hierfür sind mannigfaltig und es bedarf ohne Frage einer Vielzahl weiterer Untersuchungen, um effektive, evidenzbasierte Therapiekonzepte zu entwickeln.

Im Verlauf der Sepsis kommt es zu einer massiven Ausschüttung von verschiedenen sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Botenstoffen, die in der jeweiligen Phase der Sepsis dominieren. Ihre genaue Interaktion und Wirkung sind bisher nur wenig verstanden. Eine zentrale Rolle in der Infektionsabwehr im Körper spielen, neben anderen Leukozyten, die Monozyten, die als antigenpräsentierende Zellen ein Bindeglied zwischen der angeborenen, unspezifischen Immunantwort und der erworbenen, spezifischen Immunantwort bilden. Neben der Phagozytose und Produktion von Entzündungsmediatoren präsentieren sie den T-Helferzellen über das humane Leukozytenantigen DR (HLA-DR) Bruchstücke von Fremdstoffen, was deren Aktivierung und konsekutiv die Aktivierung der spezifischen Immunantwort induziert. Gleichzeitig spiegelt dieser Oberflächenmarker den Aktivierungsgrad von Monozyten wider. Zur Bestimmung der Immunkompetenz eines Patienten hat sich daher die Messung der Expression von HLA-DR auf der Monozytenoberfläche als eine Methode etabliert, da nachgewiesen werden

konnte, dass es im Verlauf der Sepsis zu einer starken Herunterregulierung dieses Oberflächenproteins kommt. Dies kann mit einer Störung der immunologischen Kompetenz eines Patienten bis hin zur so genannten Immunparalyse einhergehen. In der Vergangenheit konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass der rekombinante humane Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (rhGM-CSF) in der Lage ist, die im Verlauf der Sepsis auftretende immunologische Dysfunktion von Monozyten wieder aufzuheben und so die Phase der Immunparalyse zu verkürzen. Messbar war dies an einer Hochregulation von HLA-DR und einer deutlich gesteigerten leukozytären Stimulationsfähigkeit *ex vivo* durch bakterielles Endotoxin. Bisher ist dies allerdings nur *in vitro* oder im Rahmen von nur zum Teil randomisierten und kontrollierten *in vivo* Studien mit kleinen Stichproben septischer Intensivpatienten gezeigt worden.

Ziel der vorliegenden prospektiven, randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudie war es, zum einen den Einfluss von rhGM-CSF auf Faktoren der humoralen Immunantwort während der erworbenen Immunparalyse im Zuge von schwerer Sepsis zu untersuchen und zum anderen, in welchem Zusammenhang dies zur Wiederherstellung der zellulären Immunantwort steht.

### **1.2 Das Immunsystem**

Das Immunsystem ist ein komplexes, hoch spezifisches System, das der Erhaltung der Individualstruktur aller höheren Lebewesen dient. Dies erfolgt durch Abwehr organismusfremder Stoffe sowie durch die kontinuierliche Elimination von körpereigenen, strukturell oder funktional gestörten Zellen durch die Organe des lymphatischen Systems, dessen Effektorzellen, zum Beispiel Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten, der Vermittlung der Immunantwort dienen. Man differenziert die unspezifischen Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems, das mit Hilfe von



Epithelzellen, Phagozyten, natürlichen Killerzellen und Komplementfaktoren eine rasche Initialreaktion vermittelt, von der gerichteten Abwehrreaktion des erworbenen, adaptiven Immunsystems. Dieses ergänzt, spezifiziert und beschleunigt die durch das natürliche Immunsystem begonnene Elimination von kranken oder als fremd erkannten Strukturen mit Hilfe von Lymphozyten und durch die von der B-Zell-Reihe synthetisierten pathogenspezifischen Antikörper. Die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, die auch als Antigen präsentierende Zellen (APC) bezeichnet werden, erkennen mittels präformierter Mustererkennungsrezeptoren (PRR: pattern-recognition receptors), die zellständig oder in löslicher Form im Körper vorliegen, die für mikrobielle Pathogene spezifischen und konstanten Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP: pathogen-associated molecular patterns), wie zum Beispiel Lipopolysaccharid (LPS), Lipoproteine oder Peptidoglykane. Die PRR dienen der Opsonisierung von Pathogenen, der Induktion der Phagozytose und der Aktivierung der Komplement- und Gerinnungskaskaden bzw. induzieren Signaltransduktionen, die eine Entzündung oder den programmierten Zelltod (Apoptose) zur Folge haben. Zu den PRR gehören z.B. die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR: toll-like receptors), die u.a. von Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten exprimiert werden, oder Scavenger-Rezeptoren, die eine große Rolle bei der Phagozytose von mikrobiellen Pathogenen spielen. Als Beispiele für lösliche PRR wären u.a. das Lipopolysaccharid-bindende Protein zu nennen, das mit Hilfe des auf Makrophagen exprimierten CD 14 Rezeptors eine Endozytose des Pathogens induziert, oder auch das in der Leber synthetisierte C-reaktive Protein, das an die bakterielle Oberfläche bindet und so u.a. eine Aktivierung des Komplementsystems auslöst. Das Komplementsystem umfasst gut 30 verschiedene Plasmaproteine, die in einer selbst amplifizierenden proteolytischen Kaskade in ihrer Wirkung eine große Rolle bei Opsonisierung und Lyse von mikrobiellen Pathogenen und der chemotaktischen Regulation einer Entzündung spielen. Der Vorteil der zwar in ihrer Struktur und Kompetenz

starren PRRs ist die unmittelbare Verfügbarkeit, so dass einer mikrobiellen Invasion in den Organismus ohne Verzögerung begegnet werden kann.

Im Gegensatz hierzu reagiert das erworbene, adaptive Immunsystem, dessen Reaktion v.a. durch B- und T- Lymphozyten vermittelt wird, langsamer, dafür jedoch hoch spezifisch. Die Antigenpräsentation durch Makrophagen gegenüber den Lymphozyten induziert u.a. die Bildung von pathogenspezifischen Antikörpern (AK) durch B-Lymphozyten, die eine gezielte Bekämpfung der Infektion ermöglicht. Ein Teil dieser B-Lymphozyten wandelt sich nach einer stattgehabten Infektion in Gedächtniszellen um, die bei einer erneuten Exposition gegenüber dem gleichen Antigen eine wesentlich raschere und gleichbleibend hochspezifische Abwehr ermöglichen. Die T-Lymphozyten als T-Helferzellen unterstützen die Antikörperbildung bzw. induzieren ihrerseits als zytotoxische Zellen den Untergang von infizierten oder malignen Zellen. Die gesamte Immunantwort wird durch eine große Anzahl verschiedener Zytokine orchestriert, die sowohl von den verschiedenen leukozytären Zellpopulationen als auch von den infizierten oder geschädigten Geweben als Botenstoffe produziert werden. Zu diesen Zytokinen zählen unter anderem Interleukine und Interferone, die in einem komplexen Netzwerk die Aktivierung und den Effekt der zellulären und humoralen Immunantwort steuern.

Als ein zentrales Bindeglied zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem fungieren Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen, die durch die MHC II (Major Histocompatibility Complex Klasse II) vermittelte Präsentation von intrazellulär prozessierten Antigenen T-Lymphozyten stimulieren. Diese schütten in der Folge ihrerseits verschiedene chemotaktische Botenstoffe aus bzw. treten in direkte Zell-zu-Zell-Kontakte ein, um so zum einen B-Lymphozyten zu aktivieren und zur Antikörperproduktion anzuregen und zum anderen dadurch die gesamte Immunantwort ihrerseits zu verstärken. MHC-Klasse-II Moleküle, wie z.B. HLA-DR, sind Glykoproteine, die auf Oberflächen von Zellen mit antigenpräsentierender Kapazität exprimiert werden. Nach rezeptorvermittelter Internalisierung oder Aufnahme durch

Pinozytose und Prozessierung durch die Effektorzelle werden die MH-Klasse-II-Komplexe mit kurzen Peptiden des Fremdartigens beladen und zur Präsentation an die Zelloberfläche gebracht, wo sie dann mit den CD4+ T-Helferzellen in Kontakt treten (Holländer et al. 2006, Hayes et al. 2005, Nepom et al. 2005, Hörner et al. 2004, Höflich et al. 2002).

### **1.3 Zytokine**

Zytokine sind Botenstoffe, die im Organismus von jeder kernhaltigen Zelle produziert werden. Neben den Hormonen und Neurotransmittern stellen Zytokine die wichtigsten Kommunikationsmittel zwischen Zellen dar. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Bereitstellung eines Signalnetzwerkes, das unterschiedliche Effekte und Vorgänge vermittelt. Dabei können Zytokine auf die produzierende Zelle selbst (autokrin), auf benachbarte Zellen (parakrin) und im gesamten Organismus (endokrin) wirken. Zytokine können Wachstum, Differenzierung und die individuelle Funktionen einer Zelle steuern. Gewebeschädigungen führen zur Freisetzung chemotaktischer Zytokine, was wesentlich zur Steuerung der Immunabwehr und Wundheilung beiträgt. Zytokine zeigen eine Redundanz in ihrem Wirkspektrum. So bedeutet der Ausfall eines einzelnen Zytokins nicht zwangsläufig einen kompletten Funktionsverlust des Netzwerkes (Holländer et al. 2006, Hayes et al. 2005).  
Nachfolgend werden die für die vorliegende Studie wichtigsten Zytokine kurz vorgestellt.

#### **Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)**

GM-CSF ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 20 bis 30 Kilodalton (kD). Es wird vor allem von Antigen-aktivierten T-Zellen und Makrophagen gebildet und sezerniert. Ursprünglich isoliert worden ist GM-CSF als ein Faktor, der das Wachstum von Makrophagen- und Granulozytenkolonien auf Agarplatten stimuliert (Holländer et al. 2006). Die biologische Wirkung ist

aber wesentlich vielschichtiger und umfasst neben der Wirkung als Wachstumsfaktor die Stimulation der immunologischen Effektorfunktionen von Makrophagen und von Granulozyten durch Verbesserung der Phagozytosefähigkeit, der zellulären Zytotoxizität und der Überlebenszeit. GM-CSF fungiert ferner als chemotaktischer Faktor für Leukozyten und fördert deren Migration und Adhäsionsfähigkeit (Hamilton 2008, Rapoport et al. 1992, Chantry et al. 1990). Für Patienten mit Sepsis und einem systemischen inflammatorischen Reaktions-Syndrom (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) konnte in *ex vivo* Studien demonstriert werden, dass GM-CSF die Expression von HLA-DR auf Monozyten und die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen stimulieren kann (Rosenbloom et al. 2005, Flohé et al. 2003 und 1999, Williams et al. 1998).

Die klinische Zulassung von GM-CSF beschränkt sich bisher auf den Einsatz in der Onkologie und Hämatologie.

### **Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF $\alpha$ )**

TNF $\alpha$  ist ein vielseitiges Zytokin, dessen Spektrum biologischer Funktionen für die Ausbildung und Unterhaltung einer adäquaten Entzündungsreaktion von immenser Bedeutung ist (Holländer et al. 2006). Es wurde ursprünglich als Substanz identifiziert, die in der Lage war, hämorrhagische Nekrosen in Tumoren zu induzieren. Das Zytokin in seiner biologisch aktiven Form hat eine Größe von 17,3 kD. Die Synthese erfolgt unter anderem in Leukozyten, Mastzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, aber vor allen Dingen in Makrophagen (Holländer et al. 2006). Die Aktivierung der Synthese erfolgt als Reaktion auf unterschiedliche biologische, physikalische und chemische Stimuli. Eine besonders starke Produktion und Sekretion dieses proinflammatorischen Mediators löst die Exposition gegenüber LPS aus, was unter anderem die Ursache für die schwere Symptomatik bei gramnegativen Infektionen erklärt. Neben der entscheidenden Aufgabe als proinflammatorisches Zytokin hat TNF $\alpha$  eine Reihe anderer Funktionen. So

moduliert es z. B. die Differenzierung, das Wachstum sowie den Metabolismus unterschiedlicher Zellen. Es fördert die Lipolyse und einen katabolen Stoffwechsel. Im Gefäßsystem bewirkt TNF $\alpha$  einen Tonusverlust und am Myokard eine Abnahme der Inotropie. Die damit verbundene mögliche vaskuläre Hypotonie und verminderte myokardiale Kontraktilität reflektiert sich in den klinischen Kardinalzeichen des septischen Schocks (Müller-Werdan 2005). In der Phase der septischen Immunparalyse ist demonstriert worden, dass neben einer verminderten monozytären HLA-DR-Expression auch eine reduzierte Produktion von TNF $\alpha$  auf LPS-Stimulation besteht (Flohé 1999). Daher kann die TNF $\alpha$  Synthesekapazität als ein wichtiger Indikator für die immunologische Kompetenz fungieren (Kox et al. 2000).

### **Interleukin 10 (IL 10 )**

Interleukin 10 ist ein Peptid mit einer Größe von 17 bis 21 kD. Produziert wird das Zytokin durch eine Reihe von Zellen, vornehmlich von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten, aber auch von dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten. Die Produktion wird durch einen negativen Feedback-Mechanismus und partiell durch Interleukin 4 inhibiert (de Waal Malefyt 1991). Es hat vornehmlich antiinflammatorische Eigenschaften, die hauptsächlich durch die Suppression der Bildung von proinflammatorischen Zytokinen vermittelt wird (Holländer et al. 2006). Ferner wirkt IL 10 einschränkend auf die Fähigkeit zur Antigenpräsentation durch dendritische Zellen und Makrophagen, indem es die Expression von Oberflächenproteinen wie HLA-DR vermindert (Fumeaux et al. 2002). Somit kommt dem IL 10 eine komplexe Rolle in der Pathogenese der Sepsis zu (Müller-Werdan 2005).

### **Interleukin 6 (IL 6)**

Interleukin 6 ist ein Glykoprotein mit einer Größe von 21 bis 26 kD, das vorwiegend proinflammatorische Eigenschaften aufweist. Die Wirkung wird vermittelt durch die Induktion weiterer Entzündungsmediatoren und die

Stimulation der Bildung von Akute-Phase-Proteinen sowie deren Freisetzung. Die Produktion von IL 6 erfolgt in Monozyten und einer Vielzahl anderer Zellen. Stimuliert werden Produktion und Sekretion durch verschiedene chemische oder physikalische Reize wie die Exposition mit LPS, Gewebeschäden, Hypoxie, durch andere proinflammatorische Zytokine wie IL 1 und TNF $\alpha$  sowie durch IL 6 selbst. Dabei korreliert die Höhe des Plasmaspiegels mit der Schwere der Erkrankung und der Prognose des Patienten (Müller-Werdan 2005). Da IL 6 schon in einem Zeitraum von zwei Stunden nach einem adäquaten Stimulus ansteigt, auf Grund seiner kurzen Halbwertszeit innerhalb von fünf bis sechs Stunden wieder abfällt und auf einen erneuten Reiz wieder restimulierbar ist (Hack et al. 1997), eignet es sich gut als Screeningparameter, der seit einigen Jahren besonders in der Intensivmedizin etabliert ist. Gerade als Verlaufparameter bietet das IL 6 eine frühzeitigere und genauere Abschätzung des Erkrankungsausmaßes als beispielsweise das C-reaktive Protein, das aufgrund seiner Halbwertszeit erst nach 24 bis 36 Stunden eine Veränderung der Entzündungsaktivität anzeigt.

### **C-Reaktives Protein (CRP)**

Das CRP ist eines der klassischen Akute-Phase-Proteine mit einem Molekulargewicht von 115 kD. Seine Synthese in der Leber wird hauptsächlich durch Interleukin 6 bewirkt. Das CRP hat die Fähigkeit, an ein breites Spektrum von endogenen und exogenen Strukturen zu binden, und so eine Erkennung und anschließende Phagozytose durch Leukozyten zu fördern. An einen Liganden gebunden, kann das CRP über den klassischen Weg das Komplementsystem aktivieren und die Opsonisierung von Antigenen unterstützen. Es wird als Reaktion auf einen Entzündungsreiz freigesetzt und steigt während einer akuten Infektion nach sechs Stunden an, mit einem Maximum nach 48 Stunden (Wahl et al. 2003). Bei der Interpretation der erhobenen Werte ist zu berücksichtigen, dass eine Zu- oder Abnahme der Entzündungsreaktion sich wegen der Halbwertszeit des Proteins von ein bis

zwei Tagen erst mit einer Verzögerung von bis zu 48 Stunden im Ergebnis reflektiert (Wahl et. al. 2003).

### **Procalcitonin (PCT)**

PCT ist das 13 kD schwere Prohormon des Calcitonins, das unter physiologischen Bedingungen von den C-Zellen der Schilddrüse gebildet wird. Das Protein ist im Plasma stabil und wird quantitativ nicht zu Calcitonin abgebaut. Procalcitonin wurde erstmals 1993 von Assicot als ein neuer Parameter zur Diagnose und Verlaufsbeobachtung von bakteriellen Infektionen beim Menschen beschrieben.

Unter normalen Bedingungen beträgt die Procalcitonin-Serumkonzentration < 0,1 ng/ml, im Gegensatz zu Konzentrationserhöhungen bis auf das 5000- bis 10000-fache bei schwerer Sepsis (Meisner et al. 1996, Gramm et al. 1995), während die Calcitonin-Konzentrationen im Plasma im Normbereich bleiben (Assicot 1993). Die genauen biologischen Funktionen von Procalcitonin sind bis heute nicht hinreichend aufgeklärt. In Bezug auf den Ort der Bildung von PCT scheint gesichert, dass es unter den Bedingungen einer schweren Entzündung oder Sepsis von fast allen extrathyreoidalen Geweben gebildet werden kann, wobei die Leber den größeren Teil zu produzieren scheint (Meisner et al. 2003). Nach Induktion tritt es mit einer Latenz von vier Stunden im Plasma auf und erreicht seine Maximalwerte nach acht bis 24 Stunden (Fraunberger 2007). PCT eignet sich daher im Rahmen eines mehrgleisigen Immunmonitorings gut als Diagnose- und Verlaufsmarker bei schweren bakteriellen Entzündungen bzw. einer Sepsis.

## **1.4 Sepsis, SIRS und Immunparalyse**

Seit der ersten modernen klinisch-bakteriologischen Definition der Sepsis von Schottmüller 1914 hat sich das Begriffsverständnis in seiner Gesamtheit grundlegend gewandelt, ohne jedoch an klinischer Relevanz zu verlieren. Die

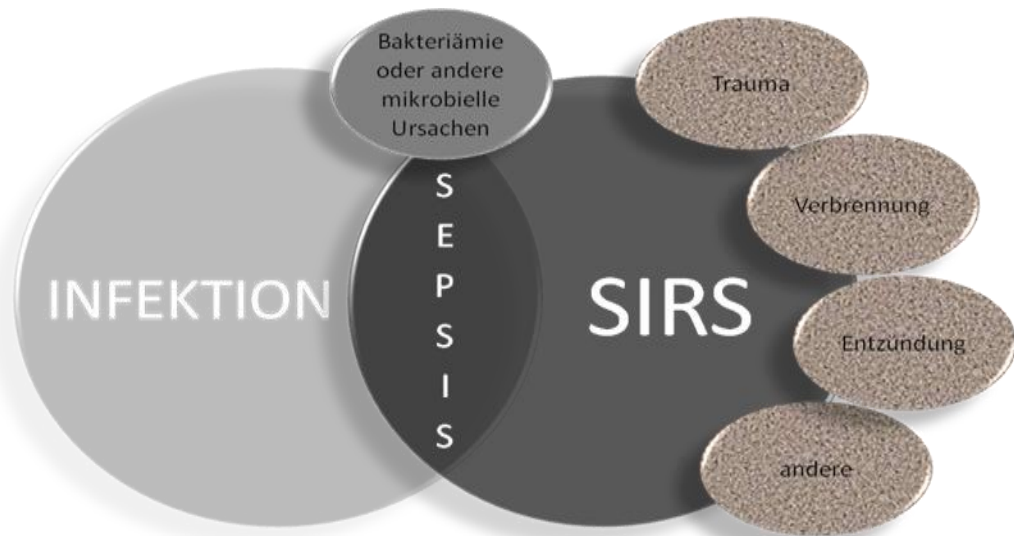
auch heute noch gültigen Definitionen für Sepsis beziehungsweise für das systemisch-inflammatorische Reaktionssyndrom (SIRS) gehen auf die Konsenskonferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) von 1992 zurück. Unter der Leitung von Roger C. Bone wurden verschiedene nicht grundlegend definierte Krankheitsbilder, wie zum Beispiel septischer Schock und Multiorganversagen, die unter dem Begriff eines septischen Syndroms zusammengefasst wurden, einheitlich definiert. Hiernach sind die Voraussetzungen für ein SIRS erfüllt, wenn ein Patient mindestens zwei abnorme Veränderungen in den Bereichen Körpertemperatur, Herz- und Atemfrequenz sowie Leukozytenzahl bietet. Die folgende Tabelle fasst die genaue Definition zusammen:

**Tab. 01:** SIRS-Kriterien nach d. ACCP/SCCM Consensus Conference von 1992

Körpertemperatur	Hyperthermie: $>38^{\circ}\text{C}$ oder Hypothermie: $>36^{\circ}\text{C}$
Herzfrequenz	Tachykardie: $>90/\text{Minute}$
Atemfrequenz	Tachypnoe: $>20/\text{Minute}$ oder $\text{paCO}_2 <32 \text{ mmHg}$ oder kontrollierte Beatmung
Leukozytenanzahl	Leukozytose: $>12.000/\text{mm}^3$ oder Leukopenie: $<4000/\text{mm}^3$ oder der Nachweis von $>10\%$ unreifer neutrophiler Granulozyten

Als auslösende Ursache für ein SIRS können verschiedene nicht infektiöse Krankheitsbilder, wie zum Beispiel schweres Trauma, Ischämie, Verbrennungen oder aseptische Entzündungen, fungieren (Bone et al. 1992). Die folgende Abbildung veranschaulicht die Beziehung zwischen Sepsis und SIRS:





**Abb. 01:** Darstellung des Zusammenhangs von SIRS und Sepsis (modifiziert nach Bone et al. 1992).

Eine Sepsis liegt nach den ACCP/SCCM-Kriterien dann vor, wenn ein SIRS mit einer nachgewiesenen Infektion einhergeht. Für eine schwere Sepsis muss zusätzlich eine Organdysfunktion, wie z.B. Oligurie, Hypoperfusion oder Hypotension, vorliegen. Zeichen einer Hypoperfusion sind Azidose, ein Laktatanstieg oder eine gestörte Bewusstseinslage des Patienten. Eine septische Hypotension liegt vor, wenn der systolische Blutdruck unter 90 mmHg oder um mehr als 40 mmHg vom Ausgangswert abfällt. Bestehen bei einer Sepsis eine Hypotension, die trotz adäquater Volumensubstitution persistiert, und Zeichen einer vorliegenden Perfusionsstörung bzw. Organdysfunktion, ist der Patient im septischen Schock. Bone et al. definierten die Organdysfunktion als einen Zustand, bei dem das Organ in seiner Funktion kompromittiert ist und die Homöostase ohne intensivmedizinische Intervention nicht aufrecht erhalten werden kann. Ein Multiorganversagen (MOV) liegt dann vor, wenn gleichzeitig oder in rascher Folge mehrere lebenswichtige Organsysteme ausfallen. Die nachstehende Tabelle fasst die jeweiligen Definitionen zusammen:

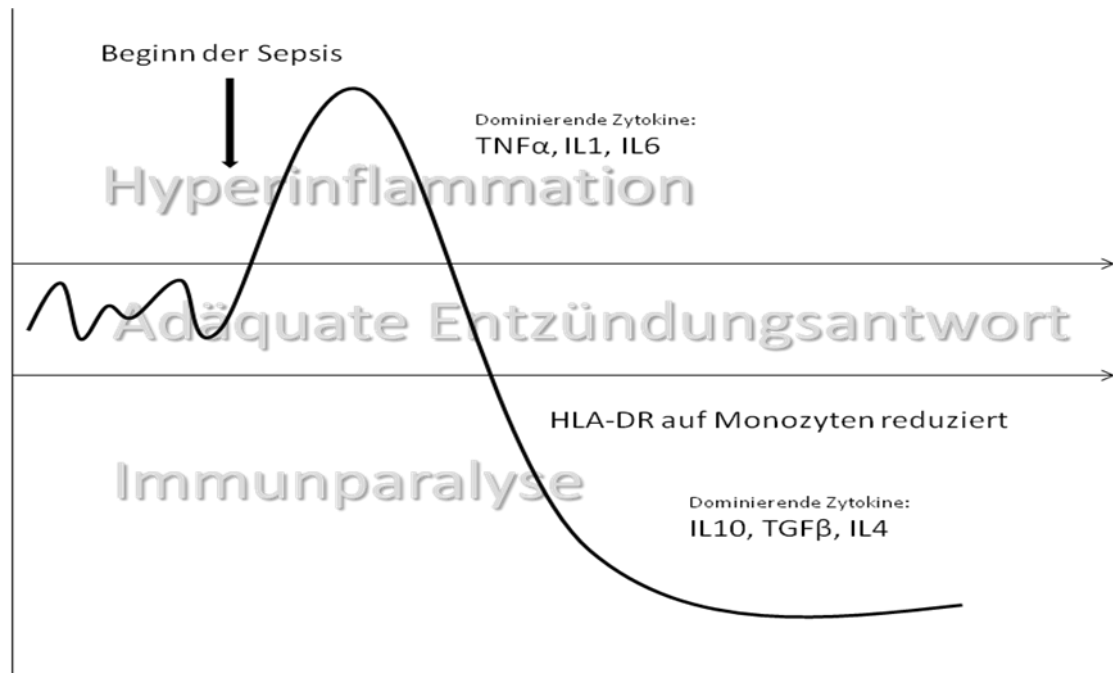
**Tab. 02:** Zusammenfassung der ACCP/SCCM Definitionen für Sepsis und mit ihr einhergehende Krankheitsbilder.

