

Aus der Universitätsklinik für Anästhesiologie  
mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

Der Einfluss von niedrig dosiertem Hydrocortison auf die  
Monozytenfunktion und HLA-DR Expression im septischen Schock

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tilmann Paul Walter Engelhardt

aus Göttingen

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. med. D. Keh
2. Priv.-Doz. Dr. med. J. Schefold
3. Prof. Dr. med. M. Ragaller

Datum der Promotion: 30.11.2012

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.1	Definitionen – SIRS, Sepsis, septischer Schock, Multiorganversagen	5
1.2	Epidemiologie des septischen Schocks	7
1.3	Das Immunsystem (immunologische Grundlagen)	8
1.3.1	Angeborene (unspezifische) und adaptive (spezifische) Immunantwort	8
1.3.2	Monozyten	8
1.3.3	HLA-DR	9
1.3.3.1	Struktur des HLA-DR Rezeptors	9
1.3.3.2	Antigenpräsentation über HLA-DR	10
1.3.3.3	Regulation der HLA-DR Expression	10
1.3.4	Monozytenaktivierung	12
1.3.5	Rolle der CD4+ Zellen bei der Monozytenaktivierung	13
1.4	Pathophysiologie des septischen Schocks	14
1.4.1	Ungleichgewicht auf Grund einer unkontrollierten Entzündungsreaktion	14
1.4.2	Mechanismus der Immunsuppression im septischen Schock	15
1.4.3	HLA-DR Expression und Monozytenfunktion im septischen Schock	16
1.4.4	Pro- und antiinflammatorisches Gleichgewicht	17
1.5	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse)	17
1.5.1	Regelmechanismen der HPA-Achse	18
1.5.2	Beeinträchtigung der HPA-Achse im septischen Schock	18
1.5.3	Nachweis einer NNR-Insuffizienz	19
1.5.4	Periphere Cortisolresistenz und Critical illness-related corticosteroid insufficiency (CIRCI)	20
1.6	Glucocorticoide	21
1.6.1	Wirkmechanismus von Cortisol	21
1.6.1.1	Genomischer Wirkmechanismus	22
1.6.1.2	Nicht-genomischer Wirkmechanismus	23
1.6.2	Immunologischer Effekt der Glucocorticoide	23
1.6.2.1	Antiinflammatorische Eigenschaften	24
1.6.2.2	Immunstimulatorische Wirkung der Glucocorticoide	24
1.7	Glucocorticoide im septischen Schock	25
1.7.1	Hoch dosierte Glucocorticoide im septischen Schock	25
1.7.2	Niedrig dosierte Glucocorticoide im septischen Schock	26
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>STUDIENDESIGN UND METHODEN</b>	<b>29</b>
3.1	Studiendesign	29
3.1.1	Einschlusskriterien	30
3.1.2	Ausschlusskriterien	31
3.2	Methoden	32
3.2.1	Studienmedikation	32
3.2.2	ACTH-Test	32
3.2.3	Durchflusszytometrie	33
3.2.3.1	Prinzip des Durchflusszytometers	33
3.2.3.2	Färben von Oberflächenmolekülen	33
3.2.3.3	Quantitative Messung der HLA-DR Expression	34
3.2.4	Monozytenstimulation	35
3.2.5	Zytokinbestimmung mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays)	35
3.2.5.1	Prinzip des Sandwich ELISA	35

3.2.5.2	Messprotokoll	35
<b>3.3</b>	<b>Statistik</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Effekt von Hydrocortison auf die Monozytenpopulation</b>	<b>40</b>
4.1.1	Monozytenanteil (%) nach Therapiegruppen	40
4.1.2	Monozytenanteil (%) nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe	41
4.1.3	Monozytenzahl (1/nl) nach Therapiegruppen	42
4.1.4	Monozytenzahl (1/nl) nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe	43
<b>4.2</b>	<b>Effekt von Hydrocortison auf die HLA-DR Expression auf Monozyten</b>	<b>44</b>
4.2.1	HLA-DR Rezeptoren pro Zelle nach Therapiegruppen	44
4.2.2	HLA-DR Rezeptoren pro Zelle nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe	45
4.2.3	HLA-DR-Expression auf Monozyten (MFI) nach Therapiegruppen	46
4.2.4	HLA-DR Expression auf Monozyten (MFI) nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe	47
<b>4.3</b>	<b>Effekt von Hydrocortison auf die Monozytenfunktion</b>	<b>49</b>
4.3.1	IL-6 Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Therapiegruppen (pg/ml)	49
4.3.2	IL-6 Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe (pg/ml)	50
4.3.3	IL-10 Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Therapiegruppen (pg/ml)	51
4.3.4	IL-10 Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe (pg/ml)	52
4.3.5	IL-6/IL-10 Quotient nach LPS-Stimulation nach Therapiegruppen	53
4.3.6	IL-6/IL-10 Quotient nach LPS-Stimulation nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe	54
4.3.7	TNF- $\alpha$ Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Therapiegruppen (pg/ml)	55
4.3.8	TNF- $\alpha$ Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe (pg/ml)	56
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>57</b>
<b>5.1</b>	<b>Patientenkollektiv</b>	<b>57</b>
<b>5.2</b>	<b>Monozytenpopulation</b>	<b>58</b>
<b>5.3</b>	<b>HLA-DR</b>	<b>59</b>
<b>5.4</b>	<b>Monozytenfunktion</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>72</b>

# 1 Einleitung

Der septische Schock ist die schwerste Komplikation einer Sepsis und kann tödlich verlaufen. In den letzten Jahren wurden bereits enorme Fortschritte gemacht zur Erkenntnis des Pathomechanismus und der Therapie dieses schweren Krankheitsbildes. Allerdings bleiben bis heute viele Fragen ungeklärt und aktuelle Therapiekonzepte werden stetig geändert. Neben einer kausalen (Infektsanierung, Antibiotikatherapie etc.) und supportiven Therapie (Volumentherapie, Katecholamine etc.) werden insbesondere die adjunktiven Therapien wie die Gabe von Hydrocortison in letzter Zeit kontrovers diskutiert.

Mit der CORTICUS-Studie, einer prospektiven, multinationalen, randomisierten Placebo-kontrollierten doppel-blind Studie zur Hydrocortisontherapie im septische Schock, erhoffte man sich eindeutige Ergebnisse, die Klarheit im Umgang mit Glucocorticoiden bei diesem Krankheitsbild bringen sollten (Sprung 2008). Allerdings wurde diese Hoffnung enttäuscht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Rahmen der CORTICUS-Studie gewonnen. Ziel war es, den immunologischen Effekt von niedrig dosiertem Hydrocortison im septischen Schock anhand der HLA-DR Rezeptorexpression auf Monozyten und deren Funktion (LPS-stimulierte Synthese von IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$ ) zu untersuchen. Hierzu wurden Blutproben der in der CORTICUS-Studie eingeschlossenen Patienten an Tag 1 (Baseline), Tag 3, 6, 12, 18 und 28 entnommen und hinsichtlich der immunologischen Parameter aufgearbeitet.

Im Rahmen der Einleitung werden zunächst Definitionen sepsisassoziierter Begriffe und die Epidemiologie des septischen Schocks erläutert. Im Weiteren soll spezieller auf die Pathophysiologie und die Glucocorticoidwirkung und –therapie im septischen Schock eingegangen werden, bevor nach Erläuterungen des Materials und der Methoden die Ergebnisse dargestellt werden. Abschließend erfolgt die Diskussion der Ergebnisse.

## 1.1 Definitionen – SIRS, Sepsis, septischer Schock, Multiorganversagen

Bereits im 4. Jahrhundert v. Chr. erkannte Hippokrates (ca. 460-370 v. Chr.) die Sepsis (gr. Σηπω, faul machen) als eine Erkrankung mit hohem Fieber, die nach einer Verwundung entsteht und mit Giften der Fäulnis seinen Ursprung nimmt. Lange Zeit blieben weitere pathophysiologische Erklärungen aus, aber mit der Arbeit von Ignaz Semmelweis (1818-1865) zur Sepsis im Wochenbett entwickelte sich eine moderne Sichtweise der Erkrankung. Zwar vermutete der Gynäkologe, dass der Ursprung der Sepsis durch ins Blut gelangte Leichenteile ausgelöst wird, aber mit der Begründung der Mikrobiologie durch Louis Pasteur (1822-1895) und Robert Koch (1843-1910) im 19. Jahrhundert legte Hugo Schottmüller (1867-1936) 1914 den Grundstein der modernen Sepsisdefinition: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ Diese auch als Trias „Herd, Streuung, Symptomatik“ zusammengefasste Beschreibung beruht zwar auf subjektiven, klinischen Beobachtungen, könnte aber dennoch zur

Diagnose einer Sepsis genügen. Oftmals ist jedoch der Nachweis einer Bakteriämie schwierig: in Abhängigkeit von der antibiotischen Vorbehandlung ist eine Bakteriämie nur bei durchschnittlich 30% Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock nachweisbar (Bates 1990; Bates 1997; Crowe 1998; Martin 2003). Bei 30% ist zwar nach klinischen Kriterien eine Infektion wahrscheinlich, kann aber nicht durch eine mikrobiologische Untersuchung gesichert werden (Vincent 1995; Alberti 2002). Häufig kommt es auch bei kritisch kranken Patienten zu einer körpereigenen entzündlichen Abwehrreaktion mit verschiedenen Organkomplikationen, die nicht auf einer Infektion beruht. Bedingt wird dieses systemisch inflammatorische Response-Syndrom (SIRS) beispielsweise durch Verbrennungen, ein schweres Trauma oder eine akute Pankreatitis (Levy 2003).

Da bis Anfang der 90er Jahre das Spektrum der Einschlusskriterien und Definitionen uneinheitlich blieb, war die Vergleichbarkeit von Studienergebnissen und die Empfehlung von Therapierichtlinien schwierig.

Auf eine einheitliche, internationale Definition der Sepsis konnte man sich erst 1991 auf der American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) Consensus Conference einigen (1992). Zusammen mit der Sepsis wurden auch andere Begrifflichkeiten geklärt:

#### Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS):

SIRS eine generalisierte hyperinflammatorische Reaktion des Körpers verschiedener Ursachen (s.o.), bei der mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sein müssen:

- Temperatur  $> 38^{\circ}\text{C}$  oder  $< 36^{\circ}\text{C}$
- Tachykardie ( $> 90$  Schläge/Minute)
- Tachypnoe ( $> 20$  Züge/Minute) oder Hyperventilation ( $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg ( $< 4,3$  kPa))
- Leukozytose ( $> 12000$  Zellen/ $\text{mm}^3$ ) oder Leukopenie ( $< 4000$  Zellen/ $\text{mm}^3$ ) oder Linksverschiebung ( $> 10\%$  unreife Zellen)

#### Sepsis:

Sepsis ist ein SIRS, das mit einer Infektion assoziiert ist. Die Infektion kann mit einer Bakteriämie, Virämie oder Fungämie einhergehen oder lokal beschränkt bleiben. Hierbei treten dann mikrobielle Toxine oder Zellbestandteile ins Blut über.

#### Schwere Sepsis:

Als schwere Sepsis wird das Krankheitsbild bezeichnet, das neben den oben genannten Sepsiskriterien noch durch eine Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotension charakterisiert ist. Zeichen der Hypoperfusion können u.a. Laktatazidose, Oligurie oder ein akut veränderter Bewusstseinszustand sein.

### Septischer Schock:

Der septische Schock, die schwerste Komplikation der Sepsis, ist zusätzlich durch eine Hypotension (systolischer Blutdruck < 90 mmHg oder einem mittleren arteriellen Druck < 65 mmHg) und einer Organdysfunktion gekennzeichnet, trotz adäquater intravenöser Flüssigkeitssubstitution.

### Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS):

Nachweis von Organdysfunktionen, wobei zur Aufrechterhaltung der Homöostase therapeutische Interventionen erforderlich sind.

Trotz dieser festgelegten Definition und vieler veröffentlichter Leitlinien ist die Diagnose einer Sepsis und eines septischen Schocks in der Praxis schwierig (Poeze 2004). Auf Grund dieser Schwierigkeiten werden regelmäßig Aktualisierungen der Symptome veröffentlicht, um das Erkennen einer Sepsis im Klinikalltag zu erleichtern (Levy 2003). Die Definitionen von 1991 haben aber bis heute nicht an Bedeutung verloren.

## **1.2 Epidemiologie des septischen Schocks**

Trotz vermehrter Forschung und zunehmendem Verständnis der Pathophysiologie von Sepsis und septischem Schock bleiben diese Krankheitsbilder weiterhin schwer therapierbar. Noch immer sind Sepsis und septischer Schock eine der häufigsten Todesursachen auf nicht-kardiologischen Intensivstationen mit zunehmender Inzidenz:

2003 ergab eine Analyse von Martin et al. eine jährliche Inzidenz einer Sepsis von 240,4 Fällen pro 100000 Einwohnern, welches einen Anstieg seit 1979 (82,7 pro 100000 Einwohner) um 9% jährlich bedeutet (Martin 2003). Drei von 1000 Menschen erkranken jährlich an einer schweren Sepsis, die 2% der Krankenhausaufenthalte ausmachen (Angus 2001). Davon entwickeln ca. 3% einen septischen Schock (Rangel-Frausto 1998), die wiederum 10% der intensivpflichtigen Patienten auf den Intensivstationen stellen (Annane 2003). Insgesamt liegt im Krankenhaus die Mortalität der schweren Sepsis bei 30% und für den septischen Schock bei 50 – 60% (Rangel-Frausto 1998; Angus 2001; Annane 2003). Annane et al. stellten dabei einen Häufigkeitsgipfel in der sechsten Lebensdekade fest (Annane 2003). Einige Patienten haben dabei ein erhöhtes Risiko an einem septischen Schock zu erkranken. Darunter zählen Patienten mit einem Malignom, einer Immundefizienz, chronischer Organinsuffizienz, iatrogene Gründe (Alberti 2002; Annane 2003; Martin 2003) und genetische Faktoren (Sorensen 1988) wie Geschlechtsspezifität (Männer häufiger als Frauen) (Hubacek 2001), nicht-weißen Ursprungs in Nordamerika (Martin 2003) und der Polymorphismus in den Genen der Immunmodulation (Lin and Albertson 2004).

In Deutschland lag 2003 die Prävalenz unter 3877 Intensivpatienten bei 12,4% an einer Sepsis und bei 11,0% an einer schweren Sepsis oder septischen Schock zu erkranken. Die Intensivstationsmortalität lag bei 48,4% gegenüber einer Krankenhausmortalität von 55,2% (Engel 2007) .

Nicht nur aus medizinischer Sicht ist dieses Krankheitsbild bedeutend, sondern auch aus sozioökonomischer Perspektive: die sepsis-bedingten Krankenhauskosten in den USA betragen schätzungsweise 17 Milliarden Dollar pro Jahr (Angus 2001). Die durchschnittlichen Kosten des Intensivaufenthaltes in Deutschland liegen bei 23297 Euro pro Patient mit schwerer Sepsis, wobei die Kosten der nicht-Überlebenden mit 25446 Euro über denen der Überlebenden mit 21984 liegt (Moerer 2002) .

### **1.3 Das Immunsystem (immunologische Grundlagen)**

Als Schutz vor Mikroorganismen steht dem Körper ein umfangreiches Arsenal von Abwehrmechanismen zur Verfügung, die sich in das angeborene (unspezifische) Abwehrsystem und in das adaptive (spezifische) Immunsystem einteilen lassen.

#### **1.3.1 Angeborene (unspezifische) und adaptive (spezifische) Immunantwort**

Das unspezifische Abwehrsystem wird in der frühen Phase der Infektabwehr tätig und bekämpft Krankheitserreger unabhängig von einem vorhergegangenen Kontakt des Organismus mit dem Keim. Die angeborene Immunantwort beinhaltet anatomische und physiologische Barrieren wie Epithelien, eine Aktivierung des Komplementsystems, Phagozytose durch Makrophagen, natürliche Killerzellen und neutrophile Zellen und die Freisetzung von Zytokinen wie z.B. IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite.

Zum spezifischen (adaptiven) Immunsystem gehören die B- und T-Lymphozyten. Ihre Aufgabe ist es durch klonale Selektion bei Erstkontakt mit einem fremden Antigen eine Immunantwort zu optimieren und diese zu verstärken. Im Wesentlichen wird dies durch die Produktion molekularer Antikörper und dem phagozytosesteigernden Effekt der T-Helfer-Zellen auf Makrophagen erreicht. Der Körper erwirbt eine lebenslange Immunität.

Beide Immunsysteme, spezifisches und unspezifisches, stehen in einem engen Zusammenhang. So verbessern beispielsweise antigengebundene Antikörper die Eliminierung der Antigene durch Phagozytose oder bewirken eine Lyse infolge der Aktivierung des Komplementsystems; aktivierte Makrophagen fördern umgekehrt über Zytokine die Proliferation von CD4+ T-Helfer-Zellen und können so beispielsweise die Antikörperproduktion verstärken. Nur durch eine volle Funktionstüchtigkeit beider Systeme ist eine optimale Abwehr gegen Fremdartigene gewährleistet (Abbas 2007).

#### **1.3.2 Monozyten**

Monozyten machen 3 – 6 % der Leukozytenpopulation aus und gehören mit einem Durchmesser von 15-20  $\mu\text{m}$  zu den größten weißen Blutkörperchen. Nach Differenzierung und Reifung im



Knochenmark, der Monozytopoese, die durch den granulocytemacrophage-colony-stimulating-factor (GM-CSF) und den macrophage-colonystimulating-factor (M-CSF) gesteuert wird (Nicola and Peterson 1986), zirkulieren die reifen Monozyten für 8 – 70 Stunden (Halbwertszeit T<sub>50</sub> = 15 – 20 Stunden) (Whitelaw 1972) im Blutkreislauf. Innerhalb dieses Zeitraums wandern sie bei Kontakt mit Entzündungsmediatoren, welche die Chemotaxis und die Diapedese an den Ort der Inflammation vermitteln, in das betroffene Gewebe. Während der Einwanderung differenzieren Monozyten abhängig vom Zielgewebe in gewebespezifische Makrophagen, die für Monate bzw. Jahre im Gewebe persistieren können.

Monozyten besitzen einen charakteristischen (v. griech. monos, „einzig“) großen Kern von meist bohnenartiger Form. In ihrem verhältnismäßig kleinen Zytoplasma finden sich neben reichlich Mitochondrien und Ribosomen, ein ausgeprägtes rauhes endoplasmatisches Retikulum sowie ein gut ausgebildeter Golgi-Apparat. Dies deutet auf eine besondere Synthesefähigkeit von sekretorischen und membranösen Proteinen hin. Zudem beinhaltet das Zytoplasma eine große Anzahl sekretorischer Vesikel, deren Produkte unter anderem aus Enzymen, Wachstumsfaktoren oder Zytokinen bestehen. Als phagozytierende Zellen besitzen sie außerdem zahlreiche Lysosomen, Vesikel und Granula, die verschiedenartige Enzyme, wie saure Phosphatasen, saure Hydrolasen, Esterasen, Proteasen und vor allem Peroxidasen enthalten.

Auf der Zellmembran der Monozyten befinden sich eine Vielzahl unterschiedlicher Oberflächenmoleküle. Neben beispielsweise Rezeptoren für Interleukine und Interferone, Wachstumsfaktoren (z.B. GM-CSF), Komplementfaktoren oder Immunglobulinen exprimieren Monozyten auf der Zellmembran Rezeptoren für Katecholamine oder Lipopolysaccharide (LPS), ein Zellmembranbestandteil gramnegativer Bakterien.

Die LPS-Rezeptoren CD14 (cluster of differentiation) und „toll-like-Rezeptor“ (TLR) sind bedeutsam wegen ihrer Fähigkeit, Monozyten und Makrophagen über eine Interaktion mit LPS zu aktivieren. LPS bindet dabei an CD14 und den „toll-like-Rezeptor“ (TLR), dessen intrazytoplasmatische Domäne eine kaskadenförmige Aktivierung von Signalproteinen bis zum Transkriptionsfaktor NFκ-B bewirkt. Immunologisch-analytisch nutzt man CD14 wegen seiner Zellspezifität bei der Identifikation von Monozyten bzw. Makrophagen (s. Studiendesign und Methoden).

Ein weiteres wichtiges Oberflächenmolekül ist der HLA-DR Rezeptor, über den Monozyten und Makrophagen neben dendritischen Zellen die Fähigkeit haben, zuvor phagozytierte Antigene CD4+ T-Helfer-Zellen zu präsentieren. Somit spielen sie eine zentrale Rolle bei der Regulation zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem (Volk 1996).

### **1.3.3 HLA-DR**

#### *1.3.3.1 Struktur des HLA-DR Rezeptors*

Körpereigene und körperfremde Moleküle (Antigene) werden auf spezifische Peptidrezeptoren geladen und auf der Zelloberfläche exprimiert. Diese Proteinkomplexe kommen in zwei Klassen

vor, MHC I und MHC II. Beim Menschen werden die MHC-Proteine auch „humane leukocyte antigen“ (HLA) genannt.

HLA-DR Rezeptoren gehören zur Familie der MHC II Moleküle, deren spezieller Proteinkomplex körperfremdes Antigen CD4+ T-Helfer-Zellen präsentiert. MHC I Rezeptoren interagieren dagegen mit CD8+ Zellen. MHC II Moleküle sind heterodimere Glykoproteine, die aus einer  $\alpha$ -Kette (32 – 34 kDa) und einer  $\beta$ -Kette (29 – 32 kDa) bestehen. Die Gene für die HLA-Moleküle liegen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 und sind hochpolymorph, d. h. es existieren viele verschiedene Allele, die für diese Proteine kodieren. Die Ketten sind jeweils aus zwei extrazellulären Domänen ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  bzw.  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ), einer Transmembranregion und einem kurzen zytosolischen Abschnitt aufgebaut (s. Abbildung). Die Peptidbindungstasche wird aus der  $\alpha_1$  und  $\beta_1$  Kette gebildet. Bei den HLA-DR Molekülen kommt dieser Polymorphismus ausschließlich durch die  $\beta$ -Kette zustande, da für die  $\alpha$ -Kette nur zwei nicht polymorphe Allele existieren. Für die Gene der  $\beta$ -Kette sind bis heute über 320 verschiedene Allele bekannt (Marsh 1998; Bodmer 1999).

### *1.3.3.2 Antigenpräsentation über HLA-DR*

Bei der Antigenpräsentation wird körperfremdes Antigen nach Internalisierung und lysosomaler Fragmentierung in der Peptid-Bindungstasche im endoplasmatischen Retikulum (ER) fixiert und an die Zelloberfläche transportiert. Hierbei spielt HLA-DR eine wichtige Rolle: im ER wird die Peptid-Bindungstasche des „unbesetzten“ HLA-DR Rezeptors durch ein Peptid (invariant chain ( $I_i$ )) blockiert. Nach Verschmelzung des HLA-DR tragenden Vesikels mit einem Phagolysosom wird  $I_i$  aufgespalten, so dass nur ein kleiner Peptidrest (CLIP – class II associated invariant chain peptide) in der Bindungstasche zurückbleibt. HLA-DM (ein intrazelluläres Protein) verdrängt anschließend CLIP aus der Peptid-Bindungstasche und ermöglichen somit die Bindung eines anderen Peptids (Antigen). Dieses Antigen ist extrazellulären Ursprungs. Nach dem Transport an die Zelloberfläche binden CD4+ T-Helfer-Zellen über das CD4-Protein (ein sog. Co-Rezeptor) spezifisch an die nicht-polymorphe  $\beta_2$ -Region, interagieren über TCR (T-Zell-Rezeptor) mit dem Peptid in der MHC-II-Bindungsstelle und werden dadurch aktiviert (Janeway 1988).

### *1.3.3.3 Regulation der HLA-DR Expression*

Die HLA-DR Expression unterliegt komplexen Regulationsmechanismen:

Positiv wird sie von IFN- $\gamma$ , GM-CSF und IL-12 beeinflusst (Volk 1996; Le Tulzo 2004). Daneben können selbst Zytokine mit teilweise antiinflammatorischen Eigenschaften wie IL-4 und IL-13 die

HLA-DR Expression erhöhen (de Waal Malefyt 1993). Im Gegensatz dazu supprimieren vorwiegend inhibierende Mediatoren wie IL-10, TGF- $\beta$  und Prostaglandin E2 die HLA-DR Expression (Volk 1996; Kox 2000; Le Tulzo 2004). Auch immunsupprimierende Medikamente wie Cyclosporin A und Glucocorticoide mindern ebenfalls direkt oder indirekt die HLA-DR Rezeptorzahl auf peripheren Blutmonozyten. Daneben werden Katecholamine (Le Tulzo 1997) und auch normalerweise monozytenaktivierende Substanzen wie LPS als mögliche hemmende Einflussfaktoren der HLA-DR Expression in Erwägung gezogen (Wolk 2003).

Tabelle 1. Mediatoren der HLA-DR Expression

Gesteigerte HLA-DR Expression	Verminderte HLA-DR Expression
IFN- $\gamma$ (TH-1-Funktion)	IL-10
GM-CSF	TGF- $\beta$
IL-12	IL-6
	C5a
	PGE2
	LPS
	Stressmediatoren (z.B. Adrenalin)
	Immunsuppressiver (z.B. Cyclosporin A, Glucocorticoide)

Eine Regulierung der HLA-DR Rezeptorzahl kann auf unterschiedlichen Ebenen geschehen:

1. indirekt praetranskriptorisch: wie beispielsweise Glucocorticoide, die über eine Induktion der Synthese von TGF- $\beta$ , IL-10 oder löslichen IFN- $\gamma$ -Rezeptoren, die einen IFN- $\gamma$  Effekt antagonisieren, eine HLA-DR Expression regulieren können (Galon 2002), oder IL-10, das über eine Hemmung des IFN- $\gamma$ -Induktionsweges die HLA-DR Expression reguliert (Ito 1999).
2. transkriptorisch: z.B. IFN- $\gamma$ , das über eine Induktion der CIITA (non-DAN-binding class II transactivator A) die Transkription von HLA-DR aktiviert (Fumeaux and Pugin 2002; Abbas 2007), oder auch Glucocorticoide, die direkt die Transkription von HLA-DR hemmen (Galon 2002).
3. posttranskriptorisch wirken hingegen beispielsweise IL-10 und LPS. IL-10 könnte dabei Einfluss nehmen auf den komplexen Transport der HLA-DR Moleküle vom endoplasmatischen Retikulum an die Zelloberfläche (Fumeaux and Pugin 2002). Einige Studien konnten unter IL-10 eine Akkumulation der MHC II Moleküle in intrazellulären Kompartimenten nachweisen, was eine posttranskriptorische Regulation nahe legt (Koppelman 1997; Morel 2002). LPS nimmt über eine verminderte Synthese von HLA-DM (s. Kapitel 1.3.3.2) Einfluss auf die HLA-DR-Antigen-Beladung und führt auf diesem Weg zu einer verminderten HLA-DR Expression.

#### **1.3.4 Monozytenaktivierung**

Ruhende Makrophagen exprimieren wenig oder kein HLA-DR und zeigen eine geringe Zytokinproduktion.