- Infektion: Inflammatorische Reaktion auf einen exogenen mikrobiellen Reiz oder auf eine Translokation dieser Organismen in ein normalerweise steriles Gewebe
- Sepsis: SIRS mit nachgewiesener Infektion
- Schwere Sepsis: Sepsis mit einhergehender Organdysfunktion und Hypotension (RRsyst. <90 mmHg oder Abfall um >40 mmHg) oder Hypoperfusion (klinische Zeichen: Azidose/Laktatanstieg)
- Septischer Schock: Sepsis mit, trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution, persistierender Hypotension und Perfusions-/Organdysfunktion
- Organdysfunktion: Vorliegen einer oder mehrerer Organfunktionsstörungen, die eine Aufrechterhaltung des inneren Gleichgewichts ohne Intervention unmöglich macht
- Multiorganversagen: Gleichzeitiger oder in rascher Folge auftretender Ausfall von mehreren Organsystemen

Die Pathogenese der Sepsis umfasst einen komplexen Prozess aus einer generalisierten zellulären Aktivierung durch mikrobielle Organismen oder ihrer Stoffwechselprodukte, was die Ausschüttung einer Vielzahl von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren durch Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten zur Folge hat (Adrie et al. 2000). Bei einer kontrollierten Entzündung bleiben die pro- und antiinflammatorischen Mechanismen des Immunsystems in einem ausgeglichenen Verhältnis. Im Zuge der Sepsis jedoch kommt es zunächst zu einem Überschießen der proinflammatorischen Reaktion auf die mikrobiologische Invasion, die von einer sich parallel entwickelnden antiinflammatorischen Phase abgelöst wird. Roger C. Bone prägte in einem 1996 veröffentlichten Artikel zusätzlich zum SIRS die Begriffe des kompensatorisch antiinflammatorischen Reaktionssyndroms (CARS) und des gemischt antagonistischen Reaktionssyndroms (MARS), um das parallele Vorliegen von Pro- und Antiinflammation im Verlauf der Sepsis zu betonen.

Die exzessive Produktion von proinflammatorischen Botenstoffen, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin (IL) 1 $\beta$ , hat in einem komplexen Zusammenspiel von zellulärer und humoraler Immunantwort, bei dem auch eine enge Wechselwirkung der Entzündungsmediatorkaskade mit dem Gerinnungssystem besteht, die für die Sepsis typischen hämodynamischen Veränderungen zur Folge (Hörner et al. 2004). Es kommt zu einer mediatorinduzierten Vasodilatation und einer Endothelschädigung mit gestörter Permeabilität im Sinne eines „Capillary Leakage Syndroms“. Daraus resultieren eine Störung der Makro- und Mikrozirkulation mit konsekutiver Gewebshypoxie und eine Schädigung von Organen und Geweben. Der Organismus reagiert auf die Hypotension mit einer hyperdynamen Kreislaufregulierung, was zu einem massiv gesteigerten Volumenbedarf führt (Cunnington et al. 2008). Zusätzlich zur Vasodilatation zeigt sich häufig eine regionale oder auch globale kardiale Kontraktionsstörung als Folge einer Myokarddepression, die aus einer mediator- und toxin-bedingten Schädigung der Kardiomyozyten resultiert (Müller-Werdan et al. 2005). Die maximale Ausprägung dieses Zustands, bei dem die Kompensationskapazität des Körpers erschöpft ist, ist der septische Schock.

Im Zuge der antiinflammatorischen Gegenregulation des Organismus überwiegen, neben anderen Zytokinen, Mediatoren wie IL 10, IL 4 und Transforming Growth Factor (TGF)  $\beta$  (Bone et al. 1997). Diese kann ihrerseits so weit übersteuern, dass die Immunkompetenz des Patienten deutlich gestört ist und ihn anfällig für sekundäre Infektionen macht. Diesen Zustand bezeichneten Volk et al. als „Immunparalyse“ (Volk et al. 2000).



**Abb. 02:** Möglicher Zeitverlauf der Immunantwort, modifiziert nach Wahl et al. 2003.

Die grundlegenden Therapieprinzipien bei Sepsis bestehen aus zwei wesentlichen Aspekten. Erstens gilt es, ohne Zeitverzug kalkuliert antibiotisch zu behandeln, den Ursprung der Infektion zu finden und diesen umgehend zu eliminieren bzw. chirurgisch zu sanieren. Zum Zweiten müssen die mit der Sepsis einhergehenden kardiorespiratorischen und metabolischen Störungen intensivmedizinisch stabilisiert und in der Folge behoben werden. Wichtig ist hierbei ein frühzeitiger, zielgerichteter Beginn der stabilisierenden Maßnahmen, die den aktuellen internationalen Richtlinien der „Surviving Sepsis Campaign“ (Dellinger et al. 2008) entsprechen. Als die häufigste Lokalisation der Primärinfektionsquellen konnten Vincent et al. in einer europäischen Multicenterstudie die Lunge (68%), das Abdomen (22%), blutkultureller Erregernachweis (20%) und der Urogenitaltrakt (14%) identifizieren (Vincent et al. 2006).

Pro Jahr erkranken in Deutschland circa 79.000 Einwohner (116/100.000) an einer Sepsis. Weitere geschätzte 75.000 Einwohner (110/100.000) bieten das

Bild einer schweren Sepsis und oder des septischen Schocks. Von diesen 154.000 Patienten jährlich versterben etwa 60.000 (39%) an den Folgen dieser Erkrankung (Engel et al. 2007). Im europäischen Vergleich konnten Vincent und Kollegen ähnlich hohe Zahlen in ihrer Multicenterstudie (SOAP-Studie) zeigen (Vincent et al. 2006). So entwickeln auf europäischen Intensivstationen mehr als 35% der Intensivpatienten im Verlauf ihres Aufenthalts eine Sepsis. Die Intensivsterblichkeit bei einfacher Sepsis betrug 27%, um im Falle eines septischen Schocks auf mehr als 50% zu steigen. Im Vergleich zu älteren epidemiologischen Studien von Angus et al. 2001 in den USA und Bruin-Buisson und Kollegen 1995 in Frankreich gibt es, trotz deutlicher Fortschritte in den medizinischen Möglichkeiten und dem pathophysiologischen Verständnis von SIRS und Sepsis, bezüglich der Morbidität und Mortalität kaum Veränderungen. Auch unter ökonomischen Gesichtspunkten nimmt die Sepsis eine herausragende Stellung ein. Die in der Intensivmedizin entstehenden Kosten machen einen großen Anteil am Gesamtbudget eines Krankenhauses aus. So betragen die Kosten für einen septischen Intensivpatienten im Durchschnitt € 1090 ± 422 pro Tag (Moerer et al. 2007). Diese Zahlen zeigen, dass die Sepsis auch weiterhin eine der großen medizinischen Herausforderungen darstellt.

### **1.5 Immunmonitoring und Therapieansätze**

Im klinischen Alltag haben sich eine Reihe von Inflammations- und Sepsismarkern zur Messung und Erfassung einer akuten Entzündungsreaktion durchgesetzt. Am weitesten verbreitet ist das CRP, das zu den so genannten Akute-Phase-Proteinen gehört und als Reaktion auf eine entzündliche Noxe oder einen Gewebeschaden ausgeschüttet wird. Allerdings unterliegt es einer langsamen Kinetik, so dass erst 48 Stunden nach Beginn einer Entzündung der maximale Serumspiegel erreicht wird (Wahl et al. 2003). Somit eignet sich das CRP nicht zur frühzeitigen Diagnose einer Sepsis. Das IL 6 hingegen steigt

schon drei bis vier Stunden nach einem Antigenkontakt an, um dann im Verlauf von 48 Stunden bei adäquater Therapie abzufallen. Daher kann es das Zeitfenster bis zum Anstieg des CRP und anderer Akute-Phase-Proteine schließen (Wahl et al. 2003).

Bedauerlicherweise sind sowohl das CRP als auch das IL6 sehr unspezifische Marker in Bezug auf das Vorliegen einer Infektion, anders als das Procalcitonin, das im Rahmen von bakteriellen Infektionen eine ähnlich ausgeprägte und frühzeitige Kinetik wie das IL 6 zeigt (Wahl et al.2003). Es ist im Falle einer bakteriellen Infektion schon innerhalb von vier Stunden nachweisbar und erreicht nach acht bis 24 Stunden ein Plateau (Fraunberger 2007).

Für das funktionelle Monitoring des Immunstatus eines Patienten haben sich über die vergangen zwei Jahrzehnte verschiedene Methoden etabliert. Die Arbeitsgruppe um H.D. Volk in Berlin konnte zum Beispiel ab Mitte der neunziger Jahre in verschiedenen Studien zeigen, dass bei septischen Patienten eine reduzierte Expression von HLA-DR auf Monozyten mit einer verminderten Immunantwort in einem pathophysiologischen Zusammenhang steht und dieser Marker sinnvoll im Rahmen einer medizinischen Therapie genutzt werden kann (Volk et al. 1996). Weitere Untersuchungen von Volk und Mitarbeitern aus dem Jahr 2000 zeigten ferner, dass Monozyten mit einer reduzierten HLA-DR Expression in ihrer Fähigkeit der Antigenpräsentation und Stimulation von T-Helferzellen gestört sind. Weitere Ansätze sind das Messen des sogenannten Respiratory Burst von Immunzellen (Hamilton et al. 2008, Williams et al. 1998) und die *ex vivo* Vollblut-Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) und der anschließenden Bestimmung der maximalen TNF $\alpha$ -Ausschüttung als Maß der Aktivierungsfähigkeit von Immunzellen (Höfling et al. 2002), wobei Granulozyten und Monozyten die größte Rolle spielen.

Als Konsequenz aus einem stetig wachsenden Verständnis für die Pathophysiologie der Sepsis und einer deutlichen Verbesserung der intensivmedizinischen Möglichkeiten sind über die letzten 20 Jahre konzeptionell verschiedene Interventionsstudien durchgeführt worden, die das Ziel hatten, eine „Magic Bullet“ zu finden, welche die hohe Morbidität und Mortalität von SIRS und Sepsis senken kann. Es ist unter anderem versucht worden, durch die Gabe von Antitoxin die Wirkung von bakteriellen Endotoxinen abzuschwächen (McCloskey et al. 1994), mit der antiinflammatorischen Wirkung von hoch dosierten Kortikosteroiden (Bone et al. 1997) eine positive Wirkung zu erzielen, durch die Applikation von Antikörpern gegen Zytokine wie zum Beispiel TNF $\alpha$  (Abraham et al. 1998) oder deren Rezeptoren (Opal et al. 1997) die Entzündungsreaktion zu modulieren oder mit der Gabe von Antithrombin das in der Sepsis oft kompromittierte Gerinnungssystem wieder auszubalancieren. Keine der durchgeführten Interventionen, obwohl zum Teil in großen Multicenterstudien untersucht, konnte eine wesentliche Reduktion der Morbidität und Mortalität erzielen. Als Erklärung kommen verschiedene Ursachen in Betracht:

Viele dieser Therapieansätze basierten nur auf Vermutungen, die aus Ergebnissen im Tiermodell und daraus resultierenden theoretischen Ansätzen resultierten (Angus 2000). Sie zielten oftmals nur auf ein bestimmtes Glied in der inflammatorischen Kaskade, ohne dass die komplexe Verschaltung und Redundanz der verschiedenen Mediatoren und Zytokine in ihrer Gesamtheit verstanden worden ist. J.-L. Vincent und Kollegen sahen im Jahr 2002 weitere mögliche Gründe für den ausbleibenden weitreichenden Erfolg unter anderem in der zu großen Heterogenität der Studienpopulationen im Hinblick auf Alter, Co-Morbidität und Ursache der Sepsis und der sie verursachenden Erreger. Ferner bestehe eine weitere große Schwierigkeit im „Timing“ der Intervention, was aus dem dynamischen Ablauf der Sepsis mit Pro- und Antiinflammation resultiere, und so nicht jeder Patient zu jedem Zeitpunkt von einer bestimmten Therapie profitiere. Daraus leitet sich die Forderung nach einem mehrgleisigen

immunologischen Monitoring vor einer Intervention ab, um den Zustand eines Patienten genau bestimmen zu können und konsekutiv das Therapieregime anzupassen (Marshall et al. 2009, Vincent et al 2006). Zu ähnlichen Schlüssen bezüglich des „Study Design“ kommt D. Angus: Er schlägt unter anderem vor, dass, neben Verbesserung des Verständnisses pathophysiologischer Zusammenhänge und einer Stichprobenvergrößerung, die Identifikation des Erkrankungszustands und Erkrankungszeitpunkts der Studienpopulation verbessert werden muss, um die Aussagekraft von Studien bezüglich möglicher Therapiewirkung zu verbessern (Angus 2000).

Viele der in der Vergangenheit durchgeführten Interventionsstudien konzentrierten sich vor allen Dingen auf die erste, hyperinflammatorische Phase der Sepsis. Durch die Möglichkeiten der modernen Intensivmedizin zusammen mit international gültigen Behandlungsrichtlinien (Dellinger et al. 2008), in denen gegenwärtig der Schwerpunkt im therapeutischen Ansatz auf „Early Goal Directed Organ Therapy“ liegt, überleben immer mehr Patienten die erste Phase der Sepsis, um dann im Zuge der sich anschließenden antiinflammatorischen Phase ein hohes Risiko zu erwerben, an einer Sekundärinfektion mit Multiorgandysfunktion zu versterben. Bisher ist aber kein therapeutisches, klinisch taugliches Mittel gefunden worden, das während der Immunparalyse wirksam eingreifen kann, um das Überleben der betroffenen Patienten zu verbessern. Daraus ergibt sich konsequenterweise die Forderung, zukünftige wissenschaftliche und therapeutische Bemühungen auf die hypo-inflammatorischen Stadien der Sepsis zu konzentrieren (Scherfold et al. 2008).

Ein möglicher Ansatz, zum Zeitpunkt der Hypoinflammation bzw. der Immunparalyse immunmodulatorisch einzugreifen, ist die Gabe von rekombinantem humanen Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (rhGM-CSF). In einer Reihe von *ex vivo* Studien ist demonstriert worden, dass GM-CSF in der Lage ist, immunologische Dysfunktion von Monozyten bei SIRS,



schwerer Sepsis oder septischen Schock aufzuheben (Rosenbloom et al. 2005, Flohé et al. 2003 und 1999, Williams et al. 1998).

Als nächster logischer Schritt, der aus den Ergebnissen der *in vitro* Studien folgte, wurden *in vivo* Interventionsstudien unter verschiedenen klinischen Bedingungen durchgeführt. Mells et al. konnten 2001 in einer kleinen, nicht kontrollierten Pilotstudie an chirurgischen Patienten zeigen, dass die perioperative Gabe von GM-CSF einer postoperativen Immundepression entgegenwirken kann. Presneill et al. demonstrierten 2002 an einem kleinen, kontrollierten und randomisierten Patientenkollektiv mit schwerer Sepsis und respiratorischer Dysfunktion, dass die Gabe von GM-CSF zu einer Verbesserung des Gasaustauschs und der Leukozytenfunktion führt. Zur Evaluation der Wirkung von GM-CSF in der Phase der Immunparalyse führten Nierhaus et al. 2003 eine prospektive, nicht randomisierte Pilotstudie an Intensivpatienten mit nachgewiesener septischer Immunparalyse durch. Hierbei konnten sie zeigen, dass die Gabe von GM-CSF die Immunkompetenz, reflektiert durch einen signifikanten Anstieg der monozytären HLA-DR Expression und der *ex vivo* TNF $\alpha$  Produktion nach LPS Vollblutstimulation, wiederherstellen kann.

Zum besseren Verständnis der Wirkung, der ablaufenden Mechanismen und der Interaktion mit anderen zellulären und humoralen Faktoren der Immunantwort von GM-CSF sind weitere Studien notwendig. Insbesondere bedarf es prospektiver, kontrollierter und randomisierter Doppelblindstudien mit einem größeren Stichprobenumfang, um die reale Wirkung der eingesetzten Substanz und deren Auswirkungen auf die Morbidität und Mortalität der Sepsis genauer beurteilen zu können.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von rekombinantem humanen GM-CSF auf Faktoren der humoralen Immunantwort bei septischen Patienten mit erworbener Immunparalyse.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten, Ein- und Ausschlusskriterien

Im Rahmen der prospektiven, placebokontrollierten Interventionsstudie sollte die Wirkung von rekombinantem humanen Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (rhGM-CSF) auf die humorale Immunantwort bei Patienten mit Immunparalyse bei Sepsis untersucht werden.

Nach Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer erfolgte der Einschluss des Patientenkollektivs. Es umfasste 32 Patienten zweier operativer Intensivstationen, die konsekutiv eingeschlossen wurden, 16 Patienten in der Verumgruppe und 16 Patienten in der Kontrollgruppe. Der Einschluss erfolgte, wenn die Patienten im Verlauf des Aufenthalts auf den Intensivstationen, entsprechend den Kriterien des „American College of Chest Physicians“ und der „Society of Critical Care Medicine“ (ACCP/SCCM, Bone et al. 1992), Zeichen einer schweren Sepsis bzw. eines septischen Schocks entwickelten. Als Maß für eine kompromittierte zelluläre Immunantwort wurde die monozytäre HLA-DR (humanes Leukozytenantigen-DR) Expression mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Alle Patienten wiesen eine prolongierte Suppression der HLA-DR-Expression über mindestens 48 Stunden auf (HLA-DR  $\leq$  200 MFI (Mean Fluorescence Intensity) Methode nach Nebe 1998). Weitere Voraussetzungen für den Studieneinschluss war ein Altersbereich von 18 bis 75 Jahren, fallende IL 6 Werte und das Vorliegen einer Einwilligungserklärung nach eingehender Aufklärung des Patienten bzw. des richterlich bestellten Betreuers durch den behandelnden Arzt. Ausgeschlossen wurden Patienten bei Vorliegen von Schwangerschaft oder Stillzeit, bei vorbestehenden pathologischen Veränderungen des Immunsystems, wie z.B. durch hämatologische Systemerkrankungen oder durch Autoimmunerkrankungen, Patienten unter

laufender Radio- oder zytotoxischer Chemotherapie sowie Patienten nach Organtransplantationen. Ein weiterer Grund für einen Ausschluss war Überempfindlichkeit gegen rhGM-CSF oder Hilfsstoffe des Verumpräparates (Mannitol, Citrat, NaHCO<sub>3</sub>).

### 2.2 Studienablauf

Der Beobachtungszeitraum umfasste mindestens drei und höchstens 21 Tage und endete mit der Verlegung des Patienten in die Peripherie oder mit dessen Versterben. Beginnend mit dem Einschlusstag, erfolgte pro Patient täglich eine Blutentnahme zur Bestimmung der monozytären HLA-DR Expression, des Plasmaspiegels von GM-CSF, IL 6 und IL 10. Ferner wurden der basale Plasmaspiegel von TNF $\alpha$ , dessen Maximalspiegel nach *ex vivo* Vollblutstimulation sowie der Endotoxinserumspiegel bestimmt. Der täglichen intensivmedizinischen Labor- und Überwachungsroutine wurden die Werte für das CRP, für Leukozyten, für Procalcitonin sowie für die Körpertemperatur entnommen.

Nach erfolgreichem Einschluss wurden die Patienten durch die Krankenhausapotheke anhand einer dort generierten Randomliste entweder der Placebo- oder der Verumgruppe zugeordnet und verblindet. Danach erfolgte die Herstellung der Studienmedikation, die dann in Fertigspritzen bereitgestellt wurde. Die subkutane Applikation von 4 $\mu$ g/kg rhGM-CSF oder eines Placebos (NaCl 0,9%) wurde pro Patient vom Einschlusstag an so lange fortgeführt, bis die HLA-DR-Expression über 500 MFI stieg oder aber der Beobachtungszeitraum beendet war. Fiel der MFI Wert während dieser Zeit wieder unter 200, wurden die rhGM-CSF- bzw. Placebo-Injektionen erneut aufgenommen. Jeder Patient wurde während dieser Zeit kontinuierlich besonders im Hinblick auf lokale oder systemische unerwünschte Medikamentenwirkungen überwacht. Die erhobenen Befunde wurden zeitnah dokumentiert.

Nach Ende des Beobachtungszeitraums der ersten 16 Patienten wurde die Gruppeneinteilung offen gelegt, um so eventuelle Nebenwirkungen der Studienmedikation oder Unterschiede in Bezug auf Morbidität und Mortalität in den beiden Untersuchungsgruppen aufzudecken. Nach Abschluss der Interventionsstudie erfolgte dann die vollständige Entblindung beider Studiengruppen.

Zur Evaluation des Erkrankungsschweregrads wurde für jeden Patienten der Acute Physiology And Chronic Health Evaluation Score II (APACHE II, Knaus et al. 1985) in den ersten 24 Stunden nach Beginn der intensivmedizinischen Behandlung erhoben. Für die Dauer der Studienbeobachtungen wurden ferner der Multiple Organ Dysfunction Score (MODS, Marshall et al. 1995) und der Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA, Vincent et al 1996) bestimmt. Pro Patient wurden die mikrobiologischen Befunde und mögliche nachteilige Ereignisse erfasst, die in Zusammenhang mit der verabreichten Medikation oder des Intensivaufenthalts stehen könnten. Daneben wurden die Länge des intensivmedizinischen Aufenthalts, die 28-Tage-Mortalität, die Intensiv- und die Krankenhaussterblichkeit dokumentiert.