Die Aktivierung der Monozyten ist ein mehrstufiger Prozess. Eine Präaktivierung der Makrophagen erfolgt in der Frühphase der Immunantwort zum einen durch antigenunspezifische Zytokine, insbesondere durch IFN- $\gamma$ , zum anderen durch mikrobielle Produkte selbst. Die vollständige Aktivierung geschieht dann durch unterschiedliche Faktoren wie beispielsweise LPS, Komplementfaktoren, IL-1, TNF- $\alpha$  oder erneut IFN- $\gamma$  (van Furth 1998; Abbas 2007). IFN- $\gamma$  erhöht zudem bei der Präaktivierung die Rezeptorzahl für TNF- $\alpha$  und steigert so im zweiten Schritt die Effizienz der TNF- $\alpha$  induzierten Aktivierung (Ruggiero 1986).

Aktivierte Monozyten weisen eine erhöhte HLA-DR Expression auf und somit eine vermehrte Antigenpräsentation gegenüber CD4+ T-Helfer-Zellen. Bei der Interaktion zwischen dem HLA-DR gebundenem Antigen und CD4+ T-Helfer-Zellen spielen jedoch noch weitere Faktoren eine Rolle, z.B. spezielle Costimulatoren, wie B7, CD28 und CD40. Nicht aktivierte Monozyten exprimieren wenige oder keine Costimulatoren. Bei der Präaktivierung wird B7 auf der Zelloberfläche exprimiert und kann so mit CD28 auf CD4+ T-Helfer-Zellen interagieren, woraufhin diese aktiviert werden, clonal expandieren und den CD40 Liganden (CD40L) auf ihrer Zelloberfläche synthetisieren. CD40L bindet an CD40 auf Monozyten, wodurch wiederum vermehrt B7 gebildet wird und die HLA-DR assoziierte Aktivierung der CD4+ T-Helfer-Zellen optimiert und verstärkt wird (Abbas 2007).

Aktiviert Monozyten haben eine erhöhte Zytokinproduktion. Monozyten synthetisieren zum einen proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- $\alpha$  zum anderen antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  (van Furth 1998). Bei Erstkontakt mit LPS kommt es zu einer vermehrten Sekretion proinflammatorischer Zytokine, bei erneuter Exposition mit LPS nimmt die proinflammatorische Zytokinproduktion hingegen ab. Dies wird als Endotoxintoleranz beschrieben (de Waal Malefyt 1991; Randow 1995). Monozyten besitzen zudem eine große Bandbreite an sekretorischen Faktoren, darunter Komplementfaktoren, proteolytische Enzyme, Gerinnungsfaktoren, Fibronectin und Wachstumsfaktoren (Nathan 1987; Cavailon 1994; Volk 1996). Auf diese Weise regulieren und steuern Monozyten eine Vielzahl immunologischer Prozesse.

### **1.3.5 Rolle der CD4+ Zellen bei der Monozytenaktivierung**

Im Zusammenhang mit einer Monozytenaktivierung spielen CD4+ T-Helfer-Zellen eine wichtige Rolle: zum einen werden sie durch aktivierte Monozyten via Zell-Zell-Kontakt mittels HLA-DR Rezeptoren direkt oder durch Zytokine indirekt stimuliert, umgekehrt werden Monozyten durch aktivierte CD4+ T-Helfer-Zellen in ihrer Funktion reguliert.

Bei nicht-aktivierten CD4+ T-Helfer-Zellen spricht man häufig auch von „naiven“ CD4+ Zellen. Nach Antigenpräsentation durch Monozyten werden „naive“ CD4+ Zellen angeregt, synthetisieren IL-2 und proliferieren daraufhin (klonale Expansion). Während dieser klonalen Expansion differenzieren sie in verschiedene Phänotypen, vornehmlich in T-Helfer-Zellen 1 (TH-1) und T-Helfer-Zellen 2 (TH-2). Je nach Differenzierung produzieren sie unterschiedliche Zytokine, die teilweise antagonistisch zueinander wirken (Abbas 1996; Opal and DePalo 2000). TH-1-Zellen sekretieren dabei proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  und IL-2 während TH-2-Zellen antiinflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-10 produzieren. Bis heute ist die Ursache der unterschiedlichen Differenzierungswege in TH-1- bzw. TH-2-Zellen nicht vollständig geklärt – diskutiert werden die Beschaffenheit und Menge des Antigens, der kostimulatorischen Signale, die während der HLA-DR Antigenpräsentation anwesend sind, sowie verschiedene Zytokine. Z.B. proliferieren CD4+ T-Helfer-Zellen in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  in TH-1 Zellen, IL-4 hingegen fördert die Differenzierung in TH-2 Zellen. Aktivierte Makrophagen fördern entweder über IL-6 oder IL-12 die Proliferation von TH-2 bzw. TH-1.

Tabelle 2. TH-1 und TH-2 Differenzierung hinsichtlich Zytokinproduktion und Zytokinrezeptorexpression (Abbas 2007)

Zytokinproduktion und Zytokinrezeptorexpression	TH-1	TH-2
IFN- $\gamma$	+++	-
IL-4, IL-5, IL-13	-	+++
IL-10	+/-	++
GM-CSF	++	++
IL-12R $\beta$ -Kette	++	-
IL-18R	++	-

## 1.4 Pathophysiologie des septischen Schocks

„The microorganisms that seem to have it in for us ... turn out ... to be rather more like bystanders. ...it is our response to their presence that makes the disease. Our arsenals of fighting off bacteria are so powerful ... that we are more in danger from them than the invaders“ (Thomas 1972)

Lewis Thomas postulierte dies bereits 1972 in seinem Artikel „Germs“ und trifft damit den Kern der Pathophysiologie des septischen Schocks. Denn trotz moderner Intensivmedizin und einer verbesserten antibiotischen Therapie konnte die Letalität der Erkrankung in den letzten Jahren nicht weiter gesenkt werden (Rangel-Frausto 1998; Angus 2001; Annane 2003). Zwar spielt das körpereigene Immunsystem eine Schlüsselrolle im Pathomechanismus des septischen Schocks, aber dennoch sind bis heute viele Details der pathophysiologischen Abläufe ungeklärt.

Vereinfacht spricht man heute beim septischen Schock von einer unkontrollierten Reaktion des Immunsystems (Bone 1992; Stone 1994; Warren 1997).

### 1.4.1 Ungleichgewicht auf Grund einer unkontrollierten Entzündungsreaktion

Anfängliche Ergebnisse aus Tierversuchen brachten den Verdacht auf, dass eine Überstimulation des proinflammatorischen Immunsystems zu einem Kreislaufkollaps und zu Organnekrosen führen würde, ähnlich wie bei Patienten im septischen Schock. Hohe Dosen TNF- $\alpha$  und IL-1 führten bei den Tieren zum Kreislauf- und Organversagen (Okusawa 1988), so dass man von einem „cytokine storm“ als Todesursache bei den Tieren sprach. Dieses zunehmende Verständnis von der Pathophysiologie des SIRS und die Erkenntnis aus mehreren Studien, in denen die Letalität der

Versuchstiere mit Komponenten und Makromolekülen zur Blockade dieser Immunkaskade drastisch gesenkt werden konnte, brachte neue Hoffnung in der Therapie des septischen Schocks auf. Ernüchternd musste man aber feststellen, dass das Tiermodell nicht direkt auf den Menschen übertragbar war, denn Studien zur Blockade der proinflammatorischen Immunkaskade beim Menschen mit Glucocorticoiden (Bone 1987), TNF- $\alpha$  Antagonisten (Abraham 1995; Fisher 1996), IL-1-Rezeptorantagonisten (Fisher 1994) und anderen Substanzen (Bernard 1997) führten nicht zum erwünschten Erfolg und hatten teilweise sogar einen negativen Effekt auf den Patienten.

Auch die Therapie mit Antiendotoxinantikörpern brachte keinen Erfolg (Ziegler 1991). Zwar hat Endotoxin verheerende Folgen für den Körper, doch auch ein totaler Endotoxinblock ist schädlich für das Immunsystem. Die Gründe hierfür sind komplex (Warren 1993). Vermittelt wird die LPS-induzierte Produktion von Zytokinen (z.B. TNF- $\alpha$  und IL-1) über Rezeptoren auf Monozyten und Makrophagen. LPS bindet an CD14 und den „toll-like-Rezeptor“ (TLR), dessen intrazytoplasmatische Domäne eine kaskadenförmige Aktivierung von Signalproteinen bis zum Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B bewirkt.

Abgesehen von einigen Formen der Sepsis, wie beispielsweise die Meningokokkensepsis, bei der häufig erhöhte Plasmaspiegel von TNF- $\alpha$ , IL-1 und INF- $\gamma$  gemessen werden und diese mit der Schwere der Erkrankung und dem Outcome korrelieren (Girardin 1988), zeigten verschiedene Studien, dass beim Menschen eine übertriebene proinflammatorische Immunreaktion niedriger ausfällt als anfänglich angenommen. So wurde nicht bei allen Patienten eine erhöhte Konzentration zirkulierender TNF- $\alpha$  oder Interleukin-1 $\beta$  gemessen (Debets 1989; Rogy 1994; Pruitt 1996; Oberholzer 2000). Weitere Studien zeigten sogar, dass Patienten mit einer Sepsis eine geringere Fähigkeit zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  besaßen als Patienten der Kontrollgruppe (Ertel 1995). Weiterhin wurde festgestellt, dass bei vielen Patienten selten ein proinflammatorisches Zytokinprofil nachweisbar ist und dass häufig die antiinflammatorische Zytokinantwort überwiegt (Rogy 1994; Endo 1996; Pruitt 1996; Friedman 1997; Oberholzer 2000). So wird heute davon ausgegangen, dass sich die Immunlage des Patienten im septischen Schock von einer anfänglichen Überstimulation zu einer Immunsuppression verändert (Lederer 1999; Oberholzer 2001). Neuere Ansichten gehen sogar soweit, dass die Antiinflammation nicht nur als Folge der Proinflammation, sondern auch als eigenständige, primäre Stressreaktion des Körpers zu verstehen ist (Munford and Pugin 2001).

#### **1.4.2 Mechanismus der Immunsuppression im septischen Schock**

Aus Eigenschutz gegenüber einer überschießenden, autodestruktiven (proinflammatorischen) Immunreaktion produziert der Körper antiinflammatorische Substanzen, um den Prozess zu kontrollieren. Eine Schlüsselrolle dieser kompensatorischen Reaktion des Immunsystems, auch „compensatory antiinflammatory response syndrom“ (CARS) genannt (Bone 1996), spielen IL-4, IL-10, IL-11 und IL-13, lösliche TNF-Rezeptoren, IL-1-Rezeptorantagonisten und Transforming Growth Faktor (TGF) (Dinarello 1993; Fisher 1994; Abraham 1995; Platzer 1995). Diese antiinflammatorischen Substanzen bewirken unter anderem eine Beeinträchtigung der

Monozytenfunktion wie eine reduzierte Zytokinproduktion (Munoz 1991) und eine erniedrigte HLA-DR Rezeptorzahl (Docke 1997).

Mononukleäre Zellen von Patienten mit Verbrennungen oder Trauma haben einen reduzierten Spiegel von proinflammatorischen TH-1 Zytokinen aber einen erhöhten Anteil der antiinflammatorischen TH-2 Zytokine IL-4 und IL-10 (s. Kapitel 1.3.5). Eine Umkehr dieses Verhältnis verbessert die Überlebensrate der Patienten im septischen Schock (O'Sullivan 1995; Lederer 1999). Andere Studien zeigten, dass Patienten im septischen Schock erhöhte Spiegel von Interleukin-10 haben und dieses ein prognostisch ungünstiger Faktor ist (Gogos 2000; Opal and DePalo 2000). Bei Patienten mit Peritonitis und Trauma stellte man eine Abnahme der Proliferation und Zytokinsekretion von TH-1-Zellen fest, ohne dass dies mit einer erhöhten TH-2-Zytokinproduktion einherging. Diese Anergie geht mit einer erhöhten Letalitätsrate der Patienten einher (Heidecke 1999). Apoptotische Zellen könnten mit verantwortlich sein für die Anergie: bei septischen Patienten konnte eine vermehrte Apoptose und nicht Nekrose bei Lymphozyten festgestellt werden (Hotchkiss 1999; Hotchkiss 2001). Anders als bei der immunstimulierenden Wirkung der nekrotischen Zellen, induzieren apoptotische Zellen die Synthese antiinflammatorischen Zytokine, TH-2-Proliferation und Anergie (Voll 1997; Green and Beere 2000). Stressinduzierte, erhöhte Cortisolwerte werden als mögliche Ursache diskutiert (Ayala 1995; Fukuzuka 2000).

### **1.4.3 HLA-DR Expression und Monozytenfunktion im septischen Schock**

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Immunsuppression ist die Deaktivierung von Monozyten, die durch eine verringerte Antigenpräsentation – entscheidend für die antigenspezifischen T-Zell Aktivierung (Tonegawa 1988) – und eine verminderten Synthese proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 charakterisiert ist (Endotoxintoleranz) (Munoz 1991; Volk 1991; Ertel 1995). Bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock konnte man eine verminderte HLA-DR-Expression auf Monozyten feststellen, die mit der Schwere des Verlaufs zusammenhing (Schinkel 1998; Muller Kobold 2000; Tschaikowsky 2002; Le Tulzo 2004). Volk et al. definierten den Begriff der „Immunparalyse“, die dann gegeben ist, wenn weniger als 30% HLA-DR Rezeptoren (normalerweise mehr als 80%) auf der Oberfläche von Monozyten exprimiert werden. Diese Immunparalyse geht mit einem erhöhten Infektionsrisiko einher (Volk 1996). Kontrovers diskutiert werden bis heute die Ursachen der verminderten HLA-DR-Expression. Mögliche Einflussfaktoren auf eine Runterregulierung könnten IL-10 (de Waal Malefyt 1991; Sachse 1999; Fumeaux and Pugin 2002), TGF- $\beta$  (Randow 1995), LPS (Wolk 2003) oder Cortisol (Le Tulzo 2004) sein. Auch Katecholamine werden als mögliche Regulatoren in Erwägung gezogen (Le Tulzo 1997; Le Tulzo 2004). Eine Steigerung der HLA-DR Expression hingegen bewirken z.B. IFN- $\gamma$  (Young and Hardy 1995; Docke 1997) und granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Smith 1990). Komplementfaktoren können ebenfalls eine Deaktivierung und somit Verminderung der HLA-DR Expression auf Monozyten bewirken. C5a beispielsweise ist ein Ligand des G(i) protein-coupled receptor und ein potenter Inhibitor der monozytären IL-12 Produktion. Somit



verhindert C5a eine IL-12 abhängige Induktion von IFN- $\gamma$ , ein Schlüsselzytokin bei der endogenen Wiederherstellung einer monozytären Immunität (Ia Sala 2005).

Unter LPS und Glucocorticoiden wurde zudem eine verminderte Synthese von HLA-DM festgestellt, ein wichtiger Cofaktor bei der Antigenpräsentation von HLA-DR auf Monozyten (s. Kapitel 1.3.3.3) (Fumeaux and Pugin 2002).

#### **1.4.4 Pro- und antiinflammatorisches Gleichgewicht**

Die Komplexität des Krankheitsbildes der Sepsis und des septischen Schock wird mit zunehmender Forschung immer deutlicher. Wie sich zeigte, konnte eine Beeinflussung der proinflammatorischen Immunantwort keine Verbesserung des Outcomes für den Patienten erreicht werden und man rückte von der Theorie der Hyperinflammation als Hauptursache der Pathophysiologie des septischen Schocks ab. Gleichzeitig machte interessanterweise eine Metaanalyse klinischer Studien zur antiinflammatorischen Therapie deutlich, dass zwar generell hohe Dosen antiinflammatorischer Substanzen als schädlich für den Patienten einzustufen sind, aber dennoch eine kleine Gruppe (10%) von dieser Therapie profitieren kann (Zeni 1997). Auch die Vermutung, dass ein Wechsel von Hyperinflammation zu Antiinflammation stattfindet, ist nicht in allen Fällen haltbar. So schließen einige Autoren aufgrund unterschiedlicher Studien, bei denen sie einen unmittelbaren immunsupprimierenden Effekt feststellten, dass die Immundepression eine primäre und nicht kompensatorische Antwort auf die Sepsis ist. In diesen Studien zeigten die Patienten eine deutlich bessere Prognose, bei denen eine Erholung der proinflammatorischen und nicht der antiinflammatorischen Zytokinproduktion stattfand (Heidecke 1999; Weighardt 2000). Munford und Pugin hingegen gehen davon aus, dass die normale Stressantwort des Organismus außerhalb des Entzündungsherdes eine Aktivierung des antiinflammatorischen Systems ist (Munford and Pugin 2001).

Zusammenfassend scheint das sensible Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischer Immunreaktion eine Schlüsselrolle der Pathophysiologie der Sepsis und des septischen Schocks zu spielen. Unter diesem Gesichtspunkt ist die Betrachtung der Wirkung von niedrig dosiertem Hydrocortison auf das Immunsystem bei Patienten im septischen Schock von besonderem Interesse.

#### **1.5 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse)**

Stress, einschließlich Schmerz, Fieber und Hypovolämie, bewirken einen Anstieg von ACTH und Cortisol im menschlichen Körper. Dieser Mechanismus wird hauptsächlich über die HPA-Achse gesteuert und ist nicht nur in Stresssituationen aktiv sondern auch verantwortlich für den basalen Erhalt der Homöostase (Chrousos 1995). Zusammen mit dem sympathischen Nervensystem bildet die HPA-Achse den peripheren Arm des Stresssystems (Chrousos 1992; Chrousos and Gold 1992), der unter dem Einfluß zirkadianer, neurosensorischer, limbischer und immunologischer Signale

steht (Chrousos 1995; Lenczowski 1999). Eine Aktivierung bewirkt u.a. eine Hemmung der Immunreaktionen (Chrousos 1992; Chrousos and Gold 1992).

### **1.5.1 Regelmechanismen der HPA-Achse**

Der Regelmechanismus der HPA-Achse ist komplex und soll hier nur kurz zusammengefasst werden. Zentrale Steuerungszentren liegen im Hypothalamus, in der Hypophyse und im Hirnstamm: hypothalamisches „Corticotropin-releasing hormone“ (CRH) induziert die Produktion von Corticotropin (ACTH) in der Hypophyse, welches seinerseits stimulierend auf die Cortisol synthese in der Nebennierenrinde wirkt. Es wirken viele unterschiedliche Bereiche auf diesen Regelkreislauf:

Arginin-Vasopressin (AVP oder ADH) wirkt synergistisch mit CRH und stimuliert die Synthese von Corticotropin (ACTH) in der Hypophyse. Noradrenerge Neurone und CRH potenzieren sich gegenseitig; serotonerge und cholinerge Neurone stimulieren die Sekretion von CRH, Noradrenalin und Vasopressin. GABA, Benzodiazepin und Opiode wirken hingegen inhibierend. Zentral synthetisierte Substanz P hemmt die CRH-Synthese, stimuliert andererseits aber das zentrale, noradrenerge Nervensystem (Chrousos 1995). Außerdem nehmen neben neuronalen Transmittern auch einige Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 Einfluss auf das Stresssystem (Chrousos 1995; Lenczowski 1999).

Die stündliche CRH-Ausscheidung unterliegt einem zirkadianen Rhythmus mit einem Morgen- und Abendhoch. Dies hat zur Folge, dass die höchsten Cortisolwerte im Blut morgens und abends gemessen werden können. Die CRH-Ausscheidung wird außerdem in Stresssituationen gesteigert. Zwar können auch andere Hormone und Substanzen Einfluss auf die Cortisolsekretion nehmen, doch ACTH ist der Hauptregulator der Cortisolproduktion (Ottenweller and Meier 1982; Hinson 1990; Calogero 1992). Der morgendliche basale Cortisolspiegel bei gesunden Menschen liegt zwischen 6 und 24  $\mu\text{g}/\text{dl}$ .

### **1.5.2 Beeinträchtigung der HPA-Achse im septischen Schock**

Erhöhte Werte von CRH, ACTH und Cortisol konnten auch bei Infektionen, Verbrennungen und Operationen festgestellt werden. Neben einer vermehrten Produktion der Substanzen werden aber auch gestörte inhibitorische Feedbackmechanismen und eine reduzierte Cortisolclearance diskutiert (Melby and Spink 1958; Perrot 1993). Teilweise konnte eine Korrelation zwischen erhöhten Cortisolwerten und der gesteigerten Mortalität festgestellt werden (Braams 1998).

Auch bei Patienten im septischen Schock findet man häufig erhöhte basale Cortisolwerte ( $>25 \mu\text{g}/\text{dl}$ ) (Melby and Spink 1958; Journey 1987; Span 1992; Bouachour 1995; Soni 1995; Briegel 1996; Lamberts 1997; Streeten 1999; Zaloga and Marik 2001), doch einige Studien zeigten auch, dass bei bis zu 50% der Patienten die Cortisolwerte unter 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$  lagen (Sibbald 1977; Finlay and McKee 1982; Moran 1994; Spittler 1995). Über eine Korrelation zwischen der Höhe der

Cortisolwerte und des Outcomes der Patienten wird bis heute intensiv diskutiert: einige Studien konnten eine Korrelation zwischen erhöhten Cortisolwerten und der Mortalität zeigen (Jurney 1987; Span 1992), andere hingegen einen Zusammenhang zwischen geringen Cortisolwerten und schlechter Prognose (Finlay and McKee 1982; McKee and Finlay 1983). Zudem sahen aber auch mehrere Studien keinen Einfluss der Cortisolwerte auf das Outcome (Schein 1990; Rothwell 1991; Bouachour 1995; Briegel 1996).

Zwar findet man bei Patienten im septischen Schock erhöhte Cortisolwerte, aber dennoch geht man davon aus, dass der Körper häufig unter einer relativen, reversiblen Nebennierenrindeninsuffizienz (NNR-Insuffizienz) leidet. Mehrere in vitro und in vivo Experimente ließen vermuten, dass eine relative NNR-Insuffizienz entweder auf eine erniedrigte ACTH-Sekretion, eine verschlechterte ACTH-Wirkung auf die Nebennierenrinde oder eine verringerte Cortisolsynthese selbst zurück zu führen ist (Annane and Cavaillon 2003; Cooper and Stewart 2003; Marik and Zaloga 2003). Zudem stützen mehrere Tierversuche und Zellkulturexperimente die Theorie der relativen NNR-Insuffizienz im septischen Schock (Kass and Finland 1957; Keri 1981; Catalano 1984; Gaillard 1990; Jaattela 1991). Einheitliche Angaben zu Definition, Inzidenz, Diagnose und Prognose einer relativen NNR-Insuffizienz findet man jedoch selten (Matot and Sprung 1998). Tatsächlich variiert die Häufigkeit einer relativen NNR-Insuffizienz bei Patienten mit schwerer Sepsis je nach Definition, Studienpatienten und Nebennierenfunktionstest zwischen 0 und 77% (Bouachour 1995; Oelkers 1996; Marik and Zaloga 2002; Cooper and Stewart 2003; Marik and Zaloga 2003). Bei Patienten im septischen Schock liegt die relative NNR-Insuffizienz wahrscheinlich zwischen 50 – 75% (Annane 2000). Eine absolute NNR-Insuffizienz ist hingegen sehr selten (0 – 3%) (Jurney 1987; Rothwell 1991; Jarek 1993; Bouachour 1995; Matot and Sprung 1998).

### **1.5.3 Nachweis einer NNR-Insuffizienz**

Über den Nachweis einer relativen NNR-Insuffizienz wird bis heute kontrovers diskutiert und einheitliche Empfehlungen gibt es nicht. Drei Diagnosemöglichkeiten haben sich herauskristallisiert:

1. Bestimmung des basalen Cortisolwertes
2. Stimulationstest mit 250 µg ACTH (Hochdosierter ACTH-Test)
3. Stimulationstest mit 1 µg ACTH (Niedrigdosierter ACTH-Test)

Angaben zu einem Schwellenwert des basalen Cortisolwertes, der Ausdruck einer relativen NNR-Insuffizienz sein könnte, variieren zwischen 10 – 34 µg/dl. Die meisten Autoren sehen aber in einem Cortisolwert von < 15 µg/dl den Hinweis auf eine relative NNR-Insuffizienz und somit eine Indikation für eine Hydrocortisonsubstitution (Knox 1993; Bouachour 1994; Bouachour 1995; Barquist and Kirton 1997; Cooper and Stewart 2003).

Viele Studien konnten am besten mit einem 250 µg ACTH-Test zwischen normaler NNR-Funktion

(„Responder“) und relativer NNR-Insuffizienz („Non-Responder“) unterscheiden. Strittig bleibt aber auch hier ein einheitlicher Referenzwert, der eine relative NNR-Insuffizienz bedeutet. Bei nicht intensivpflichtigen Patienten schließt ein Spitzenwert von  $> 18 \mu\text{g/dl}$  und ein Cortisolanstieg von  $> 9 \mu\text{g/dl}$  nach Stimulation eine Beeinträchtigung der NNR-Funktion aus (Bouachour 1995). Bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock variieren die Angaben: die meisten Autoren sehen in einem Cortisolanstieg  $< 9 \mu\text{g/dl}$  nach Stimulation den Beleg einer relativen NNR-Insuffizienz (Rothwell 1991; Moran, Chapman 1994; Annane 2000). Andere sahen jedoch in einer Erhöhung von  $< 6 \mu\text{g/dl}$  (Bollaert 1998) bzw.  $< 18 \mu\text{g/dl}$  (Bouachour 1995) einen diagnostischen Hinweis auf eine relative NNR-Insuffizienz.

Der Aussagewert eines hochdosierten Stimulationstests wird aber von einigen Autoren in Frage gestellt. Sie sehen in dem geringen Anstieg des Cortisolwertes bei hohen basalen Werten nicht eine eingeschränkte Syntheseleistung der NNR, sondern eine Erschöpfung der adrenalen Reserve (Marik and Zaloga 2000; Oppert 2000; Marik and Zaloga 2002; Marik and Zaloga 2003). Aufgrund des hohen, unphysiologischen Wertes von  $250 \mu\text{g ACTH}$  favorisieren sie eine Stimulation mit  $1 \mu\text{g ACTH}$  (Mayenknecht 1998; Zarkovic 1999; Dokmetas 2000; Marik and Zaloga 2003). Zu diesem Test gibt es allerdings keine validierte Studienlage (Cooper and Stewart 2003).

Bei all den angegebenen Tests ist jedoch zu bemerken, dass die Varianz zwischen den einzelnen Laboren so hoch ist, dass ein Vergleich zwischen Studien, die jeweils andere Labore zur Testung genutzt haben, kaum möglich ist (Briegel 2009).

#### **1.5.4 Periphere Cortisolresistenz und Critical illness-related corticosteroid insufficiency (CIRCI)**

Im septischen Schock wirken neben der HPA-Achse allerdings noch weitere Faktoren auf die Cortisolkonzentration.

So nimmt beispielsweise die Konzentration von Corticosteroid-bindendem Globulin (CBG) im Blut bei Patienten mit einem septischen Schock ab und somit die Bindungs- und Transportkapazität von Cortisol, was den relativen Anteil des Cortisols im Blut steigen lässt (Hammond 1990; Beishuizen 2001).