### **2.3 Messung von humanem Leukozytenantigen-DR (HLA-DR)**

Das HLA-DR gehört zur Familie der Major Histocompatibility Complex Klasse II (MHC II) und wird vornehmlich von Makrophagen, Langerhanszellen bzw. dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert. Es dient in erster Linie der Antigenpräsentation und Kommunikation zwischen Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, insbesondere zwischen den CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten. Es ist ein Heterodimer und besteht aus zwei nicht kovalent gebundenen Glykoproteinketten, einer  $\alpha$ -Kette und einer kleineren  $\beta$ -Kette, die die Zellmembran durchspannen. Nach rezeptorvermittelter Internalisierung oder Aufnahme durch Pinozytose und Prozessierung durch die Effektorzellen des

angeborenen Immunsystems werden die MH II-Komplexe mit kurzen Peptiden des Fremdantigens beladen und zur Präsentation an die Zelloberfläche gebracht. Dort reichen 50 - 200 identische HLA-DR-Komplexe für die Stimulierung eine adäquate T-Zell-Antwort aus (Holländer 2006). Die MH II-Komplexe auf Monozyten bzw. Makrophagen stellen ein zentrales Bindeglied zwischen der natürlichen und der adaptiven Immunantwort dar (Hörner et al. 2004).

Gemessen wurde die HLA-DR-Expression mittels Durchflusszytometrie. Ein Durchflusszytometer ist ein optisches Messsystem, das Streulicht und Fluoreszenzsignale einzelner, entsprechend markierter Zellen misst. Die zu messenden Zellen werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert und an einer Messeinheit vorbeigeleitet, nachdem sie durch den gebündelten Strahl einer Laserlichtquelle angeregt wurden. Dieses Verfahren eignet sich grundsätzlich zur Analyse jeglicher sich in Suspension befindender Zellpopulationen. Die Anwendungsmöglichkeiten erstrecken sich von der Bestimmung individueller Zelloberflächenstrukturen, der Differenzierung verschiedener Zellarten bis zur Evaluation von intrazellulären Stoffwechselfvorgängen.

Die erfassten Lichtqualitäten sind die Lichtstreuung und die Zellfluoreszenz. Die Lichtstreuung entsteht, wenn unterschiedliche Zellpopulationen an einer Lichtquelle, in den meisten Durchflusszytometern ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm, einzeln vorbeigeleitet werden und das Licht in einer ihnen jeweils spezifischen Weise brechen. Dabei lässt sich aus der Vorwärtsstreuung des Lichts, axial zum anregenden Laserstrahl, die Zellgröße ableiten und aus der Seitwärtsstreuung, also orthogonal zum ursprünglichen Lasereinfall, die individuelle Granularität bzw. Komplexität. Mittels dieser Messgrößen lassen sich z.B. bereits die verschiedenen Klassen von Leukozyten differenzieren. Fluoreszenzsignale, die zweite erfasste Lichtqualität,

sind kurzlebige Lichtquanten, die entstehen, wenn mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper (Fluorochromen), die an spezifische Zellstrukturen gebunden sind, durch einen Laser angeregt werden. Die so generierten Lichtemissionen haben eine für den individuellen Fluoreszenzfarbstoff spezifische Wellenlänge, die jeweils gemessen werden kann. Dieses Verfahren, die sog. fluoreszierende Zellanalyse (FACS-Analyse: Fluorescence Activated Cell Sorting), ermöglicht eine quantitative Bestimmung von epi- oder intrazellulär lokalisierten Strukturen. Die Fluorochrome werden hierbei mittels einer Antigen-Antikörperreaktion auf oder in die Zelle gebracht, um so die Zielmoleküle zu markieren. Bei beiden Analyseverfahren werden die Lichtsignale mit Hilfe von Photodioden erfasst, gefiltert, aufgetrennt und verstärkt; danach wird durch einen Analog-Digital-Wandler die Lichtintensität in digitale Messwerte konvertiert. Diese quantitativen Analysedaten werden anschließend computergestützt mit einer speziellen Software verarbeitet und grafisch dargestellt.

Jeder Fluoreszenzfarbstoff verfügt über ein individuelles Emissionsspektrum, so dass es möglich ist, verschiedene markierte Strukturen gleichzeitig zu messen. Dabei kann es zur Überlappung der Fluoreszenzspektren der einzelnen eingesetzten Fluorochrome kommen, so dass sie sich nicht scharf genug auftrennen lassen. In diesem Fall ist deshalb eine Korrektur der spektralen Überlappungen mittels einer Kompensationselektronik nötig, die von jedem Signalimpuls die sich überlappenden Anteile entsprechend subtrahiert und dadurch eine differenzierte Betrachtung der einzelnen Fluoreszenzen ermöglicht.

Zur Bestimmung der jeweiligen Zielmerkmale der Zellen müssen spezifische Antikörper aufgebracht werden, die mit einer fluoreszierenden Verbindung konjugiert sind. In der vorliegenden Studie wurden die Fluorochrome Fluorescein (FITC) mit einem Emissionsspektrum von ca. 515 nm und R-Phycoerythrin (PE)

mit einem Emissionsspektrum von ca. 580 nm eingesetzt. Beide Farbstoffe können von einem Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden.

Zur Bestimmung der HLA-DR-Expression mussten die in den Blutproben enthaltenen Monozyten abgetrennt und die MH II-Komplexe an ihrer Oberfläche markiert werden. Zu diesem Zweck wurden 100 µl einer EDTA-Blutprobe pro Patient mit verschiedenen Fluoreszenzantikörpern inkubiert, dann lysiert, zentrifugiert, mit Pufferlösung gewaschen und resuspendiert und der FACS-Analyse zugeführt. Zur Abgrenzung von Monozyten eignet sich deren Oberflächenantigen CD 14 (Cluster of Differentiation 14), ein Lipopolysaccharid-(LPS) Rezeptor, welcher nur auf myelomonocytyären Zellen exprimiert wird. Der hierzu verwendete Fluoreszenzantikörper CD 14 FITC ist ein aus hybridisierten Mäusezellen gewonnener Antigenklon, der durch Monozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis entsprechend geprägt worden ist. Zur Markierung des MH II-Komplexes wurde der Antikörper Anti-HLA-DR PE eingesetzt, ebenfalls ein Mauszellhybrid, der, nach Immunisierung mit humanen B-Zelllymphoblasten, spezifisch an dieses Oberflächenantigen bindet. Hierbei gibt es keine Kreuzreaktivität mit den beiden anderen Komplexen der MHC II Genfamilie HLA-DQ und -DP. Als Negativkontrolle zur Festlegung eines Referenzbereichs für die Fluoreszenz des HLA-DR wurde für den Kontrollansatz an Stelle von Anti-HLA-DR PE der monoklonale Antikörper Ig G1 (Mouse)-PE verwendet. Dieser bindet unspezifisch an verschiedenste antigene Objekte, wie z.B. Zellfragmente. Da die Menge der so gebundenen Fluorochrome auf Grund der kleinen Größe und geringeren Antigendichte der Objekte wesentlich geringer ist als auf Zellen, liegt die Fluoreszenzintensität unter der von entsprechend markierten Monozyten. So werden nur Signalimpulse als valide erfasst, die intensiver leuchten als die des Kontrollansatzes.



Die gemessene Immunfluoreszenzintensität der Anti-HLA-DR PE markierten Proben ist proportional zu der monozytären Expression dieses Oberflächen-Antigens. Der so gemessene Anteil an HLA-DR-positiver Monozyten wird in Prozent erfasst. Dieses quantitative Ergebnis wird als Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) ausgedrückt. Unter standardisierten Bedingungen werden Mittelwerte oberhalb von 250 MFI als normal betrachtet. Werte zwischen 250 bis 150 MFI werden als Übergangsphase zu einer eingeschränkten monozytären Immunfunktion betrachtet und Ergebnisse unter 50 MFI korrelieren mit einer schlechten Prognose für den Patienten (Nebe CT 1998). Daher wurde als Grenze für die Intervention im Rahmen der Studie ein Messwert von 200 MFI festgelegt.

## 2.4 Zytokine

### 2.4.1 Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)

Das in der Studie verwendete rekombinante humane GM-CSF (Leukine<sup>®</sup>, Wirkstoff: Sargramostim) wurde subkutan in einer Dosis von 4µg/kg appliziert. Zur Evaluation der GM-CSF-Plasmaspiegel wurden pro Patient täglich EDTA-Plasmaproben gewonnen, zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und in Reaktionsgefäßen (Reaktionsgefäße safe lock 1,5 ml biopur von der FA Eppendorf) asserviert, die bei minus 80° Celsius zur späteren Bestimmung tiefgefroren wurden. Hierzu wurde ein kommerzielles Assay (Quantikine<sup>®</sup>, R&D Systems, Minneapolis, USA) eingesetzt, das mit quantitativer Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik operiert.

#### 2.4.1.1 Material

Die verwendeten Materialien und Reagenzien pro Testkit sind im Einzelnen:

- GM-CSF Mikrotiterplatte - eine Polystyrenplatte, die zwölf Reihen mit acht „wells“ trägt, die jeweils mit monoklonalen Antikörpern (Maus) gegen GM-CSF beschichtet sind.
- Selbstklebende Platten Abdeckfolien.
- GM-CSF Konjugat – ein polyklonaler Antikörper (Ziege) gegen GM-CSF, der mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist.
- GM-CSF Standard – eine gefriergetrocknete Reagenz aus rhGM-CSF in einer gepufferten Protein Base.
- Assay Diluent RD1-16 – eine gepufferte Proteinbase mit Konservierungsmitteln.
- Calibrator Diluent RD6L – ein Lösung aus Tiereserum mit Konservierungsmitteln für Serum- und Plasmaproben.
- Waschpufferkonzentrat – 25fach konzentrierte gepufferte Tensidlösung (0,05% Tween<sup>®</sup> 20 in PBS) mit Konservierungsmitteln.
- Farbreagenz A – stabilisiertes Wasserstoffperoxid.
- Farbreagenz B – stabilisiertes Chromogen aus Tetramethylbenzidin.
- Stopp-Lösung – Schwefelige Säure.
- Elisa Reader Dynatech<sup>®</sup> MR 5000 (Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, VA, USA).

### 2.4.1.2 Methode

Der benutzte ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) verwendet GM-CSF-spezifische monoklonale Antikörper aus der Maus, die auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht wurden und die in den Proben oder in der Standardreihe enthaltene Zytokine binden. Zur Herstellung einer Standardreihe wurde zunächst das gefriergetrocknete rhGM-CSF mit Calibrator Diluent RD6L in Lösung gebracht. Die Standardlösung enthält 500 pg/ml GM-CSF, mit der dann eine Standardverdünnungsreihe von 500 pg/ml bis 0 pg/ml (Calibrator Diluent RD6L als Nullstandard) mit einem Volumen von jeweils 500 µl

hergestellt wurde. Zur weiteren Vorbereitung wurden 20 ml des Waschpufferkonzentrats mit 500 ml destilliertem Wasser verdünnt und die Farbreagenzien zu gleichen Teilen gemischt. Hierbei war zu beachten, dass der Farbstoff vor Lichtexposition geschützt blieb. Zur Durchführung des Assays wurden zunächst 100 µl des Assay Diluent RD1-16 in jeden „Proben – Well“ vorgelegt. Danach wurden entsprechend dem vorbereiteten Pipettierschema jeweils zwei „Wells“ - entweder 100 µl der Standardverdünnung oder der Patientenplasmaproben - zugefügt und mit der Klebefolie abgedeckt. Im Anschluss wurde die befüllte Mikrotiterplatte für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde jeder „Well“ viermal gründlich mit 400 µl Waschpuffer ausgewaschen und danach zum Abtropfen kurzzeitig umgekehrt auf ein Zellstofftuch gestellt. Im nächsten Schritt wurden pro „Well“ 200 µl GM-CSF-Konjugat zugefügt und wiederum zugedeckt für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im anschließenden Waschvorgang wurde wie im ersten Schritt verfahren. Danach wurde jeweils 200 µl der Substratlösung zugegeben, um im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Durch Hinzugabe von 50 µl Stopp – Lösung wurde die Enzymreaktion nach Ablauf der Inkubationszeit unterbrochen. Zur Bestimmung der Extinktion wurde die Platte innerhalb der anschließenden 30 Minuten in den Elisa Reader (Dynatech® MR 5000, Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, VA, USA) gestellt und bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Eine Wellenlängenkorrekturmessung, zum Ausschluss von Messabweichungen durch optische Verunreinigungen wurde mit einer Wellenlänge von 570 nm durchgeführt. Die ermittelte optische Dichte der Proben ist proportional der Menge an gebundenem GM-CSF.

Die Auswertung der Messergebnisse wurde mit Hilfe der Readersoftware (BioLinx® 2.20, Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, VA, USA) durchgeführt. Zunächst wurde der Mittelwert der jeweiligen Doppelmessungen für Standard, Kontrolle und Patientenprobe gebildet sowie der Nullstandard von den

Ergebnissen subtrahiert. Danach wurden eine logarithmische Standardkurve erstellt und die Konzentrationen ebenfalls logarithmisch gegen die Messerergebnisse für die optische Dichte aufgetragen.

### **2.4.2 Tumornekrosefaktor Alpha (TNF $\alpha$ ), basal und stimuliert**

Im Rahmen der Studie sollten täglich zum einen die basalen TNF $\alpha$ -Plasmaspiegel und zum anderen die *ex vivo* maximal stimulierbare Ausschüttung von TNF $\alpha$ , als Maß für die Reaktionsfähigkeit besonders von Monozyten bzw. Makrophagen (Höflich et al. 2002), bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden täglich heparinisierte Vollblutproben gewonnen, zentrifugiert, der Plasmaüberstand wurde abpipettiert und zur späteren Bestimmung der basalen TNF $\alpha$ -Spiegel bei -80° C eingefroren. Zur *ex vivo* Stimulation wurden 50  $\mu$ l der Vollblutproben mit 450  $\mu$ l einer LPS - Stimulationlösung (500 pg/ml Lipopolysaccharide, Ex-vivo Stimulationsskit Milena<sup>®</sup>, DPC Biermann, Bad Nauheim) für vier Stunden bei 37° C inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation wurde ein Überstand gewonnen und ebenfalls der Diagnostik zugeführt. Die Bestimmung der Proben wurde mittels des semiautomatischen Elisas Immulite<sup>®</sup> für TNF $\alpha$  (DPC Biermann, Bad Nauheim) durchgeführt. Die methodische Grundlage bildet ein Chemilumineszenz-Immunoassay, welcher im Vergleich zu herkömmlichen Elisa-Verfahren deutlich weniger Zeit benötigt und eine Standardisierung der Ergebnisse ermöglicht. Zur Bestimmung werden Teströhrchen verwendet, die eine antikörperbeschichtete Kunststoffkugel enthalten und als Gefäß für die Inkubation und Signalentwicklung sowie für die einzelnen Waschschriffe genutzt werden können. Das neuartige Chemilumineszenzsubstrat Adamantyl-dioxetanphenylphosphat leuchtet durch fortlaufende Hydrolyse über einen langen Zeitraum und ermöglicht wiederholte Messungen. Dadurch konnte die Messgenauigkeit im Vergleich zu konventionellen Elisas deutlich verbessert werden. Darüber hinaus verfügt das zur Signalerfassung verwendete Luminometer Immulite<sup>®</sup> (DPC Biermann, Bad Nauheim) über einen Graufilter

zur Abschwächung hoher Signalintensitäten, der bei schwachen Lichtsignalen ausgeschaltet werden kann. Dadurch wird das Messspektrum erweitert und schwache Lichtsignale können detektiert werden. Der Normwert für TNF $\alpha$  wird in der Test-Kit begleitenden Literatur mit bis 8,1 pg/ml angegeben.

### **2.4.3 Interleukin 10 (IL 10)**

Auch im Fall von IL 10 sind die Plasmaüberstände aus zentrifugierten Vollblutproben zur späteren Bestimmung in Safe Lock Reaktionsgefäßen bei -80° C asserviert worden. Die Bestimmung des Plasmaspiegels erfolgte ebenfalls mit Hilfe des semiautomatischen Elisas Immulite<sup>®</sup> (DPC Biermann, Bad Nauheim). Der Medianreferenzwert, der mittels einer Studie des Herstellers an gesunden Probanden ermittelt wurde, liegt bei 1,5 pg/ml.

### **2.4.4 Interleukin 6 (IL 6)**

Mit den Plasmaproben des IL 6 ist analog zu den oben genannten Zytokinen verfahren worden. Die Quantifizierung der Plasmaspiegel erfolgte auch in diesem Fall mit einem Chemilumineszenz-Immunoassay (Immulite<sup>®</sup> der Firma DPC Biermann, Bad Nauheim). Der Normwert der IL 6-Konzentration im Serum liegt unter 11 ng/l.

### **2.4.5 Das C-reaktive Protein (CRP)**

Pro Patient wurde täglich im Rahmen der intensivmedizinischen Laborroutine das CRP als Verlaufsparemeter bestimmt.

Die Bestimmung in der klinischen Routinediagnostik erfolgt mittels Immunturbidimetrie, einem der Nephelometrie und Photometrie verwandten Verfahren, das über Trübungsmessung eine quantitative Bestimmung von kolloidal gelösten Teilchen in Flüssigkeiten erlaubt. Je nach Labor liegt der Referenzbereich bei  $\leq 5$  mg/dl.

### **2.4.6 Procalcitonin (PCT)**

Die Bestimmung von PCT wurde pro Patient ebenfalls im täglichen Routinelabor durchgeführt.

Die Messung des PCT erfolgte mit dem LUMItest PCT<sup>®</sup> (Brahms Diagnostica GmbH, Berlin), einem immunoluminometrischen Assay (ILMA). Dabei wird Serum mit zwei spezifischen monoklonalen Antikörpern zusammengebracht, die sich an verschiedene Stellen des PCT-Moleküls, den Calcitonin- und den Katalcalcin-Anteil, binden. Der Calcitonin-Antikörper ist mit einem lumineszierenden Tracer gekoppelt, der Katalcalcin-Antikörper hingegen ist an der Wand des Teströhrchens fixiert (Coated Tube System). Während der Inkubationszeit kommt es so zur Ausbildung so genannter Sandwich-Komplexe zwischen Antigen und den Antikörpern. Nach Ende der Reaktionszeit wird die überschüssige Tracerlösung ausgewaschen. Die danach an der Röhrchenwand verbliebene antigengebundene Tracermenge wird dann in einem geeigneten Luminometer unter Einsatz einer Reaktionslösung ermittelt. Die Stärke des Lumineszenzsignals (in RLU, relative light unit) ist der in der jeweiligen Serumprobe enthaltenen PCT-Konzentration direkt proportional. Die genauen Konzentrationen des Prohormons werden anhand einer Standardkurve bekannter Konzentrationen abgelesen.

### **2.5 Leukozyten**

Ein weiterer täglich routinemäßig erfasster Laborparameter war die Leukozytenanzahl.

Gemessen wurden die Leukozytenzahlen mit Hilfe von Streulicht- oder Impedanzmessungen im Zellcounter. Die Normwerte für Erwachsene werden in der Literatur mit 4800 bis 10 000 /  $\mu\text{l}$  angegeben.

## **2.6 Erhebung der klinischen Scores und Erfassung der Infektionen**

Zur Erfassung und Abschätzung des Schweregrads von Erkrankungen sind in den letzten 20 Jahren verschiedene sog. Score-Systeme in die klinische Praxis eingeführt worden. In der vorliegenden Studie wurden zur Bewertung des Krankheitsschweregrads und des Mortalitätsrisikos der Patienten der Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II (APACHE II) Score erhoben. Dies ist ein in der Intensivmedizin häufig verwendetes und gut validiertes prädiktives Punktwertsystem.

Der Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (APACHE) wurde 1981 von Knaus et al. erstmals eingeführt. Die heute verwendete modifizierte Version (APACHE II) von 1985 besteht aus drei Teilbereichen. Im ersten Teil wird auf der Basis von zwölf verschiedenen physiologischen und laborchemischen Parametern ein Punktwert zwischen null (Normalwert) und vier (schlechtester Wert) bestimmt. In den Teilen zwei und drei werden das Alter der Patienten bzw. etwaige chronische Vorerkrankungen ebenfalls mit einem Punktwert erfasst. Die Datenerhebung erfolgt innerhalb der ersten 24 Stunden des intensivstationären Aufenthalts, bei der jeweils der schlechteste Wert, der innerhalb dieses Zeitraums ermittelt wurde, in den Score einfließt. Die Prognosefähigkeit von APACHE II bezüglich der Mortalität wurde in einer multizentrischen Studie mit einem Kollektiv von 6000 Intensivpatienten validiert.

Zur Erfassung und Beurteilung des klinischen Verlaufs wurden in der vorliegenden Studie neben dem oben genannten prädiktiven Score zwei weitere Punktwertsysteme herangezogen, zum einen der Multiple Organ Dysfunction Score (MODS) und zum anderen der Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score. Beide Scores wurden entwickelt, um bei verschiedenen Patienten eines Kollektivs den individuellen Schweregrad eines

Multiorganversagens sowohl zeitlich punktuell als auch im jeweiligen Verlauf der Erkrankung objektiv miteinander vergleichen zu können.

J.C. Marshall et al. stellten den MODS 1995 erstmals vor. Mit diesem Score werden die Funktion und damit der Zustand von sechs verschiedenen Organsystemen erfasst. Dabei werden jeweils zu einem bestimmten Zeitpunkt innerhalb von 24 Stunden die individuellen Parameter der Organfunktion erhoben und mit einem Punktwert zwischen null (normale Funktion) und vier (maximal schlechte Funktion) bewertet. Die Grenzen für die Bewertung der Organfunktion wurden von Marshall et al. mit Hilfe einer retrospektiven Literatur-Analyse entwickelt und bezüglich der Aussagekraft über Mortalität anhand eines Patienten-Kollektivs validiert. In einer 1997 von Marshall et al. durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass ein steigender MODS-Punktwert sowohl mit einem verlängerten Intensivaufenthalt als auch mit einer erhöhten Intensiv- und Krankenhausmortalität korreliert.

Der SOFA-Score wurde von J. L. Vincent et al. im Rahmen einer Arbeitsgruppe der European Society of Intensive Care Medicine entworfen und 1996 veröffentlicht. Es sollte ähnlich wie bei dem MOD-Score eine Methode geschaffen werden, mit deren Hilfe man den Schweregrad und Verlauf einer Organdysfunktion oder eines Organversagens objektiv beurteilen und darstellen konnte. Der SOFA-Score bezieht sich auf die Funktion der gleichen sechs Organsysteme wie der MODS. Das sind im Einzelnen Atmung, Herz-Kreislauf-System, Leber- und Nierenfunktion, Gerinnung sowie das Zentralnervensystem. Es werden ebenfalls Punktwerte zwischen null (relativ normale Funktion) und vier (Organversagen) vergeben, aus deren Summe sich dann pro Tag des Intensivaufenthalts der Gesamt-Score errechnet.

Alle in der vorliegenden Studie erhobenen Scorewerte wurden mit Hilfe des „Hamburg Intensive CAre Scoring Tool“ (HICAST<sup>®</sup>) ermittelt und berechnet. Es



ist ein Datenerfassungsprogramm, das die Eingabe aller den Scores zugrunde liegenden Parameter entscheidend erleichtert, da die gemeinsamen Parameter nur einmal erfasst werden müssen und so die Ermittlung der jeweiligen Gesamtpunktwerte schneller erfolgen kann.