Bei Patienten im septischen Schock konnte man zudem eine reduzierte Ansprechbarkeit der Zellen auf Cortisol feststellen. Dieses Phänomen, auch als periphere Cortisolresistenz bezeichnet, könnte entweder auf einen modulierten Cortisolabbau oder auf eine Veränderung der Rezeptoraffinität entweder zu Cortisol selbst oder anderen glucocorticoid-interagierenden Elementen beruhen (Molijn 1995; Beishuizen 2001; Meduri 2002). In vitro-Experimente konnten bereits mehrere Zytokine identifizieren, die entweder einzeln (IL-13 (Spahn 1996) und IL-2 (Molijn 1995)) oder in Kombination (z.B. IL-1, IL-6 und  $\text{INF-}\gamma$  (Klava 1997) und IL-2 und IL-4 (Kam 1993)) Einfluss nehmen auf die Sensitivität mononukleärer Zellen gegenüber Glucocorticoiden. Auch  $\text{TNF-}\alpha$  und IL-10 verschlechtern bzw. verbessern die Affinität von Glucocorticoiden zu ihren Rezeptoren (Franchimont 1999). Die Glucocorticoidrezeptorzahl bzw. Funktion der Rezeptoren wird ebenso

durch IL-1 (Pariante 1999), Endotoxin (Liu 1993) und Hyperthermie (Molijn 1995) verändert.

Eine periphere Cortisolresistenz könnte auch das Paradoxon einer Ansprechbarkeit von Glucocorticoiden im septischen Schock bei Patienten mit normaler NNR-Funktion erklären (Bennett 1999).

In den letzten Jahren wird zunehmend davon ausgegangen, dass es während des septischen Schocks sowohl zu einer relativen NNR-Insuffizienz kommt als auch zu einer reduzierten Ansprechbarkeit des peripheren Gewebes auf Cortisol. Dieses Krankheitsbild wird als „Critical illness-related corticosteroid insufficiency (CIRCI)“ bezeichnet. Hierbei käme es zu einer protrahierten und übermäßigen proinflammatorischen Antwort des Körpers auf die zugrunde liegende Infektion (Marik 2008), die durch eine inadäquate Corticosteroidaktivität in Anbetracht der Stressreaktion und des Krankheitsschweregrads begünstigt wird. Pathophysiologisch resultiert eine insuffiziente steroidvermittelte Suppression der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren (Marik 2009).

## **1.6 Glucocorticoide**

Die mehr als 50 jährige Forschung und Therapie mit Glucocorticoiden beschränkte sich hauptsächlich auf den antiinflammatorischen und immunsupprimierenden Effekt von Glucocorticoiden, doch heutige Studien zeigen einen immer differenzierteren Wirkmechanismus der Steroide, der weitere Anwendungsgebiete wie beispielsweise bei der Therapie der schweren Sepsis, des septischen Schocks und bei ARDS (acute respiratory distress syndrome) ermöglicht (Bollaert 1998; Meduri 1998; Meduri and Kanangat 1998; Bronicki 2000). Möglicherweise basieren einige antiinflammatorische und immunsupprimierende Eigenschaften der Glucocorticoide auf ihrem pharmakologischen Effekt und nicht auf ihrer physiologischen Wirkung (Cupps and Fauci 1982; Munck 1984; Wilckens 1995). Dies könnte nicht nur an den unterschiedlichen endogenen und therapeutischen Konzentrationen im Blut liegen, sondern auch an der unterschiedlichen biologischen Aktivität zwischen endogenen und synthetischen Glucocorticoiden wie beispielsweise bei der Bindung an TBG, an der Affinität zum Rezeptor oder an der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (Wilckens 1995).

### **1.6.1 Wirkmechanismus von Cortisol**

Glucocorticoide wirken auf Zielzellen hauptsächlich über ubiquitäre Glucocorticoidrezeptoren, die als Glucocorticoid-Glucocorticoidrezeptoren-Komplex direkt oder indirekt auf die Transkription der Zell-DNA Einfluss nehmen (genomische Wirkmechanismus) (Yamamoto 1985; Bamberger 1996; Karin 1998). In den letzten Jahren wurde zudem eine schnell eintretende Glucocorticoidwirkung („rapid effects“) beobachtet, die auf eine nicht-genomische Signalwirkung der Glucocorticoide schließen lässt (Borski 2002; Buttgerit and Scheffold 2002; Losel and Wehling 2003).

### 1.6.1.1 Genomischer Wirkmechanismus

Die Zona fasciculata der Nebennierenrinde sezerniert Cortisol ins Blutplasma, das dort auf Grund seiner Lipophilie größtenteils an CBG gebunden transportiert wird. Die Aufnahme von Cortisol in die Zielzelle erfolgt durch Diffusion durch die Zellmembran. Innerhalb der Zelle bindet Cortisol an die Glucocorticoidrezeptoren, die über eine Komplexbindung mit Chaperon-Molekülen (zwei Hitzeschockproteine Hsp70 und Hsp90 und ein Immunophilin Ip56) verbunden sind. Die Interaktion von Cortisol mit den inaktiven, hauptsächlich im Zytosol lokalisierten Glucocorticoidrezeptoren führt zur Dissoziation der Chaperon-Moleküle, wodurch die DNA-Bindungsstelle frei wird und der Glucocorticoid-Glucocorticoidrezeptoren-Komplex in den Zellkern transloziert wird. Nach Dimerisierung des Glucocorticoid-Glucocorticoidrezeptoren-Komplex kann dieser in seiner aktivierten Form direkt an sogenannte „glucocorticoid responsive elements“ (GlucocorticoidrezeptorenE) - spezifische kurze DNA-Sequenzen des Zielgens – binden und damit in der Promoterregion die Transkription des entsprechenden Gens aktivieren oder inhibieren (Schulz 2000). Man geht von 10-100 Genen pro Zelle aus (< 1 %), die auf diese Weise direkt reguliert werden (Barnes 1998). Über diesen Mechanismus erfolgt z.B. die Induktion der Synthese endogener antiinflammatorischer Proteine wie IL-10 oder Lipocortin 1. Über Lipocortin 1 kommt es zu einem Eingriff in die Arachidonsäurekaskade im Sinne einer Suppression der Synthese von Leukotrienen und Prostaglandinen durch Hemmung der zytosolischen Phospholipase A2.

Neben dieser direkten modulatorischen Wirkung gibt es auch die indirekte Einflussnahme des Glucocorticoid-Glucocorticoidrezeptoren-Komplexes auf die Proteinsynthese. Dabei interferiert der Glucocorticoid-Glucocorticoidrezeptoren-Komplex mit anderen Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, AP-1, STAT und NFAT, und hemmt dadurch indirekt die Transkription von Genen (Vanden Berghe 1999). Dieser Mechanismus hat besondere Bedeutung für die Expressionshemmung proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-2 (Paliogianni 1993) oder IFN- $\gamma$  (Cippitelli 1995) durch Interaktion des Glucocorticoid-Glucocorticoidrezeptoren-Komplexes mit AP-1. Ähnlich blockiert der Glucocorticoid-Glucocorticoidrezeptoren-Komplex die Bindung von NF- $\kappa$ B an DNA-Bindungsstellen und induziert zudem die Synthese des inhibitorischen Transkriptionsfaktors I $\kappa$ B $\alpha$ , der die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern hemmt (Auphan 1995). NF- $\kappa$ B-abhängige Mediatoren sind u.a. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, NO-Synthase, COX-2, ICAM-1 und Wachstumsfaktoren (M-CSF, GM-CSF) (Sapolsky 2000). Nach heutigen Erkenntnissen findet aber eine Inhibition durch aktivierte Glucocorticoidrezeptoren nicht auf Grund einer unterdrückten Translokation der Transkriptionsfaktoren statt, sondern basiert auf einer Blockierung von AP-1 oder NF- $\kappa$ B, nachdem diese an die DNA gebunden haben (De Bosscher 1997).

Darüber hinaus geht man davon aus, dass Glucocorticoide nicht nur die genomvermittelte Transkription hemmen, sondern auch posttranskriptionell RNA-Translation und Proteinexpression beeinflussen. Es wird eine Modifikation der mRNA und der posttranslationalen Prozessierung von Zytokinen angenommen (Adcock 1995; Adcock 2000; Adcock and Caramori 2001).

Lange ging man von nur einem Glucocorticoidrezeptor aus (Hollenberg 1985), sodass man die vielseitige Wirkung von Glucocorticoiden auf Ebene der Gene kontrolliert sah (Bollaert 1998). In

den letzten Jahren konnte man allerdings unterschiedliche Glucocorticoidrezeptoren nachweisen mit jeweils zusätzlichen Subtypisierungen. Es ist davon auszugehen, dass neben einer komplexen Regulation auf Genexpressionsebene eine zusätzliche Variation der Glucocorticoidwirkung durch unterschiedliche Glucocorticoidrezeptoren bedingt ist (Chrousos and Kino 2005).

### *1.6.1.2 Nicht-genomischer Wirkmechanismus*

In den letzten Jahren wurden aber auch Glucocorticoideffekte mit einer kurzen Latenzzeit zwischen Applikation und klinischer Wirkung beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass diese „rapid effects“ über einen nicht-genomischen Signalweg vermittelt werden (Borski 2002; Buttgerit and Scheffold 2002; Losel and Wehling 2003). Nichtgenomische Effekte, die bereits bei niedrigen Glucocorticoidkonzentrationen eintreten, werden wahrscheinlich spezifisch über einen membranständigen Glucocorticoidrezeptor (mGlucocorticoidrezeptoren) vermittelt und beeinflussen im Weiteren schnelle second messenger-Systeme über IP<sub>3</sub>, cAMP, PKC und Ca<sup>2+</sup> (Buttgerit 1998). Der Nachweis von mGlucocorticoidrezeptoren gelang zunächst nur an Lymphozyten leukämischer Patienten (Gametchu 1993; Gametchu 1999), doch kürzlich gelang es Bartholome et al. durch Anwendung einer hochsensitiven Immunfluoreszenzfärbung mGlucocorticoidrezeptoren auch unter physiologischen Bedingungen an Monozyten und B-Lymphozyten nachzuweisen (Bartholome 2004).

Sehr hohe Glucocorticoidkonzentrationen haben zudem einen nicht-spezifischen Membraneffekt, der hemmend auf den transmembranösen Natrium- und Calcium-Transport und die mitochondriale oxidative Phosphorylierung wirkt (Buttgerit 1997; Schmid 2000). Wahrscheinlich interkalieren die Moleküle in Zell- und Mitochondrienmembranen anstelle des strukturell verwandten Cholesterinmoleküls (Buttgerit 1998).

Ein nicht genomischer Wirkmechanismus von Glucocorticoiden konnte bereits am ausführlichsten an Hand der Aktivierung von eNOS (endothelial nitric oxide synthetase) am Gefäßendothel nachgewiesen werden. Glucocorticoide stimulieren hierbei die Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Hydroxykinase (PI3K) glucocorticoidrezeptorabhängig ohne Einfluss auf die Transkription zu nehmen. Eine Aktivierung der PI3K führt über eine Phosphorysierung von Akt zu einer Aktivierung von eNOS, welches eine erhöhte Produktion von NO bewirkt (Rhen and Cidlowski 2005).

### **1.6.2 Immunologischer Effekt der Glucocorticoide**

Fast alle Organe und physiologischen Systeme sind Cortisol sensitiv. Glucocorticoide vermitteln wichtige Wirkungen im Glucose-, Lipid- und Proteinstoffwechsel (Sapolsky 2000) und nehmen bedeutenden Einfluss auf Prozesse der Zelldifferenzierung, des Wachstums und der Apoptose (King and Cidlowski 1998; Planey and Litwack 2000). Glucocorticoide spielen eine lebenswichtige Rolle bei der Erhaltung der Homeostase, in dem sie das kardiovaskuläre System sowie den Wasser- und Elektrolythaushalt beeinflussen. Außerdem sind sie unabdingbar in der Modulation des Immunsystems (Sapolsky 2000). Wie bereits im Kapitel „HPA-Achse“ ausgeführt, modulieren

viele Entzündungsmediatoren direkt oder indirekt die Wirkung der Glucocorticoide. Umgekehrt wird das Immunsystem maßgeblich durch Glucocorticoide beeinflusst (Sapolsky 2000; Galon 2002).

#### *1.6.2.1 Antiinflammatorische Eigenschaften*

Am bekanntesten und stärksten ausgeprägt ist der immunsupprimierende und antiinflammatorische Effekt der Glucocorticoide. Dieser, zugleich umfangreichste immunmodulatorische Effekt basiert auf einer Hemmung der Synthese, einer verringerten Sezernierung und/oder der herabgesetzten Wirkung von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren (Brown 1982; Wiegers and Reul 1998).

So hemmen Glucocorticoide die Synthese von IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und GM-CSF (Wu 1991; Franchimont 1998; Visser 1998; Hasko and Szabo 1999; Larsson 1999) sowie RANTES (chemotaktisches Zytokin) (Stellato 1995), macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (VanOtteren 1994), NO (De Vera 1997), Histamin, Bradykinin, Eicosanoiden, Collagenasen und Elastasen (Sapolsky 2000) u.v.a.. Außerdem inhibieren Glucocorticoide die Antigenpräsentation über MHC II Proteine (HLA-DR) (Watanabe 1990; Schwiebert 1995; Sapolsky 2000; Galon 2002), reduzieren die Aktivität und Proliferation von B- und T-Zellen und fördern einen Shift von TH-1 zu TH-2 Zellen (Brinkmann and Kristofic 1995; Ramirez 1996). Die Synthese von immunsupprimierende Zytokinen wie IL-1Ra, IL-10 und TGF- $\beta$ , das die Aktivität von T-Zellen und Makrophagen inhibiert, ist unter Glucocorticoiden gesteigert (Oursler 1993; Galon 2002).

Die Anzahl zirkulierender Lymphozyten (T-Zellen mehr als B-Zellen, CD4 mehr als CD8 oder NK-Zellen), eosinophiler und basophiler Zellen sowie Makrophagen und Monozyten ist vermindert. Die Menge der neutrophilen Zellen ist hingegen erhöht (Sapolsky 2000). Glucocorticoide inhibieren dabei die Apoptose von neutrophilen Granulozyten (Meagher 1996). Zudem ist die Zahl der Zelladhäsionsmoleküle auf den Zellen erhöht (Cronstein 1992; van de Stolpe 1993). Die Chemotaxis von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten ist hingegen reduziert (Sapolsky 2000).

#### *1.6.2.2 Immunstimulatorische Wirkung der Glucocorticoide*

Neben der immunsupprimierenden Wirkung der Glucocorticoide, gibt es mehrere Studien, die einen immunstimulierenden Effekt der Glucocorticoide nachweisen konnten. Jefferies (Jefferies 1991; Jefferies 1994) arbeitete beispielweise eine Verbesserung der Infektabwehr bei Tieren und Menschen heraus, die mit niedrigdosierten Glucocorticoiden behandelt wurden. Ausführlich erforscht ist unter anderem die stimulierende Wirkung der Glucocorticoide auf die B-Zellproliferation und Immunglobulinsynthese (Smith 1972; Cupps 1985). Galon et al. konnte in vitro eine verstärkte Genaktivierung von proinflammatorischen Rezeptoren wie beispielsweise IL-1RI, IL-8R, IFN- $\gamma$ RI und TNFR feststellen. Im Gegensatz dazu war das Gen des antiinflammatorischen Mediators IL-1Ra stark herunterreguliert (Galon 2002). Auf Lymphozyten induzieren Glucocorticoide die Expression von IL-1- und IL-2-Rezeptoren (Akahoshi 1988; Wiegers 1995). Synergistisch wirken Glucocorticoide mit IL-1 und TNF- $\alpha$  bei der Stimulation der Akut-Phase-



Protein-Synthese in der Leber. Hierbei steigern sie die Sensitivität der Hepatozyten gegenüber den proinflammatorischen Mediatoren (Jensen and Whitehead 1998). Im Rattenmodell konnte *in vitro* und *in vivo* eine Verbesserung der T-Zell-Funktion unter physiologischen Glucocorticoiddosierungen nachgewiesen werden. Hohe Dosen hemmten hingegen die T-Zell-Antwort (Wiegers 1994; Wiegers 1995; Wiegers and Reul 1998). In diesem Zusammenhang diskutieren Wiegers et al., dass niedrige Glucocorticoidkonzentrationen stimulierend über Mineralocorticoid-Rezeptoren (MR) wirken, hohe Glucocorticoidkonzentrationen hingegen hemmend über Glucocorticoidrezeptoren (GR) (Wiegers 1994; Wiegers 1995; Wiegers and Reul 1998).

Häufig ist aber eine Einteilung der Glucocorticoidwirkung in einen antiinflammatorischen oder immunstimulierenden Effekt schwierig. Die Immunmodulation der Glucocorticoide hängt maßgeblich von der Konzentration, dem Zeitpunkt der Applikation, den Versuchsbedingungen und dem untersuchten Patienten ab. Barber et al. zeigten beispielsweise, dass bei Menschen eine bis zu einwöchige Vorbehandlung mit Cortisol den TNF- $\alpha$ - und IL-6-Plasmaspiegel nach Endotoxinexposition ansteigen ließ, eine Cortisolbehandlung nach Exposition jedoch supprimierend auf den Zytokinpiegel wirkte (Barber 1993). Genauso zeigte sich in vielen Studien eine Dosisabhängigkeit bei der Glucocorticoidwirkung: niedrige Dosen stimulieren beispielsweise die Produktion von IL-10 (van der Poll 1996; Verhoef 1999; Richards 2000), hohe Dosen hemmen die Zytokinsynthese (Brattsand and Linden 1996; van der Poll 1996; Franchimont 1998; Larsson 1999). Bei der T-Zell-Funktion führen niedrige Glucocorticoiddosen zu einer gesteigerten Synthese von IL-4 und einer verminderten Synthese von IFN- $\gamma$ , hohe Dosen hemmen die Zytokinproduktion (Ramirez 1998).

## **1.7 Glucocorticoide im septischen Schock**

### **1.7.1 Hoch dosierte Glucocorticoide im septischen Schock**

Ende der 1960er Jahre begann ein Umdenken in der Glucocorticoidanwendung im septischen Schock. Das Sepsismodell seit den 1950er Jahren sah in den toxischen Produkten der Bakterien die Ursache der systemischen Symptome. Ende der 1960er Jahre setzte sich immer mehr das pathophysiologische Modell einer proinflammatorischen Überreaktion des Immunsystems als Schockursache durch (s. Kapitel Pathophysiologie). Zur Unterbindung dieser Überstimulation wurde die intravenöse Glucocorticoidgabe um mehr als das zwanzigfache erhöht und zur Vermeidung von Nebenwirkungen zeitlich begrenzt.

Mehrere Tierversuche gaben Grund zur Hoffnung mit einer hochdosierten Glucocorticoidapplikation eine Schockumkehr und Verbesserung der Letalität zu erreichen (Brigham 1981; Hinshaw 1989; Meduri 1999; Hinshaw 1979; Hinshaw 1981). Neben einer Verbesserung der Hämodynamik sah man einen großen Vorteil in der Unterdrückung der systemischen Entzündungsreaktion (Barnes 1995; Chrousos 1995; Sapolsky 2000).

Zwar konnte eine prospektive Studie beim Menschen in den 1970er Jahren die Mortalität von 38%

in der Placebogruppe auf 10% in der Verumgruppe senken (Schumer 1976), andere Studien mit einer hoch dosierten Glucocorticoidtherapie in den 1980er Jahren zeigten jedoch einen negativen Effekt auf das Outcome des Patienten (Lucas and Ledgerwood 1984; Sprung 1984; Bone 1987; Luce 1988). Zwar konnten Sprung et al. noch eine kurzfristige Stabilisierung der Hämodynamik und Verbesserung der Überlebensrate nach einer Bolusgabe von Glucocorticoiden erreichen (Sprung 1984), doch spätere Metaanalysen ließen keinen Zweifel mehr daran, dass die Therapie mit hoch dosierten Glucocorticoiden ineffektiv (Lefering and Neugebauer 1995) und sogar gefährlich (Cronin 1995) für den Patienten ist. Man kam zu der Erkenntnis, dass eine hoch dosierte Glucocorticoidtherapie mit einem erhöhten Risiko für sekundäre Infektionen, einer gesteigerten Mortalität (Cronin 1995) und einem vermehrten Auftreten renaler und hepatischer Dysfunktionen einherging (Slotman 1993).

Die negativen Ergebnisse der hoch dosierten Glucocorticoidapplikation hatten zur Folge, dass es zu einem starken Einbruch der Glucocorticoidforschung bei schwerer Sepsis und septischen Schock kam. Ein Comeback feierten die Glucocorticoide nicht als antiinflammatorisches Therapeutikum, sondern als unterstützende Maßnahme bei einer relativen NNR-Insuffizienz und auf Grund seiner stabilisierenden Eigenschaften in der Hämodynamik.

### **1.7.2 Niedrig dosierte Glucocorticoide im septischen Schock**

In den 90er Jahren veränderte sich das pathophysiologische Modell des septischen Schocks von einem alleinigen Überwiegen der proinflammatorischen Immunreaktion hin zu einer differenzierteren Sichtweise, die das immunsupprimierende Potential des Immunsystems stärker berücksichtigte (s. Kapitel Pathophysiologie). Auch die weiteren Erkenntnisse bezüglich einer NNR-Insuffizienz und einer peripheren Cortisolresistenz gaben neue Ansätze in der Therapie mit Glucocorticoiden (s. Kapitel HPA-Achse). Der antiinflammatorische und immunsupprimierende Effekt der Glucocorticoide stand immer weniger im Mittelpunkt, dafür aber ihre immunmodulatorische Wirkung in ‚stress-adaptierter‘ Dosierung (s. Kapitel Wirkmechanismus der Glucocorticoide).

Briegel et al. und Schneider et al. erweckten mit ihren Studien zu Beginn der 90er Jahre erneut Interesse an einer niedrig dosierten Glucocorticoidtherapie im septischen Schock (Briegel 1991; Schneider and Voerman 1991). Ähnlich dem Modell der 50er Jahre sahen sie in der physiologischen Dosierung der Glucocorticoide eine Chance zur Verbesserung des Outcomes der Patienten. Bei beiden Untersuchungen kam es zu einer hämodynamischen Stabilisierung. Eine Korrelation zwischen NNR-Stimulierbarkeit und hämodynamischer Reaktion konnte Briegel nicht finden.

Ende der 90er Jahre wurden zwei Studien mit größerem Patientenkollektiv veröffentlicht, in denen die Wirkung von niedrig dosierten Glucocorticoide sowohl in der Frühphase (Briegel 1999) als auch in der Spätphase (Bollaert 1998; Chawla 1999) des septischen Schocks untersucht wurden. Bollaert veröffentlichte 1998 eine Studie mit 41 Patienten, denen 3x100mg Hydrocortison/Tag über

einen Zeitraum von 5 Tagen im späten (> 48 Stunden) septischen Schock gegeben wurde. Wie bei Briegel und Schneider Anfang der 90er konnte der Katecholaminbedarf signifikant gesenkt werden. Die 28-Tage Mortalität konnte von 68% in der Placebogruppe auf 32% in der Verumgruppe reduziert werden. Auch Bollaert untersuchte die Patienten auf eine mögliche NNR-Insuffizienz: hierbei konnte er zwar keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit und ohne NNR-Insuffizienz feststellen, jedoch einen leichten Trend (Bollaert 1998). 1999 zeigte Briegel in einer weiteren Studie, dass Glucocorticoide in niedriger Dosierung in der Frühphase des septischen Schocks stabilisierend auf die Hämodynamik wirken. Einen Unterschied bei der 28-Tage Mortalität konnte er bei den 40 untersuchten Patienten nicht feststellen (Briegel 1999). Die kreislaufstabilisierende Wirkung einer niedrig dosierten Glucocorticoidtherapie konnte auch 2003 in einer „crossover“ Studie bestätigt werden (Keh 2003).

In der bisher umfangreichsten veröffentlichten Studie zu Hydrocortison im septischen Schock schlossen Annane et al. zwischen 1995 und 1999 300 Patienten im schweren Septischen Schock in eine randomisierte, Placebo-kontrollierten Multicenterstudie ein (Annane 2002; Annane 2002). Nach einem NNR-Stimulationstest (250 µg ACTH-Test) wurden den Patienten der Verumgruppe 4 x 50 mg Hydrocortison/Tag i.v. und 50 µg/Tag Fludrocortin p.o. gegeben. Auch hier zeigte sich der hämodynamisch stabilisierende Effekt der Glucocorticoide zwischen Verum- und Placebogruppe. Eine Subgruppenanalyse machte eine bessere Ansprechbarkeit auf die Hydrocortisontherapie in der „Non-Responder“-Gruppe (Cortisolanstieg < 9 µg) deutlich. Bei der Untersuchung der 28-Tage-Letalität in der Gruppe der „responder“ bzw. des gesamten Patientenkollektivs zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied zwischen Verum- und Placebogruppe, doch bei der Betrachtung der „Non-Responder“ konnte die 28-Tage-Letalität von 63% in der Placebogruppe auf 53% in der Verumgruppe gesenkt werden.

In einer 2004 erschienenen Metaanalyse zu Corticosteroiden bei schwerer Sepsis und im septischen Schock empfehlen die Autoren eine Hydrocortisontherapie mit 200-300 mg/Tag für 5 – 11 Tage bei Patienten mit einer relativen und absoluten NNR-Insuffizienz (Annane 2004). 23 Studien zwischen 1951 und 2003 wurden in die Analyse einbezogen, von denen 16 die Qualitätskriterien erfüllten. Unter Berücksichtigung aller Studien konnte die Glucocorticoidtherapie die 28-Tage-Letalität nicht senken. Die entsprechenden Subgruppenanalysen ergaben jedoch, dass eine hoch dosierte Glucocorticoidtherapie keinen Effekt hatte, eine Therapie mit niedrig dosierten Glucocorticoide hingegen eine signifikante Reduktion der 28-Tage-Letalität mit sich brachte. Auch die Effekte der niedrig dosierten Glucocorticoidtherapie auf die Schockrückbildung am Tag 7 und 28 waren signifikant. Die Inzidenz von Nebenwirkungen wie beispielsweise gastrointestinale Blutungen und Superinfektionen waren weder in der hoch dosierten noch in der niedrig dosierten Therapie signifikant erhöht.

## 2 Fragestellung

Bei Patienten im septischen Schock kommt es aufgrund unterschiedlicher Mechanismen zu einer Immunparalyse, die sich in einer verminderten Expressionsfähigkeit von HLA-DR Rezeptoren auf peripheren Monozyten äußert. Zusätzlich kommt es zu einer Einschränkung der Monozytenfunktion bei Patienten im septischen Schock (Munoz 1991; Haveman 1999), welches sich in einer eingeschränkten Synthese von IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  zeigt. Der genaue Pathomechanismus ist allerdings bis heute nicht bekannt. Aufgrund einer häufig vermuteten relativen NNR-Insuffizienz bei Patienten im septischen Schock, wurde bei der Behandlung dieses Krankheitsbildes standardmäßig die Gabe von Hydrocortison in niedriger Dosierung vorgesehen. Die Effektivität und Sicherheit dieser Therapie konnte jedoch nicht valide nachgewiesen werden, sodass zur weiteren Klärung die CORTICUS-Studie von März 2002 bis November 2005 durchgeführt wurde (Sprung 2008). Glucocorticoide haben zusätzlich die Eigenschaft immunsupprimierend zu wirken, sodass die HLA-DR Expression und die Monozytenfunktion zusätzlich beeinträchtigt sein könnten.