Neben den oben genannten Scores wurden die in der Intensivmedizin üblichen Parameter der Vitalfunktion mit Hilfe eines auf den Intensivstationen etablierten Patientendatenerfassungssystems (CIS<sup>®</sup> bzw. WinCIS<sup>®</sup>, CliniComp, Intl., San Diego, USA) dokumentiert. Die Erfassung erfolgte zeitnah speziell im Hinblick auf eventuelle lokale oder systemische Nebenwirkungen der Studienmedikation. Im Besonderen wurden die Laborergebnisse für Leuko- und Thrombozyten im Verlauf betrachtet und eine Leukozytose oder Thrombozytopenie im Sinne der allgemein üblichen Referenzbereiche gesondert dokumentiert.

Für jeden Patienten wurden im Beobachtungszeitraum die der Sepsis zugrunde liegende Infektion und die mikrobiologischen Befunde im Verlauf mit den jeweiligen Untersuchungsmaterialien dokumentiert. Grundlage für die Definition von Infektionen in der Studienpopulation bildeten die CDC-Kriterien für nosokomiale Infektionen des Robert-Koch-Instituts in Berlin von 2003. Dort ist eine nosokomiale Infektion definiert als eine Reaktion des Körpers auf das Vorhandensein von Mikroorganismen oder ihrer Toxine mit lokalen oder systemischen Infektionszeichen. Dabei dürfen keine Hinweise darauf existieren, dass die Infektion bereits bei der Aufnahme ins Krankenhaus bestand oder in der Inkubationsphase war. Die Diagnose einer Infektion stützt sich auf klinische Befunde, die durch Beobachtung oder Untersuchung des Patienten und durch radiologische, laborchemische oder mikrobiologische Diagnostik gewonnen wurden. Hierbei sind die Art und Anzahl der Befunde für jedes infizierte Organsystem genau definiert. Die CDC-Kriterien gelten für alle Infektionen und sind unabhängig vom Alter oder Immunstatus des Patienten. Lediglich für

Kinder unter einem Jahr, auf Grund einer abweichenden Symptomatik in diesem Alter, gelten zusätzliche Definitionen. Diese spielten entsprechend der Einschlusskriterien in der vorliegenden Studie keine Rolle. Die pro Patient erhobenen Befunde wurden wie auch schon im Fall der Vitalfunktion mit Hilfe des Patientendatenerfassungssystems dokumentiert.

### **2.7 Statistik**

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe von SPSS 11.0 für Windows (SPSS<sup>®</sup> Inc. Chicago, Illinois, USA). Die demographischen Daten wurden mittels Bestimmung des Mittelwerts, des Medians oder des prozentualen Anteils an der Gesamtanzahl ausgewertet. Zur Bestimmung der Verteilungswahrscheinlichkeit wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test angewendet. Je nach Ergebnis der Verteilungswahrscheinlichkeit wurden dann zur Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit „p“ der t-Test oder der U-Test nach Mann, Whitney und Wilcox angewendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Demographie

In einem Zeitraum von zwölf Monaten wurden 32 Patienten, welche die vor Studienbeginn aufgestellten Einschlusskriterien erfüllten (siehe Abschnitt 2.1 Material und Methoden), konsekutiv in die Untersuchung eingeschlossen.

Die nachstehende Tabelle gibt die demographischen Daten der Studienpatienten wieder, aufgeschlüsselt in die Verum- und die Placebogruppe bzw. die Gesamtanzahl. Ferner ist die Irrtumswahrscheinlichkeit „p“ aufgeführt.

**Tab. 03:** Demographie

	rhGM-CSF (n = 16)	Placebo (n = 16)	Gesamt (n = 32)	p-Wert
Geschlecht (♂/♀)	11/5	14/2	25/7	0,4
Median Alter (Spanne)	55 (32-67)	55 (22-71)	55 (22-71)	0,8
Median Dauer Intensiv- aufenthalt in Tagen (Spanne)	22 (2-128)	35 (10-218)	27 (2-218)	0,1
Median HLA-DR- Expression [MFI] bei Einschluss (Spanne)	93 (17–352)	73 (28-261)	84 (17-352)	0,6
Intensivstationssterblichkeit	7/16 (44%)	5/16 (31%)	12/32 (38%)	0,7
Krankenhaussterblichkeit	7/16 (44%)	5/16 (31%)	12/32 (38%)	0,7
Median APACHE II (Spanne)	17 (10-25)	17 (4-21)	17 (4-25)	0,4

rhGM-CSF = recombinant human Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor

HLA-DR = Human Leukocyte Antigen DR

MFI = Mean Fluorescence Intensity

APACHE II = Acute Physiology And Chronic Health Evaluation

Im Hinblick auf die Demographie gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verum- und der Placebogruppe. Das Gleiche gilt für die Betrachtung der Gruppen der Überlebenden und Nicht-Überlebenden. Insgesamt überwog der Anteil an männlichen Patienten im Kollektiv. Dies stand jedoch in keinem Zusammenhang mit einem Überlebensvorteil. Das Alter lag im Median bei 55 Jahren, wobei sich die Spanne in der Verum- und Placebogruppe nur unwesentlich unterschied. Die Dauer des Intensiv-aufenthalts betrug im Median 27 Tage mit einer Spanne von zwei bis 218 Tagen. Zwar war die Aufenthaltsdauer in der Placebogruppe mit zehn bis 218 Tagen deutlich länger, jedoch erreichte dies keine statistische Signifikanz. Die Expression von HLA-DR auf Monozyten lag am Einschlusstag im Median bei einem 84 MFI ohne signifikantem Unterschied in den jeweiligen Gruppen des Studienkollektivs. Sowohl die Intensivsterblichkeit als auch die Gesamtsterblichkeit des Studienkollektivs betrug zwölf von 32 Patienten, das entspricht einem Anteil von 38 %. Der Median des APACHE II Scores betrug 17 bei einer Spanne von vier bis 25. Diese Punktwerte entsprechen einer zu erwartenden Mortalitätswahrscheinlichkeit bis zu 50 %.

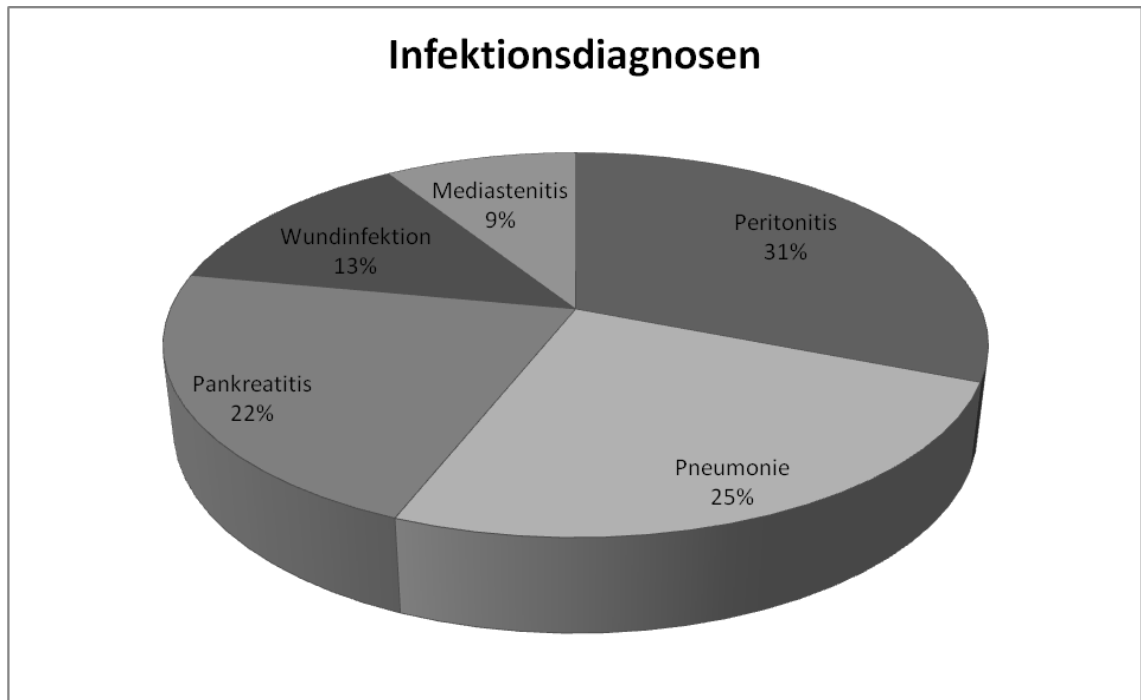
Die nachfolgende Tabelle stellt die Diagnosen, die zur Aufnahme auf die Intensivstationen geführt haben, sowie die Art der Infektion mit dem jeweiligen isolierten Erreger dar. Ferner gibt die Tabelle die Reihenfolge und die Verteilung der einzelnen Patienten auf die Verum- bzw. Placebogruppe wieder.

Tab. 04: Aufnahme Diagnosen und Infektiologie

Patient Nummer	Verum	Intensivstation- Aufnahme diagnose	Infektionsdiagnose (isolierter Erreger)
1	Nein	Rektumperforation	Peritonitis ( <i>Escherichia coli</i> )
2	Nein	Polytrauma	Pneumonie ( <i>Aspergillus</i> , <i>Enterokokken</i> )
3	Ja	Pankreato- gastrektomie	Peritonitis ( <i>Proteus</i> , <i>Klebsiellen</i> , <i>Escherichia coli</i> )
4	Ja	Bronchialkarzinom, Z.n. Teilpneumektomie	Pneumonie ( <i>Stenotrophomonas</i> )
5	Ja	Pankreatitis	Pankreatitis ( <i>Candida</i> )
6	Nein	Peritonitis	Peritonitis ( <i>Candida</i> , <i>Staphylokokken</i> )
7	Nein	Polytrauma	Wundinfektion ( <i>Pseudomonas</i> , <i>Aspergillus</i> )
8	Ja	Peritonitis	Peritonitis ( <i>Proteus</i> , <i>Klebsiellen</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida</i> )
9	Nein	Ösophaguskarzinom	Wundinfektion ( <i>Citrobacter</i> )
10	Ja	Mediastinitis	Mediastinitis ( <i>Staphylokokkus aureus</i> , <i>Candida</i> )
11	Nein	Pankreatitis	Pankreatitis ( <i>Candida</i> , <i>Enterokokken</i> )
12	Ja	Pankreatitis	Pankreatitis ( <i>Enterokokken</i> , <i>Pseudomonas</i> )
13	Ja	Akutes Abdomen	Peritonitis ( <i>Candida</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> )
14	Nein	Polytrauma	Wundinfektion ( <i>Streptokokken</i> , <i>Clostridien</i> , <i>Bacillus spec.</i> )
15	Nein	Magenperforation	Peritonitis ( <i>Candida</i> )
16	Ja	Pankreatitis	Pankreatitis ( <i>Proteus</i> )
17	Nein	Pankreatitis	Peritonitis ( <i>Escherichia coli</i> )
18	Nein	Pankreatitis	Pankreatitis ( <i>Candida</i> )
19	Ja	Polytrauma	Pneumonie ( <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> )
20	Ja	Duodenalperforation	Peritonitis ( <i>Enterokokken</i> , <i>Proteus</i> )

Patient Nummer	Verum	Intensivstation- Aufnahmediagnose	Infektionsdiagnose (isolierter Erreger)
21	Nein	Pankreatitis	Pankreatitis ( <i>Citrobacter</i> )
22	Ja	Mediastinitis	Mediastinitis ( <i>Staphylokokken</i> )
23	Ja	Pankreatitis	Pankreatitis ( <i>Pseudomonas, Candida</i> )
24	Nein	Perimandibulärer Abszess	Wundinfektion ( <i>Staphylokokken,</i> <i>Corynebakterium</i> )
25	Ja	Pleuramesotheliom	Mediastinitis ( <i>Enterokokken, Candida</i> )
26	Nein	Peritonitis	Peritonitis ( <i>Escherichia coli, Candida,</i> <i>Enterokokken</i> )
27	Ja	Ösophaguskarzinom	Pneumonie ( <i>Staphylokokken,</i> <i>Corynebakterium</i> )
28	Nein	Polytrauma	Pneumonie ( <i>Klebsiellen</i> )
29	Ja	Polytrauma	Pneumonie ( <i>Proteus, Serratia</i> )
30	Nein	Trachealstenose	Pneumonie ( <i>Klebsiellen, Pseudomonas,</i> <i>Candida</i> )
31	Nein	Z.n. ACVB und gastrointestinale Blutung	Pneumonie ( <i>Enterokokken, Candida</i> )
32	Ja	Akutes Abdomen	Peritonitis ( <i>Klebsiellen, Candida, Proteus</i> )

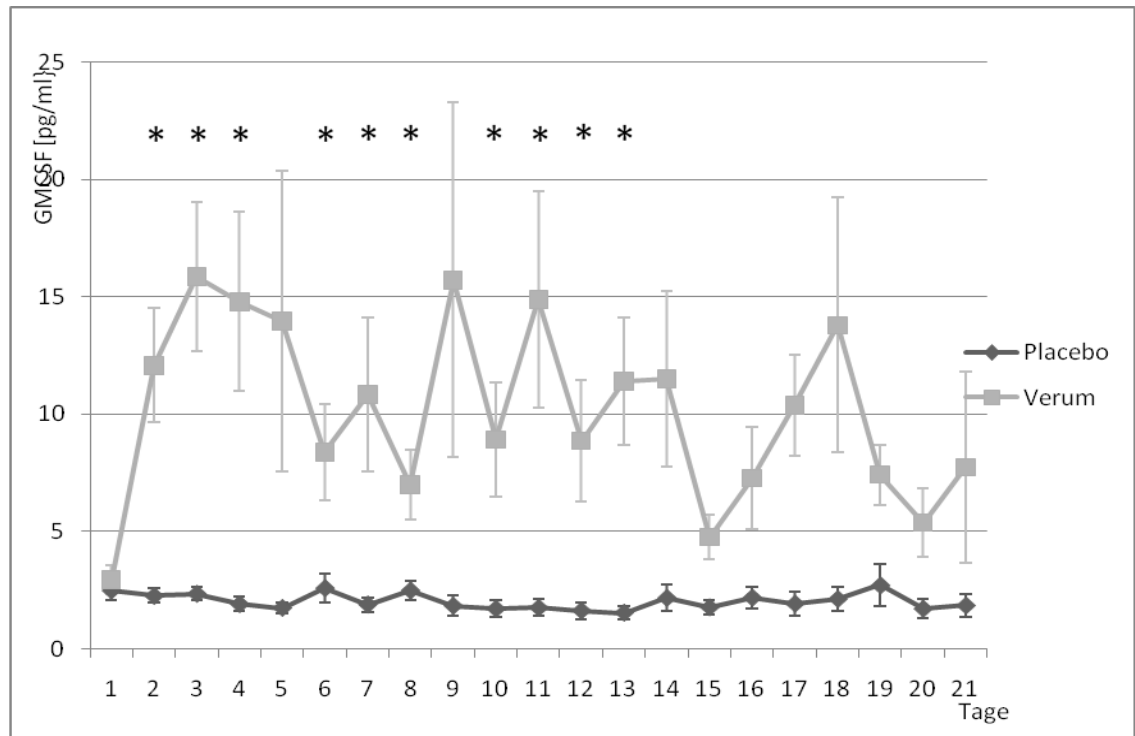
Die fünf Hauptdiagnosen wurden auf Grundlage der CDC-Kriterien für nosokomiale Infektionen des Robert-Koch-Instituts von 2003 gestellt (für Definitionen siehe Kapitel „Material und Methoden“). 31% der Patienten litten an einer Peritonitis, 25% an einer Pneumonie, 22% an einer Pankreatitis, gefolgt von 13% der Patienten mit einer Pankreatitis und schließlich 9 % mit einer Mediastinitis. Das folgende Diagramm stellt die Verteilung der Infektionsdiagnosen innerhalb des Studienkollektivs graphisch anschaulich dar.



**Abb. 03:** Verteilung der Infektionsdiagnosen

### 3.2 Ergebnisse – Granulozyte Macrophage Colony Stimulating Factor

Der GM-CSF Plasmaspiegel steigt in der Verumgruppe mit Beginn der Intervention auf jederzeit deutlich erhöhte Werte mit wiederholten Spitzenmessungen bis 16 pg/ml im Mittel an. Im Gegensatz dazu findet sich in der Placebogruppe ein relativ gleichmäßiger Zytokinspiegel, der sich im Mittel um 2 pg/ml bewegt. Dies dürfte dem endogen ausgeschütteten GM-CSF entsprechen. Es fand sich an den Tagen 2 bis 4 und 6 bis 8 sowie 10 bis 13 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten der Patienten, die täglich GM-CSF erhielten, und denen der Kontrollgruppe. An den Tagen 5 und 9 fanden sich zwei „Ausreißer“ bei dem selben Patienten aus der Verumgruppe. Das folgende Diagramm zeigt den GM-CSF Serumspiegel im Verlauf des Studienzeitraums von 21 Tagen. Die Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  sind mit einem Stern gekennzeichnet.



**Abb. 04:** Mittelwerte und Standardfehler von GM-CSF Plasmaspiegel.

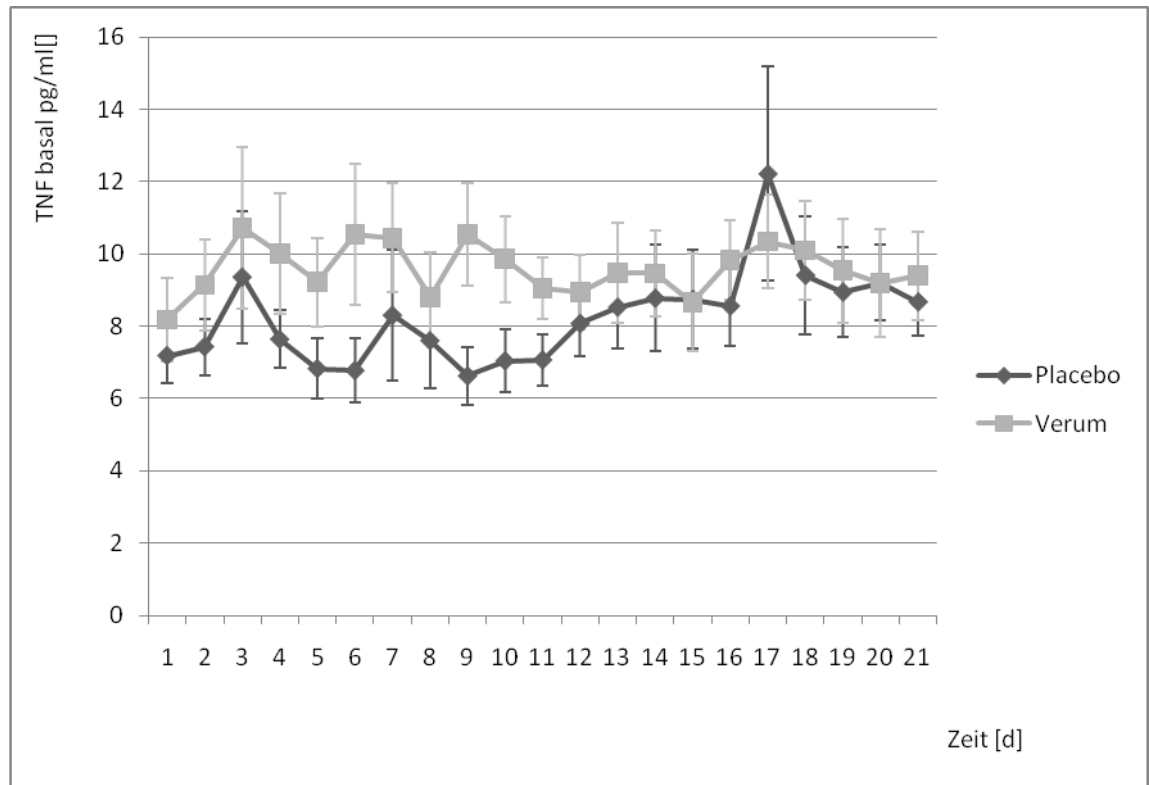
\*:  $p < 0.05$  Placebo vs. Verum.

### 3.3 Ergebnisse – Tumornekrosefaktor Alpha, basal und stimuliert

Die Werte des basalen, das heißt nicht exogen stimulierten  $\text{TNF}\alpha$ -Spiegels, zeigten über die Zeit in der Verumgruppe mit Mittelwerten von 8 bis 11 pg/ml einen fast immer höheren Verlauf. Die Placebogruppen-Messwerte bewegten sich im Mittel zwischen 7 und 9 pg/ml. Lediglich an Tag 17 fand sich mit 12 pg/ml ein einmalig deutlicher erhöhter Wert, der den Kurvenverlauf sichtbar beeinflusst. Zwischen den beiden Patientengruppen bestand kein statistisch signifikanter Unterschied.

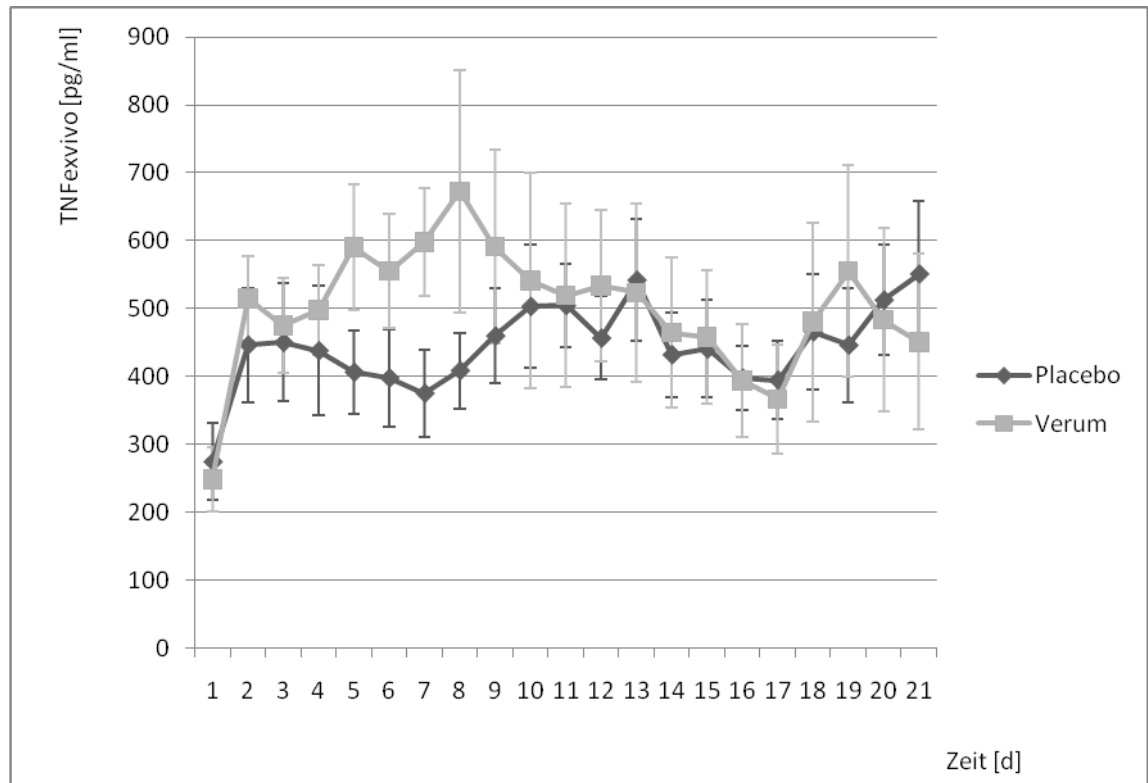
Das nachfolgende Diagramm zeigt den Verlauf der Messwerte beider Gruppen im Untersuchungszeitraum.





**Abb. 05:** Mittelwerte und Standardfehler des basalen TNF $\alpha$ -Plasmaspiegels.

Im Hinblick auf die Plasmaspiegel von TNF $\alpha$  nach *ex vivo* Vollblutstimulation mit Lipopolysaccharid fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der Verum- und der Kontrollgruppe. Augenfällig war jedoch, dass die Werte der Verumgruppe in der ersten Woche deutlich höhere Werte bis 673 pg/ml im Mittel zeigten, um sich dann im Verlauf dem Spiegel der Kontrollgruppe anzunähern und sogar darunter zu fallen.