Das Studienkollektiv sollte nach der Monozytenzahl im Blut, HLA-DR Expression auf peripheren Blutmonozyten sowie deren Fähigkeit der Zytokinproduktion (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) untersucht werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung einer niedrig dosierten Hydrocortison-Applikation bei Patienten im septischen Schock auf die Immunparameter zu charakterisieren und zu klären. Zum einen sollte das gesamte Patientenkollektiv (Responder und Non-Responder) nach Therapiegruppen (Verum und Placebo) und zum anderen zwischen den Respondern und Non-Respondern innerhalb der Therapiegruppen geprüft werden.

### 3 Studiendesign und Methoden

#### 3.1 Studiendesign

Die Blutproben zur immunologischen Untersuchung wurden im Rahmen der CORTICUS Studie entnommen, eine von der Europäischen Union geförderte, multinationale, randomisierte Placebo-kontrollierte doppel-blind Studie zur Erfassung der Wirksamkeit und Sicherheit einer niedrig dosierten Hydrocortisontherapie im septischen Schock (Sprung 2008). Insgesamt wurden in Deutschland, Frankreich, Belgien, Portugal und Israel auf 52 Intensivstationen 499 Patienten eingeschlossen. In Berlin wurde darüber hinaus von der CORTICUS Berlin Study Group (CBSG) eine Substudie durchgeführt, die sich mit der Untersuchung des immunologischen Effektes einer niedrig dosierten Hydrocortisontherapie bei Patienten im septischen Schock beschäftigte. In Berlin wurde an 13 Intensivstationen von 10 Krankenhäusern der immunologische Teil durchgeführt. Finanziell unterstützt wurde die Substudie von der Deutschen Forschungsgesellschaft. Das positive Votum der zuständigen Ethikkommission sowie die schriftliche Einwilligung der Patienten oder der gesetzlichen Vertreter lagen vor.

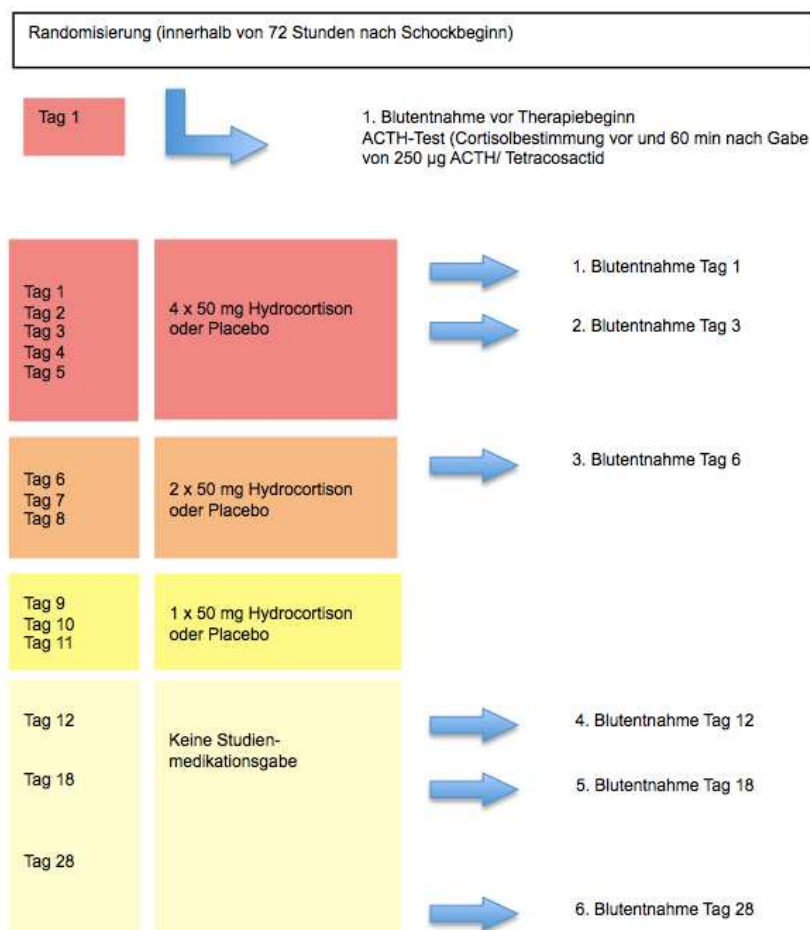


Abbildung 1. Studiendesign

Randomisierte Patienten erhielten entsprechend dem CORTICUS Protokoll an den Tagen 1 – 5 4x50 mg Hydrocortison, an den Tagen 6 – 8 2x50 mg Hydrocortison und an den Tagen 9 – 11 1x50 mg Hydrocortison oder ein Placebopräparat. Die Blutentnahmen für die immunologische Untersuchung fanden an folgenden Zeitpunkten statt: vor Gabe der Studienmedikation und Durchführung des ACTH-Tests (Tag 1) sowie an den Tagen 3, 6, 12, 18 und 28 jeweils in einem Zeitfenster von 2 – 4 Stunden nach Gabe der Studienmedikation. Die Aufbereitung der Blutproben erfolgte innerhalb von 6 – 8 Stunden nach Abnahme mit einer Latenzzeit von 3 Stunden Lagerung auf Eis.

### 3.1.1 Einschlusskriterien

Die Patienten waren für die Studie geeignet, wenn sie alle 3 der folgenden Einschlusskriterien erfüllten:

1. der klinische Nachweis einer Infektion innerhalb von 72 Stunden. Hierbei musste eines der folgenden Kriterien erfüllt sein
  - a) Nachweis von polymorphnucleären Leukozyten (PMN) in sonst steriler Körperflüssigkeit
  - b) Pathogene Mikroorganismennachweis in einer Gramfärbung und/oder Kultur in sonst steriler Körperflüssigkeit (z.B. Blut, Urin, Sputum)
  - c) Offensichtlich erkennbare Ursache der Infektion (z.B. Darmperforation, eitrige Wunddrainage)
  - d) Sonstiger klinischer Nachweis für eine Infektion (z.B. Pneumonie, nekrotisierende Faszitis, Purpura fulminans)
  
2. der Nachweis einer Sepsis. Zwei von u.g. vier Parametern mussten mindestens zutreffen
  - a) Temperatur > 38,3 °C oder < 35,6 °C
  - b) Herzfrequenz > 90/min
  - c) Atemfrequenz > 20/min oder PaCO<sub>2</sub> < 32 mmHg oder MV
  - d) Leukozyten > 12000/µl oder < 4000/µl oder Linksverschiebung mit > 10 % unreifen neutrophilen Granulozyten
  
3. der Nachweis eines septischen Schocks innerhalb von 72 Stunden. Hierbei mussten beide Kriterien erfüllt sein (s. Tabelle 1, III):
  - a) Hypotension: Systolischer Blutdruck < 90 mmHg oder Abfall um > 50 mmHg vom Ausgangswert (>1h) bei Hypertonikern, trotz adäquater Flüssigkeitstherapie und

/ oder Dopamingabe ( $\geq 5 \mu\text{g}/\text{kgKG}/\text{min}$ ) oder jede andere Therapie mit Vasopressoren (Adrenalin, Noradrenalin, Vasopressin) über mindestens 1 h

b) Organhypoperfusion / Organdysfunktion in zeitlichem Zusammenhang mit der Sepsis (unabhängig von Grunderkrankung oder Medikamenten) mit mindestens einem der folgenden Befunde:

1. Oligurie
2. Metabolische Azidose ( $\text{pH} < 7,3$  oder Basendefizit  $\geq 5,0 \text{ mmol/l}$  oder Laktat  $> 2 \text{ mmol/l}$ )
3. Hypoxie ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 280$  ohne Pneumonie oder  $< 200$  bei vorliegender Pneumonie)
4. Bewusstseinsbeeinträchtigung (Glasgow-Coma-Scale (GlucocorticoideS)  $< 14$  oder akute Verschlechterung)
5. Thrombozytopenie ( $< 100.000/\mu\text{l}$ ).

### 3.1.2 Ausschlusskriterien

Keines der folgenden Ausschlusskriterien durfte erfüllt sein:

1. Schwangerschaft
2. Alter  $< 18$  Jahre
3. Grunderkrankung mit Überlebensprognose  $< 3$  Monate
4. Kardiopulmonale Reanimation innerhalb der letzten 72 Stunden
5. Medikamentös induzierte Immunsuppression oder Chemo-/Bestrahlungstherapie innerhalb von 4 Wochen
6. langfristige Glucocorticoidtherapie innerhalb der letzten 6 Monaten oder kurzfristige Therapie mit Glucocorticoiden innerhalb der letzten 4 Wochen (topische Applikation ausgenommen)
7. HIV-Infektion
8. Reanimationsverweigerung
9. Akuter Herzinfarkt oder akute Lungenarterienembolie; moribunder Patient mit einer Lebenserwartung  $< 24$  Stunden; Intensivaufenthalt  $> 2$  Monate
10. Andere Medikamenten-Studie innerhalb der letzten 30 Tagen

## **3.2 Methoden**

Aus dem zentralen Venenkatheter der Patienten wurde zunächst 5 ml Blut steril entnommen, das verworfen wurde. Die weiteren Abnahmen erfolgten direkt in EDTA-, Serum- bzw. Heparin-Monovetten. Anschließend wurden die EDTA- und Heparin-Monovetten für 3 Stunden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert, um ein Ungleichgewicht aufgrund unterschiedlich langer Lagerungs- bzw. Transportzeiten zu verhindern. Zur Bestimmung des Cortisolwertes wurden Serum-Monovetten verwendet, die bei Raumtemperatur für 3 Stunden gelagert wurden. Im Labor wurde zunächst die Monozytenzahl aus dem EDTA-Blut mittels Cell-Dyn 1600 (Abbott Diagnostics, USA) bestimmt. Eine Monozytenstimulation mit LPS wurde aus dem Heparin-Blut für 4 bzw. 24 Stunden angesetzt. Die durchflusszytometrische Messung der HLA-DR Expression auf den Monozyten erfolgte aus dem EDTA-Blut.

### **3.2.1 Studienmedikation**

Die Studienmedikation bestand aus lyophilisiertem Hydrocortison Hemisuccinat (Fa. Rotexmedica) in Fläschchen á 100mg oder Placebo (Mannitol). Die Studienmedikation wurde nach Lösung in 2 ml Aqua dest. in Dosen von 50mg venös appliziert (s. Studiendesign). Die Studienmedikation wurde mit einem Patientecode verblindet in Einheiten von 6 Boxen mit Randomisationsverhältnis von 1:1 geliefert. Die Randomisierung erfolgte durch Auswahl einer Studienmedikationsbox.

### **3.2.2 ACTH-Test**

Die NNR-Funktion der in die CORTICUS-Studie eingeschlossen Patienten wurde nach einem intravenösen ACTH-Stimulationstest bestimmt: nach Studieneinschluss wurde jedem Patienten 250 µg ACTH / Tetracosactid (Synacthen®, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg) verabreicht. Blutproben zur Bestimmung der basalen Cortisolkonzentration im Serum wurden unmittelbar vor Stimulation (Zeitpunkt T0) sowie 60 min danach (T60) abgenommen. Die Cortisolantwort auf die ACTH-Stimulation ( $\delta$ -max) wurde als Differenz der Konzentrationen zwischen T0 und T60 definiert. Stieg der Serumcortisolwert um  $\leq 9$  µg/dl (248 µmol/l) vom Basalcortisolwert an, wurde eine relative NNR-Insuffizienz diagnostiziert. Betrug der Konzentrationsanstieg  $> 9$  µg/dl vom Basalcortisolwert, wurde die NNR-Funktion als adäquat eingestuft.

Zur Bestimmung der Cortisolkonzentration wurden Serum-Monovetten verwendet, die nach drei Stunden Lagerung für 10 Minuten bei 3000rpm und 4°C abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde bei -80°C zur späteren Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die Cortisolwerte wurden in einem zentralen Labor bei Prof. J. Briegel, München, mittels Electrochemiluminescence Immunoassays (ECLIA) vom Typ Elecsys (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) nach den Herstellerangaben bestimmt.



### 3.2.3 Durchflusszytometrie

#### 3.2.3.1 Prinzip des Durchflusszytometers

Mit dem Durchflusszytometer können die relative Zellgröße, die relative Granularität oder Komplexität von Zellen und die relative Intensität von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen bzw. Zellen gemessen werden. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern ist es so möglich, bestimmte Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Zellprodukte nachzuweisen.

Das Durchflusszytometer saugt die Zellen in einer Zellsuspension an und injiziert die Zellsuspension in einen parallelen Strom von Trägerflüssigkeit (hydrodynamische Fokussierung). Auf diese Weise passieren die Zellen vereinzelt und genau in der Mitte des Flüssigkeitsstrahls eine Messkammer, wo sie von einem fokussierten Laserstrahl getroffen werden. Der Laserstrahl wird beim Auftreffen auf die Zellen gestreut und regt Fluorochrome an. Lichtdetektoren registrieren die Lichtstreuung und die Fluoreszenz der Farbstoffe. Das Seitwärtsstreulicht des Lasers (Side Scatter, SSC) entspricht der Granularität und Komplexität der Zellen, das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) ist proportional zur Zellgröße. Anhand des SSC und FSC können Lymphozyten von anderen Zellen und Zellbestandteilen unterschieden werden.