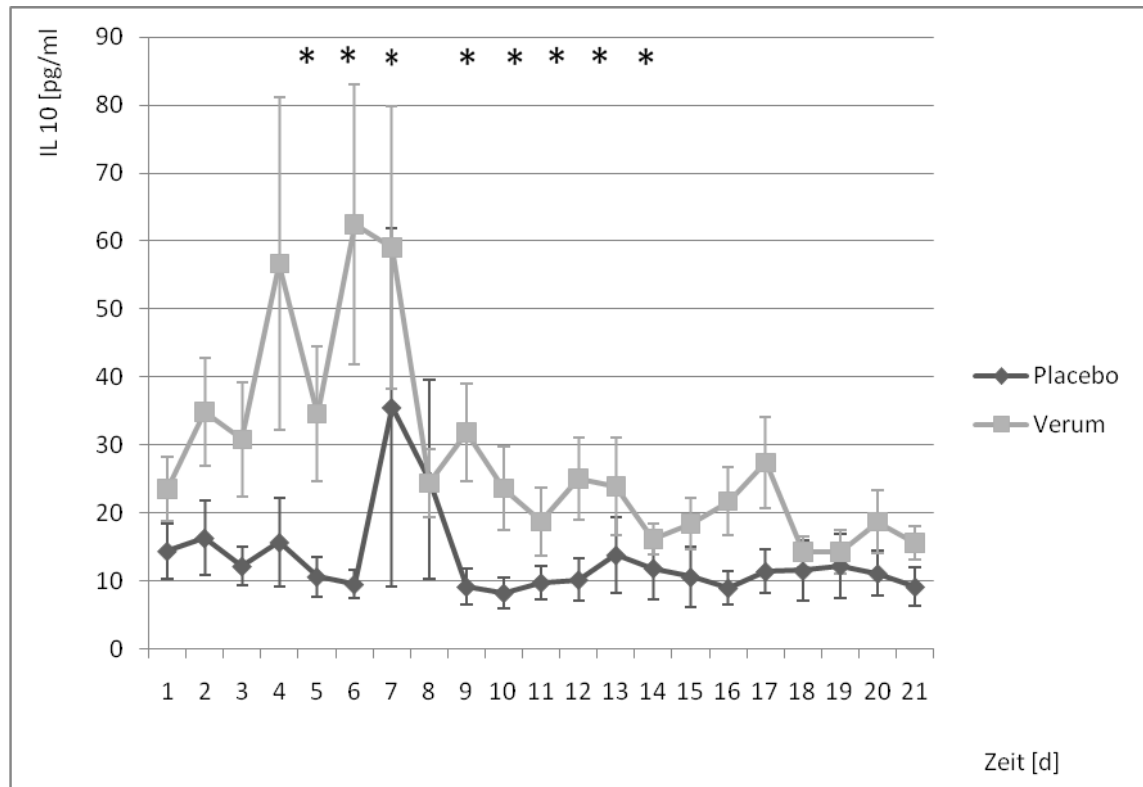


**Abb. 06:** Mittelwerte und Standardfehler der TNF $\alpha$ -Plasmaspiegel nach *ex vivo* Vollblutstimulation mit Lipopolysaccharid.

### 3.4 Ergebnisse – Interleukin 10

Der Plasmaspiegel des Zytokin IL 10 zeigte über die ersten acht Tage des Studienzeitraums im Gegensatz zur Kontrollgruppe in der Verumgruppe deutlich erhöhte Messwerte. Diese fielen dann im weiteren Verlauf wieder ab und näherten sich dem Niveau der Kontrollgruppe, ohne dies jedoch zu erreichen. Die Spanne der Verum-Mittelwerte erstreckte sich von 14 pg/ml bis 62 pg/ml. Auffällig war, dass einige Patienten in dieser Gruppe wiederholt zu ausgeprägten Konzentrationsschwankungen des IL 10 neigten. Ob es sich hierbei um falsch hohe Messwerte handelt, bleibt zu diskutieren. In der Kontrollgruppe fanden sich an Tag 7 und 8 bei dem gleichen Patienten zwei „Ausreißer“, die in der graphischen Darstellung der Ergebnisse gut nachzuvollziehen sind. Sonst zeigte der Plasmaspiegel im Verlauf ein eher

stabiles Niveau mit Werten zwischen 9 und 16 pg/ml. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Patientengruppen zeigte sich an den Tagen 5 bis 7 und 9 bis 13. Im folgenden Diagramm sind diese Werte mit einem Stern gekennzeichnet.



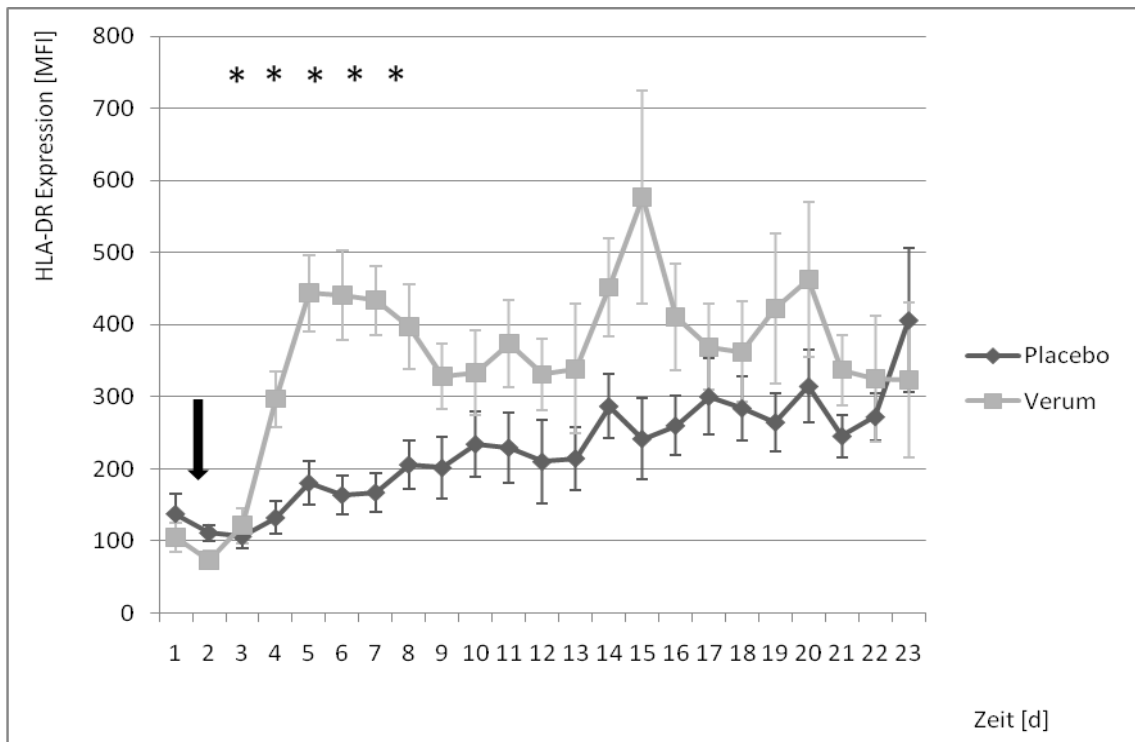
**Abb. 07:** Mittelwerte und Standardfehler der IL10-Plasmaspiegel. \*:  $p < 0.05$  Placebo vs. Verum.

### 3.5 Ergebnisse – Routineimmunparameter

Im Rahmen der Studienroutinediagnostik wurden Werte für die Expression von HLA-DR auf Monozyten, IL 6 mit gleichzeitiger Berechnung des IL 6/IL 10 Verhältnisses, PCT sowie die klassischen Entzündungsparameter CRP und die Zahl der Leukozyten erhoben.

Die Expression des monozytären Oberflächenmarkers HLA-DR, als Maß für die zelluläre Immunkompetenz zeigte an den Tagen 2 bis 6 einen signifikanten

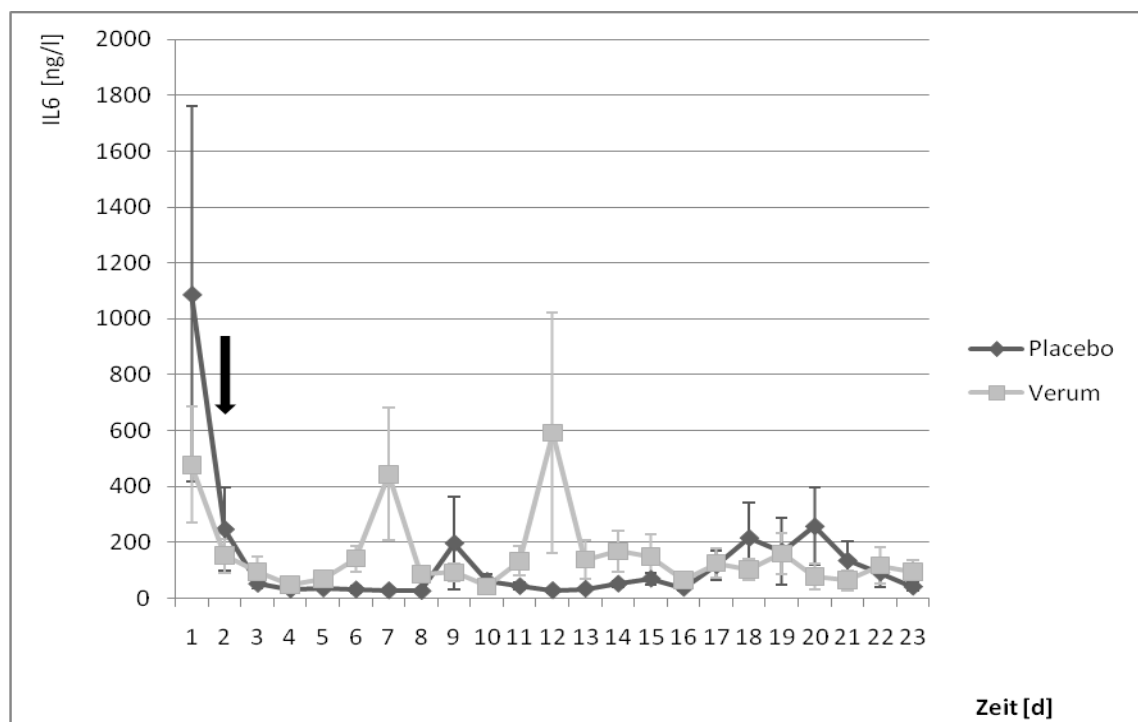
Unterschied zwischen der Verum- und Placebogruppe. Ab Tag 3 zeigten die Messungen in der Verumgruppe für den Verlauf der ersten 9 Tage einen deutlichen Anstieg im Verhältnis zur Kontrollgruppe, um sich dann in der verbleibenden Zeit der anderen Kurve wieder anzunähern. Der Spitzenmittelwert an Tag 13 lässt sich durch einen „Ausreißer“ bei einem einzelnen Patienten erklären. Das langsame, aber stetige Steigen der gemittelten Messwerte in der Kontrollgruppe reflektiert die spontane Erholung der Immunkapazität, ausgedrückt durch eine gestiegene Expression von HLA-DR.



**Abb. 08:** Mittelwerte und Standardfehler der HLA-DR Expression auf Monozyten. \*:  $p < 0.05$  Placebo vs. Verum. Der Pfeil bezeichnet den Zeitpunkt der ersten GM-CSF/Placebo Gabe.

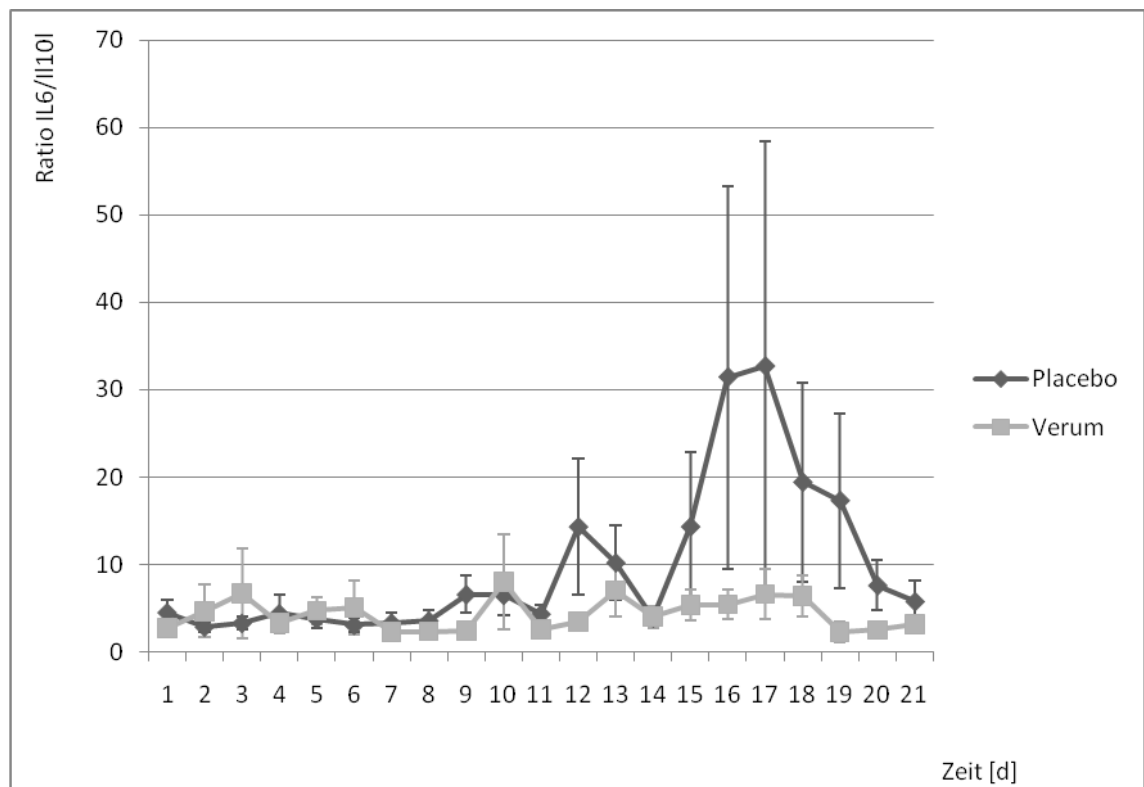
IL 6 fungierte als ein weiterer Marker zur Erfassung der Immunkompetenz und zeigt in beiden Gruppen zu Beginn der Intervention deutlich fallende Werte, was neben der Depression der monozytären HLA-DR Expression auf eine

Immunparalyse hindeutet. Dies ist für diese Interventionsstudie von großer Bedeutung, um zu verhindern, dass Patienten während der Hyperinflammation mit GM-CSF behandelt werden, was einen möglichen schädlichen Effekt haben könnte. Beide Gruppen zeigen einen vergleichbaren niedrigen Grundspiegel mit vereinzelt kurzzeitigen Erhöhungen, die in der Verumgruppe stärker ausfallen. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Verum- und Placebogruppe fand sich jedoch nicht. Diese abrupten deutlichen Anstiege des Plasmaspiegels traten bei vereinzelt Patienten, zu erkennen am großen Standardfehler, in beiden Gruppen auf und reflektieren Ereignisse, die im klinischen Alltag als „Second“ oder „Third Hit“ bezeichnet werden. Ursache hierfür können Ereignisse wie ein erneuter septischer Schub, ungeplante Operationen oder Schockzustände aus anderen Ursachen sein.



**Abb. 09:** Mittelwerte und Standardfehler des IL6 Plasmaspiegels. Der Pfeil bezeichnet den Zeitpunkt der ersten GM-CSF/Placebo Gabe.

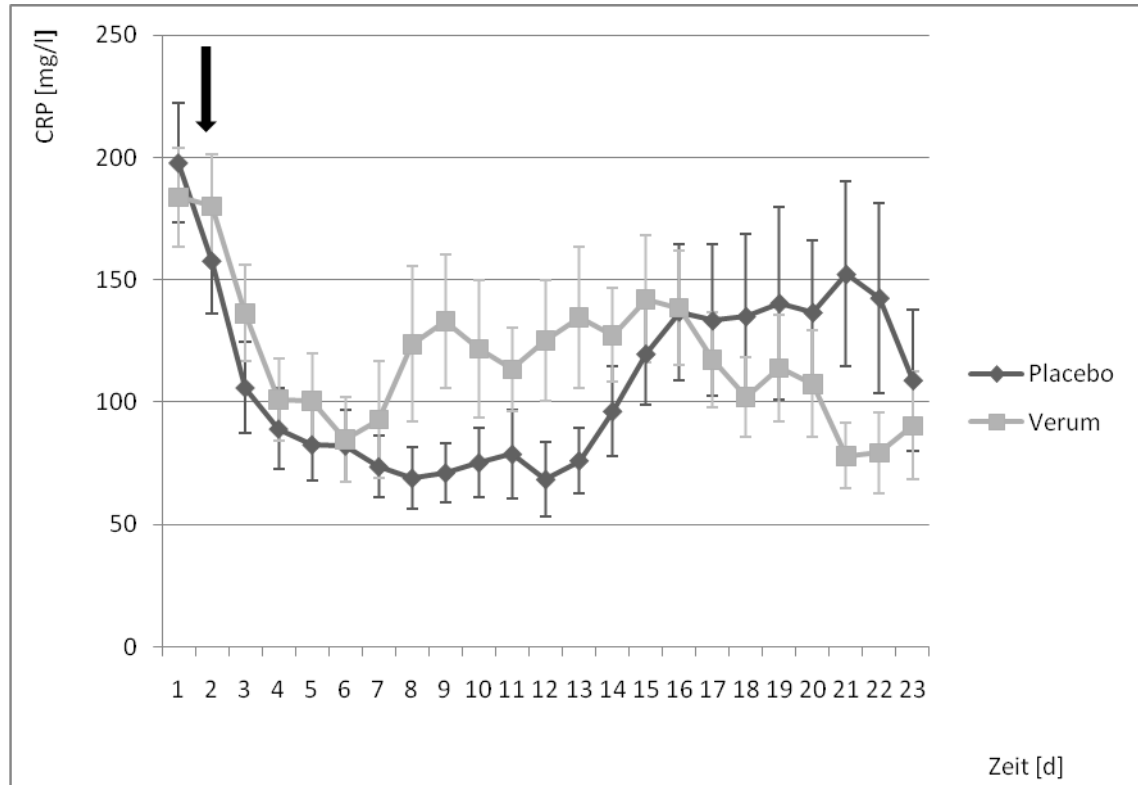
Der Kurvenverlauf des IL6 zu IL10 Verhältnisses, der im nachfolgenden Diagramm dargestellt ist, zeigt sich in den ersten zwei Studienwochen in beiden Gruppen als vergleichbar. In der letzten Studienwoche kommt es zu einem kurzzeitigen steilen Anstieg in der Placebogruppe, um dann zum Ende wieder auf das Niveau der Verumgruppe abzufallen. Grundlegend ursächlich für diesen steilen Anstieg sind massiv erhöhte IL6 Werte bei einem einzelnen Patienten der Placebogruppe bei sonst eher niedrigen Werten.



**Abb. 10:** Mittelwerte und Standardfehler des IL6/IL10 Verhältnisses.

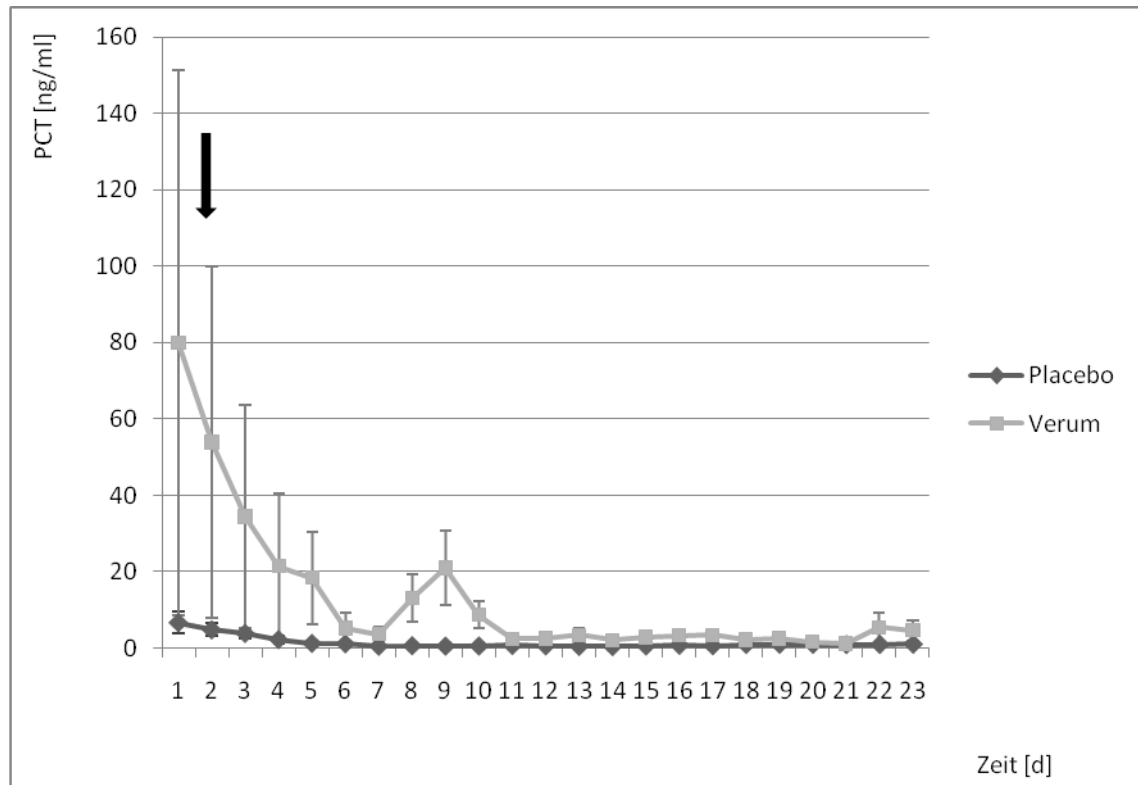
Die CRP Plasmaspiegel zeigen in beiden Gruppen einen parallel verlaufenden, stetigen Abfall von knapp 200 mg/l zu Beginn der Studie, um dann in der Verumgruppe während der zweiten Studienwoche zunächst wieder deutlicher anzusteigen als in der Kontrollgruppe. Am Ende des Beobachtungszeitraums zeigen die Plasmaspiegel beider Gruppen wieder ein vergleichbares Niveau, nachdem die Werte der Kontrollgruppe im Verlauf der dritten Woche über dem

Spiegel der Verumgruppe lagen. Statistisch ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachweisen.



**Abb. 11:** Mittelwerte und Standardfehler des CRP Plasmaspiegels. Der Pfeil bezeichnet den Zeitpunkt der ersten GM-CSF/Placebo Gabe.

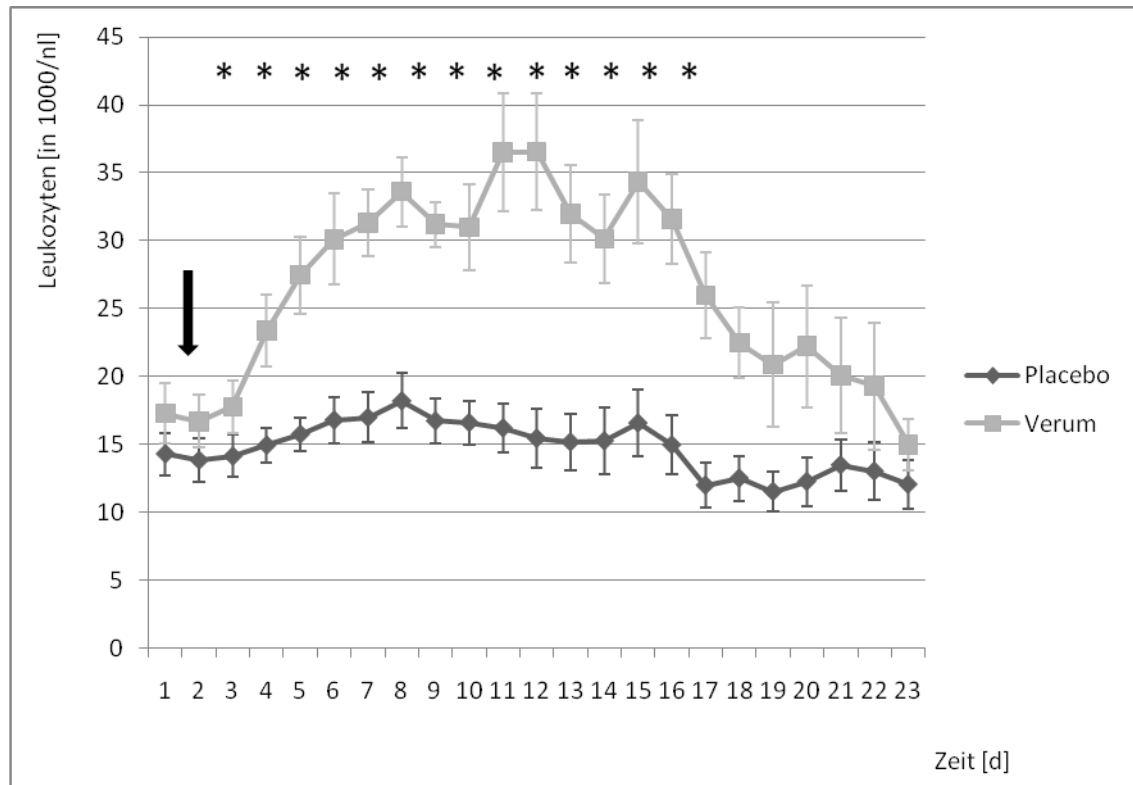
Der Plasmaspiegel des Procalcitonins zeigt in der Verumgruppe initial deutlich höhere Mittelwerte, während der Plasmaspiegel der Kontrollgruppe auf einem niedrigen Niveau stabil verläuft, sich jedoch im Verlauf der zweiten Studienwoche dem der Kontrollgruppe angleicht. Bei der Betrachtung des Kurvenverlaufs der Verumgruppe ist zu bedenken, dass im Vergleich zu den anderen Patienten dieser Gruppe bei einem Patienten im Verlauf der ersten Tage deutlich höhere Procalcitoninwerte nachweisbar waren und so das Niveau entscheidend beeinflusst wurde.



**Abb. 12:** Mittelwerte und Standardfehler von Procalcitonin. Der Pfeil bezeichnet den Zeitpunkt der ersten GM-CSF/Placebo Gabe.

Wie bei einer Gabe von GM-CSF mit myeloproliferativen Eigenschaften zu erwarten, konnte zwischen der Verum- und der Placebogruppe ein statistisch signifikanter Unterschied gemessen werden. Dies trifft für die Tage 2 bis 16 nach Beginn der Intervention zu. Im Mittel stieg die Leukozytenanzahl in der Verumgruppe nicht über 37.000/nl. In der dritten Studienwoche fiel die gemessene Anzahl wieder ab und zeigte am Ende mit der Kontrollgruppe vergleichbare Werte. Die Kurve der Placebogruppe beschrieb einen relativ gleichmäßigen Verlauf über den Studienzeitraum.





**Abb. 13:** Mittelwerte und Standardfehler der Leukozytenanzahl. Signifikante Messpunkte sind mit einem Stern gekennzeichnet. Der Pfeil bezeichnet den Zeitpunkt der ersten GM-CSF/Placebo Gabe.

### 3.6 Ergebnisse der klinischen Beobachtung

Das vom Hersteller angegebene Profil möglicher unerwünschter Wirkungen des in der Studie verwendeten rhGM-CSF (Sargramostim, Leukine®) umfasst, neben hämatologischen Veränderungen wie Leukozytose und Thrombozytopenie, Allgemeinsymptome wie Fieber, Übelkeit und Erbrechen, Knochenschmerzen, Erytheme, Myalgien, Abgeschlagenheit, Synkopen oder Schwindel. Ferner werden unterschiedliche kardiovaskuläre Nebenwirkungen wie Arrhythmien, periphere Ödeme, Perikard- und Pleuraergüsse angegeben. Weiterhin sind Störungen im Respirationstrakt wie Dyspnoe und Verlegung der Lungengefäße durch sequestrierte Granulozyten beschrieben. Dieses mögliche

Nebenwirkungsprofil ist im Kern auch von Hübel und Mitarbeitern (2002) in ihrer Übersichtsarbeit beschrieben worden.

Zur Erfassung möglicher Nebenwirkungen des verwendeten rhGM-CSF erfolgte die täglich Beobachtung und Evaluation jedes Studienpatienten. Dabei wurden unter anderem die Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten, ein möglicher Fieberanstieg an Tag 2 und 3 nach Erstgabe sowie die Delta MODS Werte für Respiration erfasst. Die Ergebnisse sind in Tabelle 05 zusammengefasst.

**Tab. 05:** Assessment möglicher Nebenwirkungen.

	Placebo	rhGM-CSF	p-Wert
Leukozytenzahl >60 ( $10^3$ /nl)	0	3	0,1
Thrombozytenzahl <50 ( $10^3$ /nl)	0	6	< 0,01
Fieber >38,5°C an Tagen 2/3	7	5	0,5
Summe $\Delta$ MODS (Tag1-Tag3) für Respiration (Spanne)	-1 (-1 bis 1)	2 (-1 bis 1)	0,5

Wie in der Tabelle veranschaulicht, findet sich lediglich bezüglich der Thrombozytenzahl <50.000/nl ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Verum- und der Kontrollgruppe.

Bezüglich der eingangs genannten möglichen Allgemeinsymptome und der kardiovaskulären Veränderungen bot keiner der Studienpatienten Anhalt für eine unerwünschte Medikamentenwirkung durch rhGM-CSF.

### 3.7 Ergebnisse der klinischen Scores

Zur Erfassung des Erkrankungsschweregrads im Studienverlauf wurde der Multiple Organ Dysfunction Score (MODS) und der Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) täglich erfasst. Beide Scores zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen. In beiden

Scores zeigt die Verumgruppe höhere Mittelwerte als die Kontrollgruppe. Insgesamt verlaufen beide Kurven jedoch relativ parallel zueinander.

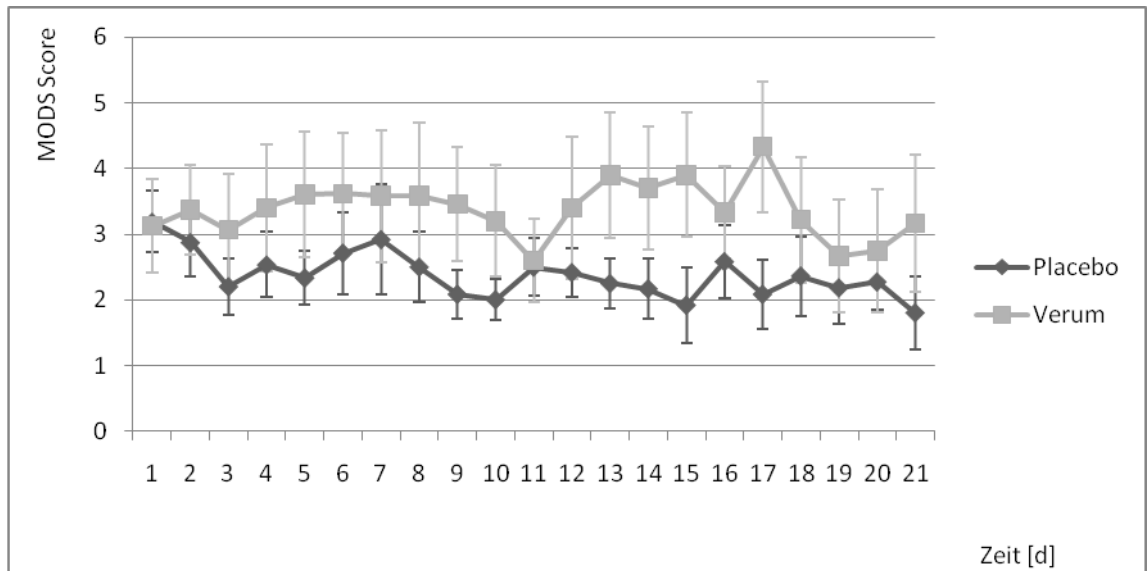


Abb. 14: MODScore im Verlauf.

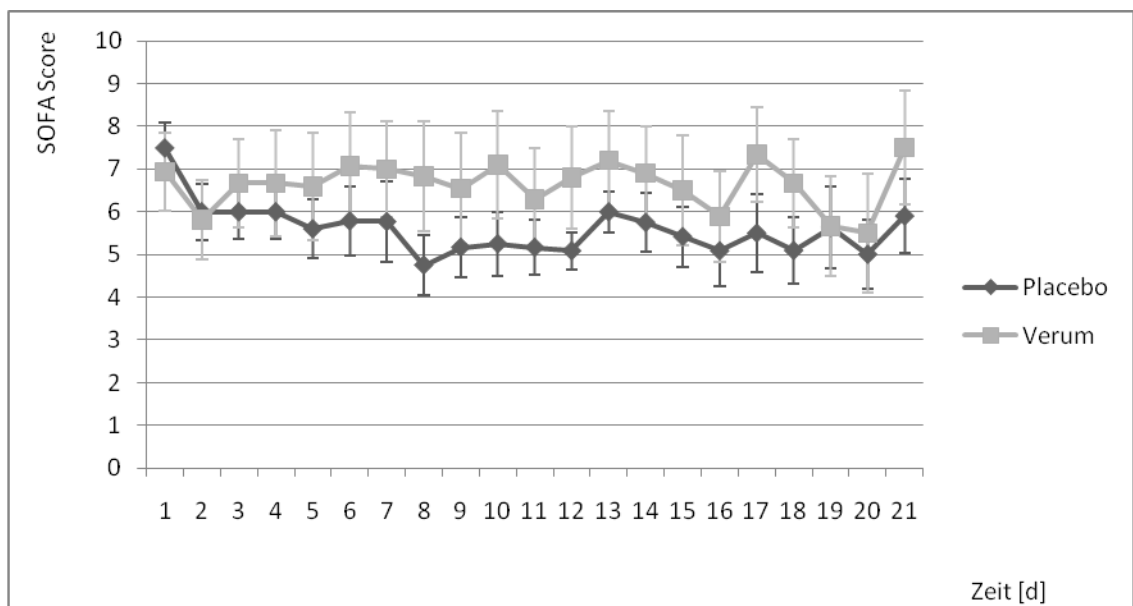


Abb. 15: SOFA Score im Verlauf.

## 4 Diskussion

### 4.1 Kernaussagen

In der vorliegenden Arbeit ging es darum, den Einfluss von rhGM-CSF auf Faktoren der humoralen Immunantwort bei Patienten mit schwerer Sepsis und Immunparalyse zu untersuchen.

Zwischen den demographischen Daten der Verum- und der Kontrollgruppe findet sich kein signifikanter Unterschied. Auch ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der jeweiligen Gruppenmortalität, den Aufnahme- und Verlaufsscores oder der bei Studieneinschluss bestehenden monozytären HLA-DR Expression nachweisen. Die ermittelte Mortalität des Patientenkollektivs ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer europäischer Studien (Engel et al. 2007, Vincent et al. 2006). Die hier erhobenen Daten zeigen, dass alle gemessenen Zytokine in der Verumgruppe höhere Werte ergaben als in der Kontrollgruppe. Dies gilt mindestens für die Dauer der ersten Woche während des Beobachtungszeitraums. Danach konnte in den meisten Fällen eine spontane Normalisierung der Zytokinproduktion in der Kontrollgruppe beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen sich unter anderem auch mit der monozytären HLA-DR Expression korrelieren, die in der Verumgruppe ebenfalls einen statistisch signifikanten Initialanstieg zeigt und gegen Ende der Studie eine spontan ansteigende Expression in der Kontrollgruppe aufweist. Im Gegensatz dazu ist augenfällig, dass diese Beobachtung nicht für die gemessenen Plasmaspiegel des GM-CSFs gilt. Hier findet sich in der Kontrollgruppe ein über den Studienzeitraum stabiler, niedriger Spontanverlauf, ohne dass die gemessenen Werte je ein vergleichbar hohes Niveau wie das der Patienten der Verumgruppe erreichen.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass sich unter Einfluss von rhGM-CSF, insbesondere während der ersten Studienwoche, allgemein eine höhere Zytokinproduktion im Sinne einer gesteigerten Aktivität von immunologisch aktiven Zellen und Geweben findet. Dies legt die Vermutung nahe, dass rhGM-CSF *in vivo* unterschiedliche Wirkung zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der humanen Immunantwort hat. Es scheint in der Lage zu sein, eine kompromittierte Immunantwort während der Immunparalyse, die bei allen Studienpatienten zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses vorherrschte, positiv zu beeinflussen.

## 4.2 Methodenkritik

Die vorliegende Arbeit ist eine randomisierte, placebokontrollierte und doppelblinde Phase-II-Studie. Dieses Studiendesign bot gute Voraussetzungen für qualitativ hochwertige und aussagekräftige Ergebnisse.

Ein anerkanntes Problem von Sepsis-Studien in der Intensivmedizin ist die große Heterogenität der Studienpopulationen bezüglich des Alters, der Co-Morbidität, der auslösenden Ursache und Erreger und der Stratifizierung der Patienten (Vincent et al. 2002). Den meisten Studien liegen die SIRS/Sepsis-Kriterien der Konsensuskonferenz des „American College of Chest Physicians“ und der „Society of Critical Care Medicine“ (ACCP/SCCM, Bone et al. 1992) zugrunde. Seitens der Forschung ist in der Vergangenheit wiederholt kritisch angemerkt worden, dass diese Kriterien zu unspezifisch seien und die Voraussetzungen für ein SIRS daher zu schnell erfüllt sind, mit der Folge, dass Patienten zu früh in Studienkollektive eingeschlossen werden. Alle Ansätze, die ACCP/SCCM Kriterien grundlegend zu verändern oder einheitlich geltende Alternativen wie das PIRO-Konzept (Predisposition, Infection, Response, Organ Dysfunction) zu implementieren (Levy et al. 2001), haben sich in der breiten klinischen Anwendung nicht durchgesetzt. Daher wurden für die

Einschlusskriterien der vorliegenden Studie ebenfalls die ACCP/SCCM Leitlinien für SIRS und Sepsis zugrunde gelegt.

Um der Forderung von Wissenschaftlern wie Angus, Vincent und Kox bezüglich einer besseren Stratifizierung und zeitlichen Planung der Intervention nachzukommen, wurden die Einschlusskriterien und der Beginn der Intervention um die regelmäßige Bestimmung der monozytären HLA-DR-Expression als ein Maß der immunologischen Kompetenz eines Patienten ergänzt.

Die Bestimmung der Expression des MHC Klasse II Rezeptors HLA-DR ist in einer Vielzahl von Studien als Marker für Immunkompetenz evaluiert worden. In der vorliegenden Studie wurde die Messmethode verwendet, die Nebe in einem 1998 veröffentlichten Artikel vorgestellt hatte. Hierbei wird die Dichte von HLA-DR Komplexen auf Monozyten, die ihrerseits zuvor durch eine Markierung des für sie spezifischen CD 14 Rezeptors abgegrenzt wurden, durchflusszytometrisch bestimmt. Diese wird als mittlere Immunfluoreszenzintensität ausgedrückt, das heißt, dass die Intensität des vom Fluorochrommarkers emittierten Lichts mit der Anzahl der HLA-DR Komplexe korreliert. Die Standardisierung erfolgt mit Hilfe von Kalibrations- und Kontrollansätzen. Die Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse zwischen verschiedenen Institutionen ist abhängig von der Genauigkeit, mit der die Zellfärbung und die Herstellung der Kalibrations- und Kontrollansätze durchgeführt werden, sowie von den verwendeten Zytometern und unterliegt somit einer gewissen Variabilität. Zwar gibt es mittlerweile ein kommerziell hergestelltes Test-Kit für HLA-DR von der Firma Becton Dickinson (BD Quantibrite© HLA-DR /Monocyte Reagent), das zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchung noch nicht in einer Multicenterstudie evaluiert worden war (Döcke et al. 2005), weswegen für die vorliegende Studie die Methode nach Nebe (Nebe 1998) verwendet wurde.

Neben dem immunologischen Marker HLA-DR auf Monozyten sind zur Stratifizierung und Verlaufsbeobachtung des Patientenkollektivs neben dem prädiktiven Score APACHE II (Knaus et al. 1985) zwei weitere

Punktwertsysteme zur Erfassung des Erkrankungsverlaufs angewendet worden. Zum einen der Multiple Organ Dysfunction Score (J.C. Marshall et al. 1995) und zum anderen der Sepsis-related organ failure assessment Score (J. L. Vincent et al 1994). Alle Scores sind an großen Patientenkollektiven hinsichtlich ihrer Aussagekraft international getestet und validiert worden. Dennoch sind Scoresysteme nicht das geeignete Mittel zur Objektivierung der individuellen Krankheitsprognose, da die komplexen Vorgänge und Interaktionen, die parallel im Zuge eines septischen Geschehens ablaufen, nicht ausreichend abgebildet werden (Angus 2000).

Bezüglich der Bestimmung anderer immunologischer Marker in der Studie, wie zum Beispiel GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL 6 und IL10, wurden kommerzielle Assays von verschiedenen Firmen, u.a. Quantikine<sup>®</sup>, R&D Systems, Minneapolis, USA; Immulite<sup>®</sup>, DPC Biermann, Bad Nauheim, verwendet. Bei diesen Test-Kits handelt es sich im Falle von GM-CSF um einen ELISA, der mit quantitativer Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik operiert. Die methodische Grundlage der Zytokinbestimmung bildet ein Chemilumineszenz-Immunoassay, der semiautomatisch valide und standardisierte Ergebnisse liefert. Dennoch gilt auch bei diesen Test-Kits wie schon bei der Bestimmung von HLA-DR, dass die Ergebnisse einer möglichen Variabilität unterliegen, die sich aus der Methode und deren Handhabung ergeben.

Keine klinische Untersuchung, welche die Bestimmung verschiedener Parameter zur Grundlage hat, ist vor dem Auftreten gegen falsch hoher oder falsch niedriger Messergebnisse gefeit. Um die Möglichkeit zu haben, mögliche falsche Ergebnisse erneut zu überprüfen, wurde für jeden Tag und Messparameter eine „Probenbank“ aus Untersuchungsmaterial angelegt.

Die Intervention in der vorliegenden Studie bestand in der subkutanen Injektion von rekombinantem humanen GM-CSF (Leukine<sup>®</sup>, Wirkstoff: Sargramostim) in einer Dosis von 4 $\mu$ g/kg. Die Applikation des Studienmedikaments über einen subkutanen Weg wurde gewählt, da sich durch die langsame Resorption aus

dem subkutanen Fettgewebe eine längere Wirksamkeit ergibt. Die Wahl fiel auf GM-CSF als Interventionsmedikament, da in multiplen klinischen Studiensettings gezeigt werden konnte, dass es eine gute immunmodulatorische Wirkung bei Patienten mit einer durch verschiedene Ursachen kompromittierten Immunfunktion hat. Williams und Mitarbeiter wiesen in zwei Studien von 1998 an Blut von septischen Patienten *ex vivo* nach, dass GM-CSF eine initial gestörte monozytäre Funktion und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wieder herstellen kann. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Flohé et al. in verschiedenen *ex vivo* Studien 1999 und 2003 bei Patienten mit Sepsis, mit SIRS nach schwerem Trauma oder nach kardiopulmonalen Bypass. Ein weiterer Grund für die Wahl von GM-CSF waren die im Vergleich zu Interferon  $\gamma$  deutlich geringer ausgeprägten Nebenwirkungen, insbesondere wird über keine Toxizität berichtet (Hübel et al. 2002). Eine der Vorläuferstudien unserer Arbeitsgruppe (Nierhaus et al. 2003) zeigte zudem vielversprechende Ergebnisse bei guter Verträglichkeit der Studienmedikation, so dass eine kontrollierte, randomisierte, doppelt verblindete Interventionsstudie gerechtfertigt erschien.

Ein weiteres grundlegendes Problem von klinischen Sepsis-Studien ist die Tatsache, dass die meisten Untersuchungen nur kleine Patientenkollektive umfassen, so dass sich mögliche Therapieeffekte nicht nachweisen lassen. Ursächlich hierfür ist die im Vergleich zu anderen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem akuten Myokardinfarkt, relativ kleine Anzahl möglicher Patienten pro Institution sowie Aspekte der Praktikabilität und Finanzierbarkeit in der Intensivmedizin (Angus 2000). Daraus lässt sich die Forderung nach multizentrischen Studien ableiten, wenn man valide, wegweisende Studienergebnisse erzielen möchte, um so die seit Jahren auf niedrigem Niveau stagnierenden Überlebensraten bei SIRS und Sepsis zu verbessern. Die oben geschilderte Problematik gilt auch für die vorliegende Studie. Die Größe des Studienkollektivs von 32 Patienten wurde zum einen so gewählt, da sich in den



oben genannten Vorläuferstudien unserer Arbeitsgruppe gezeigt hatte, dass diese Anzahl ausreicht um einen Effekt von GM-CSF auf die angeborene Immunantwort abzuschätzen, zum anderen waren 32 Patienten eine Anzahl, die realistischerweise in einem akzeptablen Zeitraum eingeschlossen werden konnten.

Die Erfassung und der konsekutive Einschluss der geplanten 32 Patienten mit der anschließenden Erhebung und Bestimmung der zu messenden Parameter nahm mehr als zwölf Monate in Anspruch. Es konnten Daten gewonnen werden, die den wissenschaftlichen Anforderungen genügen, mit ihrer Aussage die oben genannten Forderungen unterstreichen und den dazu nötigen Aufwand rechtfertigen können. Ein Vorteil von monozentrischen Studien ist die geringe Variabilität im Hinblick auf diagnostische und therapeutische Konzepte innerhalb einer Klinik.

In Bezug auf die Fragestellung, mit der die in der vorliegenden Studie gewonnenen Datensätze betrachtet werden können, sind eine Reihe weiterer Ansätze vorstellbar, wie zum Beispiel der Vergleich von überlebenden und verstorbenen Patienten und deren Gruppenzugehörigkeit. Hierauf ist jedoch bewusst verzichtet worden, da diese Untersuchung zunächst den unmittelbaren Effekt von GM-CSF auf die humorale Immunantwort beleuchten sollte. Hierzu gibt es in der derzeitigen Literatur nur entfernt vergleichbare Veröffentlichungen, die unter analogen Untersuchungsbedingungen qualitativ ähnlich gute Ergebnisse gewinnen konnten. Ferner besteht auch bei dieser Studie die Problematik, dass im Hinblick auf Morbidität und Mortalität aufgrund des relativ kleinen Studienkollektivs von zweimal 16 Patienten kaum statistisch signifikante Schlüsse gezogen werden können.

### **4.3 Diskussion der Ergebnisse im Einzelnen und Einordnung in den Stand der Wissenschaft**

Die Demographie der beiden Patientengruppen im Studienkollektiv ist im Hinblick auf Zusammensetzung bezüglich des mittleren Alters, der Geschlechtsverteilung, der Erkrankungsart und Erkrankungsschwere sowie der Mortalität repräsentativ für eine intensivmedizinische Klinik in einem Krankenhaus der Maximalversorgung und unterscheidet sich zwischen den Gruppen nicht. Gleiches gilt für die ermittelte Gesamtmortalität von 38 %. Diese entspricht der Sterblichkeit, die unter anderem in zwei großen europäischen Studien (Engel et al. 2007, Vincent et al. 2006) dokumentiert worden ist. Auch der höhere Anteil an männlichen Patienten in beiden Studiengruppen stellt kein ungewöhnliches Merkmal dar (Müller-Werdan et al. 2005). Die ermittelten Infektionslokalisationen innerhalb der Studienpopulation decken sich nicht ganz mit den Erkenntnissen der Multicenterstudien von Vincent und Kollegen aus 2006. Diese konnten die Lunge in 68%, das Abdomen in 22%, den blutkulturellen Erregernachweis in 20% und den Urogenitaltrakt in 14% der Fälle als Infektionsfokus identifizieren. In unserer Studie hingegen litten 31% der Patienten an einer Peritonitis, 25% an einer Pneumonie, 22% an einer Pankreatitis, gefolgt von 13% der Patienten mit einer Pankreatitis und schließlich 9% mit einer Mediastinitis. Ursächlich hierfür mag das klinikspezifische Erkrankungsspektrum mit vielen viszeralchirurgischen Patienten sein.

Seit in den späten 90er Jahren durch eine Vielzahl von Studien klar geworden war, dass es sich bei SIRS und Sepsis um eine bi- beziehungsweise triphasische Krankheitsentität handelt (Bone et. al. 1996), in der sich *hyper-* und *hypoinflammatorische* Episoden abwechseln oder parallel vorliegen, ist versucht worden, modulierend in den Krankheitsprozess einzugreifen.

Ein Ansatz dabei ist die Verwendung des rekombinanten Wachstumsfaktors GM-CSF. Die klinische Zulassung des Medikaments beschränkt sich auf den ex

und *in vivo* Einsatz bei hämatologischen Erkrankungen nach Radio- und Chemotherapien sowie zur Gewinnung von pluripotenten Stammzellen. Neben diesen myeloproliferativen Eigenschaften von GM-CSF konnte seit Mitte der 80er Jahre in einer Reihe von Grundlagenstudien gezeigt werden, dass dieser Faktor die immunologische Kompetenz von reifen Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen initiieren und verstärken sowie die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen induzieren kann (Root et al. 1999). Als Konsequenz aus diesen Erkenntnissen wurde in nachfolgenden Studien die Fähigkeit von GM-CSF untersucht, die im Zuge von prolongierter Sepsis bestehende Immunparalyse (Kox et al. 2000, Volk et al. 1996) wieder aufzuheben.

Williams und Mitarbeiter haben 1998 in zwei kontrollierten Studien an derselben Gruppe von zwölf septischen Patienten zeigen können, dass GM-CSF in der Lage war *ex vivo* eine bestehende funktionelle monozytäre Refraktärität gegenüber Lipopolysaccharid (LPS) wieder aufzuheben. Als Marker für die wiederhergestellte immunologische Kompetenz dienten dabei die monozytäre Fähigkeit zum „Respiratory Burst“ und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel TNF  $\alpha$  und IL 1. Ferner konnte demonstriert werden, dass GM-CSF zusätzlich die Expression von monozytären Oberflächenproteinen wie HLA-DR, CD 14 und CD 71 hochregulieren und das Auftreten des programmierten Zelltods (Apoptose) von Monozyten abschwächen konnte.

Die Arbeitsgruppe um Flohé konnte in zwei verschiedenen, kontrollierten *in vitro* Studien vergleichbare Ergebnisse demonstrieren.

Die 1999 veröffentlichte Untersuchung zeigte an jeweils neun Patienten mit Polytrauma, Sepsis oder Zustand nach großen kardiochirurgischen Eingriffen, dass deren Kapazität zur LPS-stimulierten TNF $\alpha$  Produktion gestört und die monozytäre HLA-DR Expression im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe reduziert, beziehungsweise supprimiert war. Die stimulierte TNF $\alpha$  Ausschüttung erreichte in allen Gruppen nach *ex vivo* Behandlung der Proben mit GM-CSF

deutlich gesteigerte Werte. Im Falle der kardiochirurgischen Patienten war zusätzlich die postinterventionelle HLA-DR Expression bestimmt worden, die unter der Behandlung wieder präoperative Ausmaße erreichte.

In 2003 veröffentlichten Flohé und Mitarbeiter eine prospektive, kontrollierte Studie an 16 Patienten mit schwerem Trauma. Für diese konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass GM-CSF in der Lage ist, die durch das schwere Trauma gestörte Immunantwort *in vitro* wieder herzustellen.

Diese vielversprechenden Erkenntnisse aus den GM-CSF *in vitro* Studien legten nahe, die Gültigkeit dieser Feststellungen in einer randomisierten, kontrollierten und prospektiven Studie *in vivo* zu überprüfen.

Presneill und Mitarbeiter haben 2002 in einer randomisierten, kontrollierten, doppelblind Phase-II-Studie die Wirkung einer fünftägigen intravenösen Gabe von GM-CSF bei 18 kritisch kranken Patienten mit schwerer Sepsis und akutem Lungenversagen (ARDS) untersucht. Sie konnten zeigen, dass GM-CSF die Fähigkeit hat, den Gasaustausch zu verbessern. Zusätzlich stiegen in der Verumgruppe die Leukozytenanzahl und deren Kapazität zur Produktion von mikrobiziden Superoxiden sowie die Phagozytosefunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe an, eine Beobachtung, die zur erwarteten Wirkung von GM-CSF passt. Die Beobachtungen erreichten jedoch keine statistische Signifikanz und es ergaben sich keine Mortalitätsunterschiede.

In 2001 hat die Arbeitsgruppe um Mels in einer randomisierten, kontrollierten Phase-II-Studie die Wirkung von perioperativer GM-CSF Gabe auf die Immunkompetenz von acht Patienten kurz vor und nach resezierenden Eingriffen aufgrund eines Kolorektalkarzinoms untersucht. Es konnte demonstriert werden, dass postoperativ in der Verumgruppe neben deutlich erhöhten Monozytenzahlen auch eine signifikant erhöhte HLA-DR Expression als Ausdruck einer gesteigerten immunologischen Kompetenz bestand.

Weitere gemessene immunologische Marker zeigten in der Behandlungsgruppe ebenfalls gesteigerte Werte.

Rosenbloom et al. zeigten in einer im Jahr 2005 veröffentlichten Studie an 40 septischen Patienten, jedoch unter Ausschluss von Kranken mit septischem Schock oder Organversagen, dass die intravenöse Gabe von GM-CSF neben der Hochregulation von leukozytären Oberflächenmarkern, wie zum Beispiel HLA-DR, eine signifikante Verbesserung oder sogar Heilung der zugrundeliegenden Infektion auszulösen vermochte.

Ähnliche Beobachtungen konnten an 60 neutropenischen Neugeborenen mit den klinischen Zeichen einer Sepsis ebenfalls gemacht werden (Bilgin et al. 2001). Dort führte die subkutane Gabe von GM-CSF über sieben Tage zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Mortalität in der Behandlungsgruppe auf 10 % im Vergleich zur konventionell behandelten Studiengruppe.

In der vorliegenden Studie wurde über einen im Vergleich zu bisher veröffentlichten Untersuchungen deutlich längeren Zeitraum von bis zu 21 Tagen GM-CSF oder Placebo bei Patienten mit schwerer Sepsis und Immunparalyse subkutan appliziert.

Wie zu erwarten, zeigten sich ab Tag zwei der Intervention in der Verumgruppe ein deutlich erhöhter GM-CSF Plasmaspiegel. Die Univariateanalyse ergab einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) zu den Patienten der Kontrollgruppe an sechs Tagen des Studienzeitraums. Auffällig war, dass in der Placebogruppe, deren Messwerte die endogene GM-CSF Produktion reflektieren, der Zytokinspiegel sich für die Dauer des Messzeitraums auf einem stabilen, nahezu linear verlaufenden, niedrigen Niveau im Mittel um 2 pg/ml befand. Als Erklärung hierfür kommen mehrere Gründe in Betracht. Es ist möglich, dass die endogen produzierte Menge GM-CSF rasch von Geweben und Zellen mit GM-CSF Rezeptoren gebunden wird beziehungsweise vor allem lokal parakrin wirkt und so in der Zirkulation nicht mehr im größeren Maß nachweisbar ist (Presneill 2000), oder dass sich die Zytokinspiegel

möglicherweise unter der Nachweisgrenze der ELISA-Kits bewegen. Auch könnte die endogene GM-CSF Synthese bei Patienten in der Immunparalyse deutlich reduziert sein, wie Williams et al. 1998 gezeigt haben. Ähnliche Beobachtungen haben Presneill und Mitarbeiter 2000 veröffentlicht. Die spontanen GM-CSF Plasmaspiegel bei 82 Patienten, die im Unterschied zu unserem Patientenkollektiv in der Frühphase der SIRS/Sepsis beziehungsweise des septischen Schocks waren, betragen im Mittel weniger als 0,1 ng/ml. Auch die gesunden Kontrollpatienten zeigten im Wesentlichen keine über die Nachweisgrenze erhöhten Werte. Im Gegensatz dazu fanden Perry und Mitarbeiter 2002 bei ihrer Untersuchung von 53 septischen Patienten im Mittel deutlich höhere Werte für GM-CSF. Mit einem selbstentwickelten ELISA wurden im Mittel GM-CSF Plasmaspiegel zwischen 420 pg/ml (verstorbene septische Patienten) und 720 pg/ml (gesunde Kontrollpatienten) gemessen. Dabei konnte eine signifikante Korrelation zwischen einem erniedrigtem GM-CSF Spiegel und einer erhöhten Mortalität nachgewiesen werden. Torre et al. haben 2003 bei 52 Patienten mit SIRS oder Sepsis ebenfalls unmittelbar nach dem Beginn der Erkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten signifikant erhöhte GM-CSF Plasmaspiegel gefunden, die im Verlauf von sieben Tagen eine signifikante Abnahme der gemessenen Werte zeigten.

Zum Vergleich und der anschließenden Bewertung der Daten unserer Studie mit den oben genannten Untersuchungen muss berücksichtigt werden, dass sich deren Studiendesign bezüglich Messzeitpunkt und Untersuchungsdauer deutlich von unserem Vorgehen unterscheidet. Zusätzlich wurden in diesen Studien ELISA-Kits verwendet, die zum Teil selbst entwickelt waren oder nur eine geringe Sensitivität hatten. Bei der Interpretation unserer Daten lässt sich festhalten, dass die Beobachtungen von Torre et al. (2003) bestätigt werden. Zum Zeitpunkt der Immunparalyse, die bei unseren Patienten vorherrschte, scheint die beschriebene progrediente Suppression der endogenen GM-CSF Produktion weiterhin zu bestehen. Daher erscheint die Gabe von GM-CSF mit seinen beschriebenen immunmodulatorischen Qualitäten während der

hypoinflammatorischen Phase gerechtfertigt, um möglicherweise eine Verbesserung der immunologischen Kompetenz zu erzielen.

Der Tumornekrosefaktor Alpha als eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine wird unter anderem von stimulierten Monozyten produziert. Im Zuge der Immunparalyse zeigt sich eine deutlich kompromittierte monozytäre Fähigkeit, TNF $\alpha$  zu produzieren (Wolk et al. 2000), was durch eine *ex vivo* Stimulation von Vollblutproben mit Lipopolysaccharid (LPS) und der anschließenden Messung des TNF $\alpha$  Spiegels überprüft werden kann. Um die Wirkung GM-CSF auf die TNF $\alpha$  Synthese zu untersuchen, wurde im Studienkollektiv zunächst jeweils der basale TNF $\alpha$  Spiegel gemessen. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Jedoch waren die ermittelten Werte in der Verumgruppe tendenziell höher, was für eine spontane Synthese von TNF $\alpha$  im Sinne einer gesteigerten immunologischen Grundaktivität sprechen kann. Diese Beobachtung könnte auf den Effekt von GM-CSF zurückzuführen sein. An Monozyten gesunder Probanden konnte *ex vivo* nachgewiesen werden, dass eine Stimulation mit GM-CSF über einen Zeitraum von mehreren Tagen eine spontane TNF $\alpha$  Ausschüttung ohne zusätzlichen LPS-Reiz ausgelöst werden kann (Kreutz et al. 1999). Eine weitere *in vitro* Studie konnte diese Ergebnisse nicht bestätigen (Williams et al. 1998). Allerdings wurden die Proben von zwölf septischen Patienten lediglich für zwei Stunden mit der Studienmedikation inkubiert.

Zur Beurteilung der Immunkompetenz ist die *ex vivo* TNF $\alpha$ -Stimulation von Vollblut mit LPS in vielen Studien validiert worden. Die Ergebnisse unserer Studie zeigten in der Verumgruppe in den ersten zwei Wochen des Untersuchungszeitraums im Gegensatz zur Kontrollgruppe deutlich erhöhte Messwerte, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Dennoch korrelieren diese Beobachtungen mit den Ergebnissen einer Reihe von *in vitro* und *in vivo* Studien, bei denen ein zum Teil signifikanter Zusammenhang zwischen der Gabe von GM-CSF und einer verbesserten oder

wiederhergestellten TNF $\alpha$  Synthese in verschiedenen Patientengruppen gezeigt werden konnte (Lendemans et al. 2007, Nierhaus et al. 2003, Flohé et al. 2003 und 1999, Kreutz et al. 1999, Williams et al. 1998). Die ferner zu beobachtende Annäherung der Zytokinspiegel der Placebogruppe an die Werte der Verumgruppe in der dritten Studienwoche scheint für eine spontane Erholung der immunologischen Kompetenz dieser Patienten zu sprechen. Einen ähnlichen Verlauf zeigten die von Flohé et al. in 2003 und Lendemans et al. in 2007 gemessenen Werte bei Patienten nach schwerem Trauma, bei denen sich nach einer initial deutlich reduzierten Immunantwort, die TNF $\alpha$  Synthese wieder spontan erholt.

Da GM-CSF neben proinflammatorischen Zytokinen auch die Synthesekapazität von antiinflammatorischen Mediatoren wie zum Beispiel Interleukin 10 zu beeinflussen vermag, haben wir in der vorliegenden Studie dieses zusätzlich bestimmt. Die Datenlage hierzu ist jedoch kontrovers. Es gibt Studien, die eine unter GM-CSF gesteigerte IL10 Synthese bei Patienten mit SIRS oder Sepsis nachweisen konnten (Lendemans et al. 2007, Williams et al. 1998) oder auch bei gesunden Spendern (Hartung et al. 2000), beziehungsweise bei Patienten direkt nach Trauma beziehungsweise bei der Kontrollgruppe aus gesunden Probanden (Flohé et al. 2003). Dagegen stehen Beobachtungen, dass GM-CSF keine Wirkung auf die IL 10 Ausschüttung zu haben scheint (Nierhaus et al. 2003), wobei dies zum Teil von der Erkrankungsschwere abzuhängen scheint (Flohé et al. 2003), oder diese sogar zu supprimieren vermag (Kreutz et al. 1999, Hennemann et al. 1998). Mögliche Gründe für diese divergierenden Beobachtungen sind mannigfaltig. Eine Rolle spielen könnte eine mögliche unterschiedliche Wirkung von GM-CSF auf immunologische Zellen *in vitro* und *in vivo*, da im Organismus die mediatorgesteuerte Rekrutierung von neuen Monozytenpopulationen einen Einfluss auf den Zytokinspiegel nehmen kann, der *in vitro* nicht möglich ist. Ferner können die verschiedenen Studienpopulationen in verschiedenen Stadien



ihrer Immunantwort und mit unterschiedlichen Komorbiditäten ein Rolle in diesem Zusammenhang spielen.

Unsere Ergebnisse zeigen einen deutlichen, zum Teil statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe. So steigt der IL10 Spiegel nach Beginn der Gabe von GM-CSF rasch an und bleibt für die Dauer der ersten Studienwoche auf hohem Niveau. Danach fallen die Messwerte bis fast in den Bereich der Placebogruppe ab. Zum Teil fanden sich täglich ausgeprägte Spiegelschwankungen bei einigen Patienten in der Verumgruppe. Ursächlich hierfür können immunologisch wirksame Ereignisse wie zum Beispiel ein erneuter Endotoxinreiz oder eine Revisionsoperation sein, bei denen es auch zu einer antiinflammatorischen Gegenregulation kommen kann. Der im Kurvenverlauf der Kontrollgruppe an Tag sieben gut erkennbare „Ausreißer“ lässt sich auf einen massiven Messwertanstieg eines einzelnen Patienten zurückführen, der kurz danach verstorben ist. Ob eine massive antiinflammatorische Reaktion im Zuge der vorherrschenden Immunparalyse bei gleichzeitig ausgeprägt reduzierter Expression von monozytärem HLA-DR (Volk et al. 1996) bei diesem Patienten ursächlich ist, bleibt spekulativ.

In der Zusammenfassung ließ sich für unser Patientenkollektiv eine signifikant gesteigerte IL10 Ausschüttung unter dem Einfluss von GM-CSF zeigen. Dies lässt sich möglicherweise als eine kompensatorische Gegenregulation im Sinne eines negativen „Feedback Mechanismus“ interpretieren.

In der täglichen Routinediagnostik wurden, neben den klassischen Entzündungsmarkern wie CRP und der Leukozytenzahl, die Expression von monozytärem HLA-DR, sowie die Plasmaspiegel von IL 6 und PCT bestimmt.

Die Expression von HLA-DR als Ausdruck der immunologischen Kompetenz war neben den ACCP/SCCM Kriterien für SIRS und Sepsis der entscheidende Parameter für den Studieneinschluss und die konsekutive Randomisierung der Patienten. Entsprechend den Erfahrungen aus eigenen Vorstudien und den Ergebnissen aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurde der „Cut off“ bei  $\leq 200$  mittlerer Immunfluoreszenzintensität (MFI) festgelegt, da unterhalb

dieser HLA-DR-Rezeptordichte von einer gestörten Monozytenfunktion im Sinne einer Immunparalyse auszugehen ist, die mit einer schlechten Prognose für den Patienten einhergeht (Nebe 1998). Um sicherzustellen, dass die Gabe des proinflammatorischen Zytokins GM-CSF nicht in einer hyperinflammatorischen Phase erfolgte, was mit für den Patienten möglicherweise nachteiligen Nebenwirkungen hätte verbunden sein können, wurde zusätzlich das proinflammatorische Zytokin IL6 bestimmt und nur bei deutlich fallenden Messwerten ein Studieneinschluss erwogen. Damit wurde im Studiendesign den von vielen Autoren aufgestellten Forderungen nach einer genaueren Patientenstratifizierung und einer biologischen Zeitplanung der Intervention Rechnung getragen (Napolitano 2005, Trapnell 2002, Vincent et al. 2002).

Unsere Ergebnisse für die HLA-DR Expression auf Monozyten zeigen in der Verumgruppe im Verlauf der ersten neun Tage einen zum Teil signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zur Placebogruppe. Ab Tag drei nach Interventionsbeginn kam es zu einem steilen Anstieg der HLA-DR Expression, die bis Studienende wieder leicht abfiel, jedoch deutlich über 300 MFI blieb. Unter der Wirkung von GM-CSF kam es somit zu einer dauerhaften Hochregulation der monozytären HLA-DR Expression. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Resultaten anderer *in vivo* Studien. Rosenblom et al. fanden 2005 bei 40 SIRS-Patienten, dass GM-CSF die signifikant supprimierte HLA-DR Expression wieder in Richtung normaler Werte stimulieren konnte. Zu vergleichbaren Schlüssen kommen Nierhaus et al. 2003 bei der Untersuchung von neun Patienten mit septischer Immunparalyse, bei denen GM-CSF die monozytäre Immunkompetenz wieder herstellen konnte. Auch die perioperative Gabe von GM-CSF bei 16 Patienten mit Kolorektalkarzinomen führte zu einer gesteigerten HLA-DR Expression, und verhinderte den sonst nach schweren Traumata beobachteten Abfall der Rezeptordichte (Mels et al. 2001).

Die Patienten der Kontrollgruppe in unserer Studie boten über den Beobachtungszeitraum eine langsame spontane Erholung der monozytären HLA-DR Expression, die ab der dritten Woche Werte um 300 MFI und darüber zeigte. Diese Tendenz zu einer spontanen Wiederherstellung einer initial kompromittierten zellulären Immunkompetenz fand sich auch in Untersuchungen bei Patienten nach schwerem Trauma (Lendemans et al. 2007, Flohé et al. 2003) und bei Patienten nach kardiopulmonalen Bypassoperationen (Börgermann et al. 2007). Ähnlich wie in der vorliegenden Studie konnten Tschakowsky et al. 2002 eine spontane Erholung der HLA-DR Expression innerhalb von zehn bis 14 Tagen nach Beginn der Immunparalyse bei 23 Patienten mit schwerer Sepsis beobachten.

Wie eingangs erwähnt erfolgte der Studieneinschluss der Patienten nur bei sicher fallenden Interleukin 6 Werten. Unsere gemessenen IL6 Werte zeigen nach dem initialen Abfall in beiden Gruppen einen sich kaum unterscheidenden Verlauf mit vereinzelt Spitzen, die für sogenannte „Second“ oder „Third Hit“ Ereignisse stehen. Ursächlich für eine solche Episode können ein erneuter septischer Schub durch zum Beispiel nosokomiale Infektionen, große Sekundäroperationen oder andere Faktoren sein, die zu einer immunologischen Aktivierung führen. Hierbei fallen die gemessenen Werte in der Verumgruppe tendenziell deutlich höher aus, ohne sich jedoch statistisch signifikant zu unterscheiden. Dies könnte wie im Fall von TNF $\alpha$  zumindest Hinweis auf eine gesteigerte Immunantwort sein. Diese Tendenz zu höheren Werten in Serumproben von Patienten, die GM-CSF als Studienmedikation *ex* und *in vivo* erhielten, wurde von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls gezeigt (Mels et al. 2001, Flohé et al. 1999, Williams et al. 1998, Hennemann et al. 1998). Nierhaus et al. hingegen konnten 2003 in ihrer *in vivo* Studie keine erhöhten IL6 Serumspiegel unter GM-CSF Behandlung feststellen. Zwar umfasste diese Studienpopulation wie in unserer Untersuchung Patienten mit Immunparalyse,

jedoch war die Studienlänge mit drei Tagen deutlich kürzer, so dass der direkte Vergleich der Ergebnisse nur bedingt möglich ist.

Das Verhältnis der pro- und antiinflammatorischen Zytokine IL6 und IL10 ist als Marker für Erkrankungsschwere und Prognose bei Sepsis beschrieben worden (Taniguchi et al. 1999). Die in der vorliegenden Untersuchung bestimmten IL6/IL10 Verhältniswerte zeigen für die ersten zwei Wochen einen vergleichbaren Verlauf in beiden Studiengruppen. Danach kommt es zu einem starken Anstieg der Werte in der Placebogruppe, was auf deutlich erhöhte IL6 Werte bei einem einzelnen Patienten und gleichzeitig im Verhältnis niedrigen IL10 Werten zurückzuführen ist. Dies verzerrt den Kurvenverlauf etwas. Somit ist die Aussagekraft unter der vorliegenden Fragestellung begrenzt.

Studien mit GM-CSF, die auch den Verhältniswert beider Zytokine untersucht haben, gibt es nach unserem Kenntnisstand nicht.

Die Messwerte der Routineentzündungsmarker CRP und PCT wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen auf. Beide Marker zeigten einen deutlichen Abfall der Messwerte nach Beginn der Intervention mit GM-CSF, gleiches gilt jedoch auch für die Kontrollgruppe. Das CRP steigt bei beiden Behandlungsgruppen in der zweiten beziehungsweise dritten Woche spontan wieder an. Ursächlich hierfür sind die ermittelten Serumspiegel bei wenigen Patienten. Da unter anderem IL6 die Produktion und Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen stimuliert (Fraunberger et al. 2007), von denen das CRP eines der wichtigsten ist, und der Kurvenverlauf des IL6 mit dem des CRP in der Tendenz korreliert, liegt der Schluss nahe, dass der CRP-Anstieg mit möglichen „Second“ und „Third Hit“ Ereignissen in Zusammenhang steht, die sich in den gemessenen IL6 Werten widerspiegeln.

Der grundlegende Trend zu einem Abfall der Messwerte nach Studienbeginn bei septischen Patienten korreliert mit den Ergebnissen anderer Beobachtungs- und Interventionsstudien (Nierhaus et al. 2003, Tschaiowski et al. 2002).

Wie bei GM-CSF mit seinen myeloproliferativen Eigenschaften zu erwarten, zeigt sich in der Verumgruppe ein deutlicher, für den zweiten bis 16. Tag statistisch signifikanter Unterschied der Leukozytenanzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Die gemessenen Leukozytenzahlen stiegen um das bis zu 2,2-fache des Ausgangswerts auf im Mittel 37.000/nl. In der letzten Studienwoche fiel die Leukozytenzahl in der Behandlungsgruppe wieder auf mit der Placebogruppe vergleichbare Werte ab. Ursächlich hierfür könnte eine über den Studienzeitraum entstandene Toleranzentwicklung des myeloproliferativen Gewebes sein. Vergleichbare Beobachtungen haben andere Autoren in Interventionsstudien mit GM-CSF nicht gemacht (Orozco et al. 2006, Rosenbloom et al. 2005, Nierhaus et al. 2003, Mels et al. 2001), jedoch ist bei keiner dieser Studien ein vergleichbar langer Interventions- und Beobachtungszeitraum gewählt worden.

Die klinische Beobachtung der Patienten bot keinen Anhalt für eine relevante Nebenwirkung der Studienmedikation. Insbesondere fand sich keine Verschlechterung der respiratorischen Funktion der Patienten, was als eine der gravierendsten Nebenwirkungen beschrieben worden ist, die bei der Gabe von GM-CSF auftreten kann. Allerdings sank die Thrombozytenzahl in der Behandlungsgruppe auf ein Niveau von unter 50.000/nl, was auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten der Myelopoese unter der GM-CSF-Wirkung zurückzuführen sein kann.

Die Ergebnisse für den Outcome Score APACHE II sowie die Verlaufsscores MODS und SOFA ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen der Verum- und der Kontrollgruppe. Damit konnte gezeigt werden, dass die beiden Gruppen hinsichtlich ihrer Erkrankungsschwere durchaus vergleichbar waren. Diese Score-Systeme eignen sich jedoch nicht, um sichere Aussagen über die Individualprognose eines Patienten zu machen (Müller-Werdan et al. 2005). Es bedarf einer weiteren Überarbeitung und Verbesserung dieser Systeme, um die

komplexen pathologischen Abläufe, die die Entwicklung und den Verlauf von SIRS und Sepsis steuern, besser abzubilden (Marshall 2005).

Abschließend lässt sich festhalten, dass bisher bezüglich Umfang und Dauer keine vergleichbare Studie zur immunmodulatorischen *in vivo* Wirkung von rhGM-CSF bei SIRS und Sepsis veröffentlicht worden ist. Insbesondere ist der Einfluss auf zentrale Zytokine der Immunantwort bisher wenig untersucht worden. Die Interventionsdauer der in diesem Abschnitt mit unseren Ergebnissen vergleichend diskutierten GMCSF *in vivo* Studien betrug im Mittel zwischen drei und sieben Tagen. Der Umfang der berücksichtigten Parameter zur Erfassung und Objektivierung der Medikamentenwirkung reichte von lediglich klinischer Beobachtung oder Erfassung von hämatologischen Markern (Orozco et al. 2006, Bilgin et al. 2001) bis zur Bestimmung von immunologischer Zellfunktion oder Oberflächenmolekülen, beziehungsweise pro- und antiinflammatorischen Marker sowie Scorewerten (Presneill et al. 2002, Nierhaus et al. 2003, Rosenbloom et al. 2005). Einen grundlegenden Unterschied gilt es zu betonen. Bis auf die vorliegende Untersuchung hat keine der bisher veröffentlichten GM-CFS-Interventionsstudien das Patientenkollektiv in vergleichbarer Weise immunologisch stratifiziert, um den wahrscheinlich optimalen Zeitpunkt für die Gabe der Studienmedikation zu bestimmen. Der Einschluss der Patienten erfolgte in der Regel, sobald die Patienten die ACCP/SCCM Leitlinien für SIRS und Sepsis erfüllten, ohne jedoch die Immunantwortlage der Patienten genauer zu bestimmen.

In den letzten Jahren ist es in der Intensivmedizin gelungen, mittels „Early Goal Directed Organ Support Therapy“, gezielt und frühzeitig gegebener Antibiotika sowie durch eine Verbesserung des Beatmungsmanagements und den Einsatz extrakorporaler Nierenersatzverfahren den septischen Schock in der Frühphase besser zu beherrschen. Viele der Sepsispatienten versterben dann jedoch im weiteren Verlauf an nosokomial erworbenen, infektiösen Erkrankungen in der Phase der Immunparalyse. Daraus ergibt sich die logische Konsequenz, weiter

nach Therapiemöglichkeiten zu suchen, die in dieser Phase der Erkrankung zu einer Senkung der Morbidität und Mortalität beitragen können. Um die in der Vergangenheit enttäuschenden Ergebnisse immunmodulatorischer Therapieansätze zu verbessern, scheint es unabdingbar, eine immunologische Charakterisierung des individuellen Patienten vorzunehmen, um konsekutiv eine möglichst maßgeschneiderte Immuntherapie beginnen zu können. Diese Forderung ist in der Literatur immer wieder aufgestellt worden (Scheffold et al. 2008, Marshall 2005, Vincent et al. 2002, Angus 2000), fand aber bisher wenig Berücksichtigung.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Phase der Immunparalyse des septischen Patienten. Das Patientenkollektiv wurde im Hinblick auf die immunologische Kompetenz stratifiziert, bevor eine Intervention mit GM-CSF begonnen wurde, um so den Interventionszeitpunkt möglichst zu optimieren. Da die zellvermittelte Immunkompetenz durch eine Vielzahl unterschiedlichster Mediatoren gesteuert wird und der Einfluss von GM-CSF *in vivo* auf diese bisher wenig erforscht ist, lag hier der Untersuchungsschwerpunkt dieser Studie. Es konnte demonstriert werden, dass GM-CSF insbesondere in der ersten Phase der Immunparalyse die Zytokinproduktion zu steigern vermochte. Dies spricht für eine verbesserte Aktivität des zellulären Immunsystems zu einem Zeitpunkt, zu dem die Anfälligkeit für einen „Second Hit“ durch eine opportunistische Erkrankung und der damit verbundenen Erkrankungsspirale bis hin zu einem „chronischen Multiorganversagen“ (Scheffold et al. 2008) hoch ist. Die Erkenntnisse dieser Studie ergänzen das Gesamtverständnis für mögliche immunmodulatorische Therapieansätze und zeigen, dass es weiterer differenzierter, standardisierter und multizentrischer Studien mit größeren Patientenzahlen bedarf, um die nahezu unverändert hohe Morbidität und Mortalität bei Sepsis durch die Entwicklung neuer, gezielter Strategien zu senken.

## 5 Zusammenfassung

SIRS und Sepsis sind trotz großer Fortschritte in Erforschung und Therapie der Erkrankung immer noch eine der häufigsten Todesursachen in der Intensivmedizin. Es handelt sich um eine komplexe Krankheitsentität, bei der hyper- und hypoinflammatorische Phasen abwechselnd oder gleichzeitig vorliegen. Diese werden durch eine Vielzahl von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren gesteuert, deren Funktion und Vernetzung bisher nur wenig verstanden ist. In der Phase der zellulären Immunparalyse ist der Intensivpatient anfällig für nosokomiale Infektionen. Für den humanen Wachstumsfaktor GM-CSF konnte gezeigt werden, dass er *ex vivo* eine gestörte zelluläre Immunantwort wieder herstellen kann.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Wirkung von GM-CSF auf Faktoren der humoralen Immunantwort *in vivo* bei Patienten im Zustand der Sepsis bedingten Immunparalyse zu untersuchen. Die hierbei gemachten Beobachtungen weisen daraufhin, dass die im Zuge von schwere Sepsis und septischen Schock gestörte immunologische Kompetenz sich im Krankheitsverlauf über zehn bis 14 Tage spontan erholen kann. Während des Zustands der Immunparalyse ist das Risiko einer Sekundärinfektion immens erhöht. GM-CSF scheint in der Lage zu sein, auch *in vivo* die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen im Sinne einer verbesserten Immunantwort zu stimulieren und damit den Zeitraum bis zur spontanen Wiedererlangung immunologischer Abwehrfähigkeiten zu verkürzen sowie so möglicherweise das „Outcome“ des Intensivpatienten zu verbessern. Es bedarf jedoch weiterer und größerer Studien, um diese Aussagen zu sichern und die Messung der immunologischen Kompetenz zur zuverlässigen Stratifizierung des Intensivpatienten zu standardisieren. Die letzten 20 Jahre der Sepsisforschung haben gezeigt, dass man von der Idee einer einzelnen „Magic Bullet“ abrücken muss. Vielmehr bedarf es eines vielgleisigen, für den Patienten



maßgeschneiderten therapeutischen Vorgehens, das sich an der jeweiligen Phase der Erkrankung orientiert. Die hyperinflammatorische Frühphase der Sepsis wird in der modernen Intensivmedizin immer besser beherrscht, so dass das Stadium der Immunparalyse in den Focus der Forschung rücken sollte. Wenn die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden sollten, wäre GM-CSF ein potentes Therapeutikum, um immunmodulatorisch in den Krankheitsverlauf einzugreifen.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ACCP	American College of Chest Physicians
ACVB	Aorto-Coronarer-Venen-Bypass
AK	Antikörper
APACHE II	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II
APC	Antigen präsentierende Zellen
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CRP	C reaktives Protein
FACS	Fluorescence activated Cell Sorting
HLA-DR	Human Leukocte Antigen DR
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
MARS	Mixed Antiinflammatory Response Syndrom
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
MODS	Multiple Organ Disfuction Score
MOV	Multiorganversagen
PAMP	Pathogen-associated Molecular Patterns
PCT	Procalcitonin
PPR	Pattern-Recognition Receptors
rhGM-CSF	recombinant human Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome

SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SPSS	Statistical Package for the Social Science
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TLR	Toll-like Receptors
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$

## 7 Literaturverzeichnis

Abraham E. et al.: Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet*. 1998 Mar 28; 351(9107):929-33.

Adrie C. et al.: The inflammatory balance in human sepsis. *Intensive Care Med*. 2000 Apr; 26(4):364-75.

Angus D. C. et al.: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001 Jul; 29(7):1472-4.

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

Assicot M. et al.: High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet*. 1993 Feb 27; 341(8844):515-8.

Bilgin K. et al.: A randomized trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in neonates with sepsis and neutropenia. *Pediatrics*. 2001 Jan; 107(1):36-41.

Bone R. C. et al.: A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 1987 Sep 10; 317(11):653-8.

Bone R.C. et al.: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992 Jun; 101(6):1644-55

Bone R.C. et al.: Sepsis: A new Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. *Chest* 1997; 112; 235-243.

Bone R.C.: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*. 1996 Jul; 24(7):1125-8

Bruin-Buisson C. et al.: 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*. 1995 Sep 27; 274(12):968-74.

- Chantry D. et al.: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces both HLA-DR expression and cytokine production by human monocytes. *Cytokine*. 1990 Jan; 2(1):60-7.
- Cunnington A. et al.: New therapies for sepsis. *Curr Top Med Chem*. 2008; 8(7):603-14.
- de Waal Malefyt R. et al.: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991 Nov 1; 174(5): 1209-20.
- Dellinger R. P. et al.: Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med*. 2008 Jan; 36(1):296-327
- Döcke W. D. et al.: Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem*. 2005 Dec; 51(12):2341-7.
- Engel C. et al.: Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*. 2007 Apr; 33(4):606-18.
- Flohé S. et al.: Influence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on whole blood endotoxin responsiveness following trauma, cardiopulmonary bypass, and severe sepsis. *Shock*. 1999 Jul; 12(1):17-24.
- Flohé S. et al.: Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the immune response of circulating monocytes after severe trauma. *Crit Care Med*. 2003 Oct; 31(10):2462-9.
- Fraunberger P. et al.: Biomarker bei Sepsis und Entzündung. *J Lab Med* 2007; 31(6): 294-309.
- Fumeaux T. et al.: Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Dec 1; 166(11):1475-82.
- Gabay C. et al.: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999 Feb 11; 340(6):448-54.
- Hack C. E. et al.: Role of Cytokines in Sepsis. *Adv Immunol*. 1997; 66:101-95.
- Hamilton J. A.: Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jul; 8(7):533-44.

Hartung T. et al.: Blood cytokine response of low-dose molgramostim (rhGM-CSF)-treated patients. *Cytokine*. 2000 Oct; 12(10):1570-4.

Hayes B. F. et al: Einführung in das Immunsystem aus Dietel, Suttorp, Zeitz (Hrsg.) *Harrisons Innere Medizin, deutsche Ausgabe, 16. Aufl.(2005)*, S. 2052 - 2073, ABW Wissenschaftsverlag Berlin.

Hennemann B. et al.: Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor treatment on phenotype, cytokine release and cytotoxicity of circulating blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Br J Haematol*. 1998 Sep; 102(5):1197-203.

Höflich C., Volk H.-D.: Immunmodulation in Sepsis. *Chirurg* 2002; 73: 1100-1104.

Holländer G. A. et al.: Das natürliche Immunsystem aus Georg A. Holländer (Hrsg.) *Immunologie Grundlagen für Klinik und Praxis*, 1. Aufl. 2006, S. 7 - 38, Elsevier Urban und Fischer Verlag München.

Hörner C. et al.: Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis. *Anästhesist* 2004; 53:10-28.

Hübel K. et al.: Therapeutic use of cytokines to modulate phagocyte function for the treatment of infectious diseases: current status of granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma. *J Infect Dis*. 2002 May 15; 185(10):1490-501.

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

Kox W. J. et al.: Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med*. 2000; 26 Suppl 1:S124-8.

Kreutz M. et al.: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates lipopolysaccharide (LPS)-binding and LPS-response of human macrophages: inverse regulation of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10. *Immunology*. 1999 Dec; 98(4):491-6.

Lendemans S.: Differential immunostimulating effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and interferon gamma (IFNgamma) after severe trauma. *Inflamm Res*. 2007 Jan; 56(1):38-44.

- Levy M.M. et al.: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. 2003 Apr;31(4):1250-6.
- Marshall J. C. et al.: Biomarkers of sepsis. Crit Care Med. 2009 Jul; 37(7):2290-8.
- Marshall J. C. et al.: Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. Crit Care Med. 1995 Oct; 23(10):1638-52.
- Marshall J. C.: The staging of sepsis: understanding heterogeneity in treatment efficacy. Crit Care. 2005; 9(6):626-8.
- McCloskey R. V. et al.: Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Ann Intern Med. 1994 Jul 1; 121(1):1-5.
- Mels A. K. et al.: Immune-stimulating effects of low-dose perioperative recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients operated on for primary colorectal carcinoma. Br J Surg. 2001 Apr; 88(4):539-44.
- Moerer O. et al.: A German national prevalence study on the cost of intensive care: an evaluation from 51 intensive care units. Crit Care. 2007; 11(3):R69.
- Müller-Werdan U. et al. : Abriss der Pathophysiologie als Grundlage der Therapie aus Werdan, Schuster, Müller-Werdan (Hrsg.) Sepsis und MODS, 4. Aufl.(2005), S.23 - 61, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Müller-Werdan U. et al. : Die Frau als Sepsispatientin aus Werdan, Schuster, Müller-Werdan (Hrsg.) Sepsis und MODS, 4. Aufl.(2005), S.573 - 577, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Müller-Werdan U. et al. : Sepsismarker, Sepsismonitoring, Verlaufsbeurteilung der Sepsis aus Werdan, Schuster, Müller-Werdan (Hrsg.) Sepsis und MODS, 4. Aufl.(2005), S.63 - 76, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Napolitano L. M.: Immune stimulation in sepsis: to be or not to be? Chest. 2005 Jun; 127(6):1882-5.
- Nebe C.T.: Flow Cytometric Analysis of Immunoparalysis. Clinical Laboratory 1998; 44:441-46.
- Nepom et al.: Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) aus Dietel, Suttorp, Zeitz (Hrsg.) Harrison's Innere Medizin, deutsche Ausgabe, 16. Aufl.(2005), S. 2075 - 2082, ABW Wissenschaftsverlag Berlin .

Nierhaus A. et al.: Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2003 Apr; 29(4):646-51. Epub 2003 Feb 21.

Opal S. M. et al.: Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med.* 1997 Jul; 25(7):1115-24.

Orozco H. et al.: Molgramostim (GM-CSF) associated with antibiotic treatment in nontraumatic abdominal sepsis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arch Surg.* 2006 Feb;141(2):150-3.

Presneill J. J. et al.: A randomized phase II trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in severe sepsis with respiratory dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Jul 15; 166(2):138-43.

Presneill J. J. et al.: Plasma granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor levels in critical illness including sepsis and septic shock: relation to disease severity, multiple organ dysfunction, and mortality. *Crit Care Med.* 2000 Jul; 28(7):2344-54.

Rapoport A. P. et al.: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): receptor biology, signal transduction, and neutrophil activation. *Blood Rev.* 1992 Mar;6(1):43-57.

Rivers E. et al.: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2001 Nov 8;345(19):1368-77.

Root R. K. et al.: Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: comparisons and potential for use in the treatment of infections in nonneutropenic patients. *J Infect Dis.* 1999 Mar; 179 Suppl 2:S342-52.

Rosenbloom A. J. et al.: Effect of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor therapy on leukocyte function and clearance of serious infection in nonneutropenic patients. *Chest.* 2005 Jun; 127(6):2139-50.

Schefold J. C. et al.: Sepsis: Time has come to focus on the later stages. *Med Hypotheses.* 2008;71(2):203-8.

Taniguchi T. et al.: Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med.* 1999 Jul; 27(7):1262-4.



Trapnell B. C.: Granulocyte macrophage-colony stimulating factor augmentation therapy in sepsis: Is there a role? *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Jul 15; 166(2):129-30.

Tschaikowsky K. et al.: Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients. *Crit Care Med.* 2002 May; 30(5):1015-23.

Vincent J. L. et al.: Sepsis diagnosis and management: work in progress. *Minerva Anestesiol.* 2006 Mar;72(3):87-96.

Vincent J. L. et al.: The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 1996 Jul; 22(7):707-10.

Vincent J.-L. et al.: Clinical trials of immunomodulatory therapies in severe sepsis and septic shock. *Clin Infect Dis.* 2002 Apr 15;34(8):1084-93.

Vincent J.-L. et al.: Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006 Feb;34(2):344-53.

Volk H. D. et al.: Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem Immunol.* 2000;74:162-77.

Volk H.D. et al.: Monocyte deactivation-rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med.* 1996 Oct; 22 Suppl 4:S474-81.

Wahl H.G. et al.: Sepsis und Sepsismarker - Update. *J Lab Med.* 2003; 27 (11/12): 431-439.

Williams M. A. et al.: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces activation and restores respiratory burst activity in monocytes from septic patients. *J Infect Dis.* 1998 Jan; 177(1):107-15.

Williams M. A. et al.: Monocyte anergy in septic shock is associated with a predilection to apoptosis and is reversed by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ex vivo. *J Infect Dis.* 1998 Nov; 178(5):1421-33.

Wolk K. et al.: Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood.* 2000 Jul 1; 96(1):218-23.

## 8 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Professor Dr. med. K. G. Kreymann für die freundliche Überlassung des Themas und die gewährte Unterstützung herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Axel Nierhaus für die Betreuung und Hilfe bei der Durchführung der Studie und bei der Erstellung dieser Arbeit.

Des Weiteren gilt mein ausdrücklicher Dank Frau Dr. med. Barbara Paddags, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, Frau Anke Zapfe in Erinnerung an die vielen gemeinsamen Stunden sowohl auf den Intensivstationen als auch im Labor, sowie allen anderen Mitgliedern der „Sepsis-AG“.

Auch möchte ich allen MTAs in der Transfusionsmedizin, dem Zentral- und dem Hormonlabor, die Anteil an dieser Studie hatten, für die tatkräftige Unterstützung und ihre Geduld bei der Einarbeitung und Vermittlung von technischen Grundlagen danken. Gleiches gilt für das Personal der Intensivstationen „ANITO“ und vormals „ANITA“, die jederzeit hilfsbereit waren.

And last but not least möchte ich meinem Vater Axel Steigemann und meiner Schwester Jantje Steigemann, M.Sc., sowie meiner Freundin Dr. med. Iska Gellermann danken, zum einen für die unermüdliche Hilfe beim Korrekturlesen der Arbeit, das Verständnis und die vielen aufmunternden Worte während des Schreibens, und zum anderen für die Unterstützung während meines Medizinstudiums. Ohne Dich, ohne Euch wäre vieles so nicht möglich gewesen!

## 9 Lebenslauf

GELÖSCHT AUS DATENSCHUTZGRÜNDEN

GELÖSCHT AUS DATENSCHUTZGRÜNDEN

## 10 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 01: SIRS-Kriterien nach der ACCP/SCCM Consensus Conference von 1992
- Tabelle 02: Zusammenfassung der ACCP/SCCM Definitionen für Sepsis und mit ihr einhergehende Krankheitsbilder.
- Tabelle 03: Demographie
- Tabelle 04: Aufnahmediagnosen und Infektiologie
- Tabelle 05: Assessment möglicher Nebenwirkungen.

## 11 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 01: Darstellung des Zusammenhangs von SIRS und Sepsis, modifiziert nach Bone et al. 1992
- Abb. 02: Möglicher Zeitverlauf der Immunantwort, modifiziert nach Wahl et al. 2003
- Abb. 03: Verteilung der Infektionsdiagnosen
- Abb. 04: Mittelwerte und Standardfehler von GM-CSF Plasmaspiegel.
- Abb. 05: Mittelwerte und Standardfehler des basalen TNF $\alpha$ -Plasmaspiegels.
- Abb. 06: Mittelwerte und Standardfehler der TNF $\alpha$ -Plasmaspiegel nach ex vivo Vollblutstimulation mit Lipopolysaccharid.
- Abb. 07: Mittelwerte und Standardfehler der Il10-Plasmaspiegel.
- Abb. 08: Mittelwerte und Standardfehler der HLA-DR Expression auf Monozyten.
- Abb. 09: Mittelwerte und Standardfehler des Il6 Plasmaspiegels.
- Abb. 10: Mittelwerte und Standardfehler des Il6/Il10 Verhältnisses.
- Abb. 11: Mittelwerte und Standardfehler des CRP Plasmaspiegels.
- Abb. 12: Mittelwerte und Standardfehler von Procalcitonin.
- Abb. 13: Mittelwerte und Standardfehler der Leukozytenanzahl.
- Abb. 14: MODScore im Verlauf.
- Abb. 15: SOFA Score im Verlauf.

## **12 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 Erscheinungsjahr), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

---