Die vom Laser angeregten Fluorochrome emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge. Wenn sich die Wellenlängen des emittierten Lichtes der Fluorochrome ausreichend unterscheiden, kann die Intensität verschiedener Fluorochrome gleichzeitig gemessen werden.

Die Lichtdetektoren wandeln Lichtimpulse in elektronische Signale um, die erhobenen Daten werden an einen Rechner übermittelt, der die Messwerte jeder Zelle darstellt und speichert. Zur Auswertung der Daten wird die Intensität der verschiedenen Lichtsignale angezeigt. Anhand dessen ist es möglich, gezielt Zellpopulationen zu identifizieren und diese mit sogenannten Gates separat zu analysieren.

#### 3.2.3.2 Färben von Oberflächenmolekülen

Mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern (i.d.R. monoklonale Antikörper) werden spezifisch bestimmte Oberflächenmoleküle (MHC II: human class II histocompatibility complex und CD: cluster of differentiation) angefärbt.

1. 50 µl der EDTA-Blutprobe wurden für 20 Minuten mit 20 µl QuantiBRITE™ Anti-HLA-DR PE\* / Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5 (Becton Dickinson, San Jose, USA) bei 4°C inkubiert: Dabei bindet das Anti-HLA-DR PE (1:1 Konjugat) des Reagenz spezifisch an ein Epitop des HLA-DR-Antigens der Zellen. Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5 enthält zum einen Anti-CD14, das den Hauptteil der Monozyten erkennt, sowie Anti-FcR1 (CD64), das die restlichen, schwach CD14 positiven Zellen markiert. Somit wird gesichert, dass alle Monozyten der Probe erkannt werden.

Zusätzlich enthält das Antikörpergemisch einen Stabilisator, der einen MHC II – „Turnover“ verhindert.

2. Die Zellsuspension wurde daraufhin mit 500 µl FACS Lyse-Lösung (1:10 verdünnte BD FACS®-Lysing Solution) für 10 Minuten lysiert und anschließend zentrifugiert (1200 U, 5 min bei 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen.
3. Danach wurde die Probe mit 2 ml PBS-Lösung (phosphate-buffered Saline, PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) gewaschen und erneut zentrifugiert (1200 U, 5 min bei 4°C). Der Überstand wurde erneut abgesaugt und verworfen.

Bei Abschluss der Färbung wurden die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert und bis zur Analyse kühl und lichtgeschützt aufbewahrt.

### 3.2.3.3 *Quantitative Messung der HLA-DR Expression*

Im Vergleich zu einer „semiquantitativen“ Messung der HLA-DR Expression, bei der der Prozentsatz positiver Monozyten angegeben wird, sind bei der quantitativen Bestimmung der monozytären HLA-DR-Expression die Werte unabhängig von den verwendeten Antikörperklonen, den Fluoreszenzfarbstoffen und der Geräteeinstellung. Damit ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren und die Übernahme empirischer klinischer Handlungsrichtlinien möglich.

Um dieses zu gewährleisten erfolgte eine Kalibrierung des Durchflusszytometers mittels FACSComp-Software und Calibrite 3-Beads in der Lyse no wash-Option ohne Optimierung. Die Optimierung der Kompensation FL3-FL2 wurde mit einer HLA-DR/CD14-markierten Kontroll-Vollblutprobe in CellQuest durchgeführt.

Vor jeder Messung der HLA-DR-Expression wurde eine Eichkurve mit QuantiBRITE PE-Beads (BD Bioscience, San Jose, USA) erstellt, die eine definierte Anzahl von PE-Molekülen besitzen. Die Option „Quantitative Calibration“ (QuantiQuest) der CellQuest-Software (BD Bioscience, San Jose, USA) berechneten dabei die lineare Regression für die Fluoreszenz 2-Beads-Werte und erlauben somit eine automatische Quantifizierung der medianen monozytären HLA-DR-Antikörperbindung mit dem Ergebnis „Antibody bound per cell“ (AB/c).

Zur Bestimmung der monozytären HLA-DR-Expression wurden i.d.R. 2000 Monozyten akquiriert.

### 3.2.4 Monozytenstimulation

Alle Arbeitsschritte der Monozytenstimulation wurden mit pyogenfreien Pipettenspitzen durchgeführt.

Zur Erstellung des LPS-Mediums wurden 1 mg LPS (Stock L 4516, Sigma Chemical, St. Louis, USA) soweit mit zunächst PBS und im Anschluss mit RPMI 1640 (+ Glutamin) (Sigma Chemical, St. Louis, USA) verdünnt, so dass am Ende ein Mischungsverhältnis von 500 pg/ml LPS bestand. Hiervon wurden Eppendorfröhrchen mit 500 µl aliquotiert. In drei Eppendorfröhrchen wurden jeweils 50 µl Heparinblut gegeben. Nach kurzem Mischen wurden zwei Proben bei 37°C und 5% CO<sup>2</sup> für 4 Stunden (zur Bestimmung von IL-6 und TNF-α) sowie ein Röhrchen für 24 Stunden (zur Bestimmung von IL-10) inkubiert. Nach 4 bzw. 24 Stunden wurden die Eppendorfröhrchen kurz gemischt und bei 2500 rpm (1000 g) für 5 Minuten zentrifugiert. Vom Überstand wurden zum einen 4 x 250 µl (4 Stunden Inkubation) und zum anderen 2 x 250 µl (24 Stunden Inkubation) bei -80°C zur späteren Messung der Zytokinproduktion mittels ELISA eingefroren.

### 3.2.5 Zytokinbestimmung mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays)

#### 3.2.5.1 Prinzip des Sandwich ELISA

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration von IL-6, IL-10 und TNF-α nach LPS-Stimulation wurde ein ELISA nach der Sandwich-Methode (BD Bioscience, San Diego, USA) genutzt. Hierzu wird eine Mikrotitrierplatte mit einem spezifischen Antikörper beschichtet. Auf die Platte wird daraufhin das Patientenserum mit dem zu bestimmenden Antigen gegeben, das an die Antikörper der Platte bindet. Nach einer Inkubationszeit wird ein Detektionsantikörper (Capture-Antikörper) über die Antigen-Antikörper-Komplexe (AG-AK-Komplexe) gegeben, der an jeden im Erstschrift entstandenen AG-AK-Komplex bindet und im Fall des ELISA mit einem Enzym gekoppelt ist. Im letzten Schritt gibt man ein chromogenes Substrat in die Wells, das sich an das am Nachweisantikörper gekoppelte Enzym setzt und dort in farbiges Substrat umgesetzt wird (Farbreaktion). Die Intensität des Farbstoffs wird photometrisch gemessen und ist proportional zur Enzymaktivität und somit zu den AG-AK-Komplexen. Anhand einer Standardkurve, die durch Messung von Standards mit bekannten Konzentrationen aufgestellt wird (Eichkurve), können unbekannte Serumkonzentrationen abgelesen werden.

#### 3.2.5.2 Messprotokoll

Die Aufbereitung der tiefgefrorenen Blutproben zur ELISA-Zytokinbestimmung umfasste folgende Arbeitsschritte:

1. Herstellung eines 0,1 M Carbonat-Puffers mit einem pH-Wert von 9,5: 4,2 g NaHydrocortisonO<sub>3</sub> und 1,78 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wurden in 500 ml Aqua dest. gelöst

2. Verdünnung des Capture-Antikörpers des jeweiligen ELISA-Sets (BD Biosciences, San Diego, USA; Tab. 1) mit dem Carbonat-Puffer im Verhältnis 1 : 250
3. Befüllen aller Kavitäten der Mikrotiterplatte mit je 100 µl des jeweiligen verdünnten Capture-Antikörpers, Abkleben der Platte und Inkubation über Nacht bei 4 °C. Bei der Bestimmung von IL-10 musste bei Raumtemperatur inkubiert werden

Am folgenden Tag:

4. Herstellung eines Waschpuffers aus Phosphate Buffered Saline (PBS) (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) und 0,05 % Tween-20 (Sigma Chemical, St. Louis, USA) sowie eines Verdünnungspuffers aus PBS mit 10 % inaktiviertem fetalen Kälberserum (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich)
5. Dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatte mit jeweils 300 µl Waschpuffer (Mikrotiterplatten-Waschgerät 812 SW1®, LAB-Instruments, Straßburg, Frankreich) und anschließendes Ausklopfen
6. Auffüllen aller Kavitäten mit jeweils 200 µl des Verdünnungspuffers, Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h und dreimaliges Waschen wie unter 5. beschrieben
7. Rekonstitution des jeweiligen lyophilisierten rekombinanten Zytokins mit Aqua dest. und Herstellung einer Standardreihe durch 1 : 2 Verdünnung mit dem Verdünnungspuffer gemäß der Angabe des Herstellers
8. Auftauen der Plasmaproben bei Raumtemperatur, Befüllen der entsprechenden Kavitäten der Mikrotiterplatte mit jeweils 100 µl Plasma bzw. Standard (Doppelbestimmung aller Proben)
9. Inkubation bei Raumtemperatur für 2 h und anschließend fünfmaliges Waschen wie unter 5. beschrieben
10. Herstellen des Detektionreagenz: Verdünnung des jeweiligen biotinylierten Detektionsantikörpers und des jeweiligen Detektionsenzym (Tab. 1) mit Verdünnungspuffer im Verhältnis 1 : 250
11. Befüllen der Kavitäten der Mikrotiterplatte mit jeweils 100 µl Detektionsreagenz, Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h, dann siebenmaliges Waschen wie unter 5. beschrieben
12. Herstellen der Substratlösung aus Tetramethylbenzidine und Wasserstoffperoxid (TMB-Set, Pharmingen, San Diego, USA) und Befüllen aller Kavitäten der Mikrotiterplatte mit jeweils 100 µl dieser Lösung
13. Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln, dann Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von 50 µl einer 1 mmol/l Schwefelsäure

14. Photometrische Messung der Extinktion bei 450 nm (Korrektur 570 nm) und Berechnung der Zytokinkonzentration (Dynatech MR 5000®, Billinghamurst, England)

Nr.	ELISA-Set	Detektionenzym
1	BD OptEIA® Set Human IL-6	Streptavidin-HRP
2	BD OptEIA® Set Human IL-10	Avidin-HRP
3	BD OptEIA® Set Human TNF- $\alpha$	Avidin-HRP

HRS = horseradish Peroxidase

### 3.3 Statistik

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels „Statistical Package for the Social Sciences“, (SPSS Inc.®, Version 14).

Patientencharakteristik: Nominal skalierte Daten wurden mittels "Fishers exact test", angegebene Score Werte mittels "Mann Whitney-U" Test und alle übrigen Daten mittels "Student's t-Test" für unverbundene Stichproben analysiert.

Alle Verlaufsdaten wurden in Relation zum Ausgangswert gesetzt, aufgrund der Verteilung logarithmiert und dann mittels GLM (generalized linear model) für Messwiederholungen mit den Faktoren "Therapie" und "Responder" jeweils getrennt für den Therapiezeitraum (Tag 1 bis 6) und für die Zeit danach (Tag 12 bis 28) analysiert. Aufgrund des signifikanten Unterschiedes in der Patientencharakteristik wurde in beiden Fällen "Alter" als Kovariante berücksichtigt.

Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei Fehlerwahrscheinlichkeiten (p-Werten) von  $p < 0,05$  als signifikant und von  $p < 0,005$  als stark signifikant angesehen

Die grafischen Darstellungen wurden mit dem Statistikprogramm SigmaPlot 9.0 erstellt.

## 4 Ergebnisse

Von März 2002 bis November 2005 erfüllten insgesamt 84 Patienten die Kriterien eines septischen Schocks und konnten im Rahmen der Multicenterstudie CORTICUS in die Substudie der Berlin Study Group aufgenommen werden. Hinsichtlich der beiden Gruppen (Hydrocortison / Placebo) fand sich zum Zeitpunkt des Einschlusses ein signifikanter Unterschied bezüglich des Alters der Patienten (s. Tab.1). Geschlecht, Körpermaße, auslösendes Ereignis, SAPS-II-Score, SOFA-Score sowie Zeitraum zwischen dem Beginn des septischen Schocks und dem Studienbeginn waren nahezu gleich verteilt.

**Tabelle 1: Patientencharakteristika**

	Hydrocortison (HC) n = 42	Placebo (PL) n = 42
Geschlecht (männlich / weiblich, n)	29 / 13	30 / 12
Alter (Jahre) *	59.40 (22-87)	69.88 (43-89)
Größe (cm)	171 (150-188)	172 (150-195)
Gewicht (kg)	79.5 (50-130)	77.1 (53-127)
Responder / Non-Responder	26 / 16	30 / 12
Sepsisherd		
- Pneumonie	8	10
- schweres Trauma	4	0
- Peritonitis	16	22
- andere	11	10
- unbekannt	3	0
SOFA-Score bei Studienbeginn	10.36 (4-18)	9.81 (5-17)
SAPS II Score		
- ersten 24h bei Aufnahme auf Intensivstation (ITS)	47.9 (22-80)	47.4 (16-88)
- letzten 24h vor Studieneinschluss	43.7 (13-77)	47.8 (16-88)
Zeit zwischen Schock- und Studienbeginn (Stunden)	29 (3-71)	31 (1-67)
ITS-Aufenthaltsdauer (Tage)	23.3 (5-73)	26.3 (3-89)
Krankenhausaufenthaltsdauer (Tage)	50.0 (15-128)	53.9 (17-135)
Outcome (Überlebende / nicht-Überlebende, n)		
- an Tag 28	31 / 11	29 / 13
- während ITS-Aufenthalt	27 / 15	28 / 14
- während Krankenhausaufenthalt	23 / 17	26 / 16

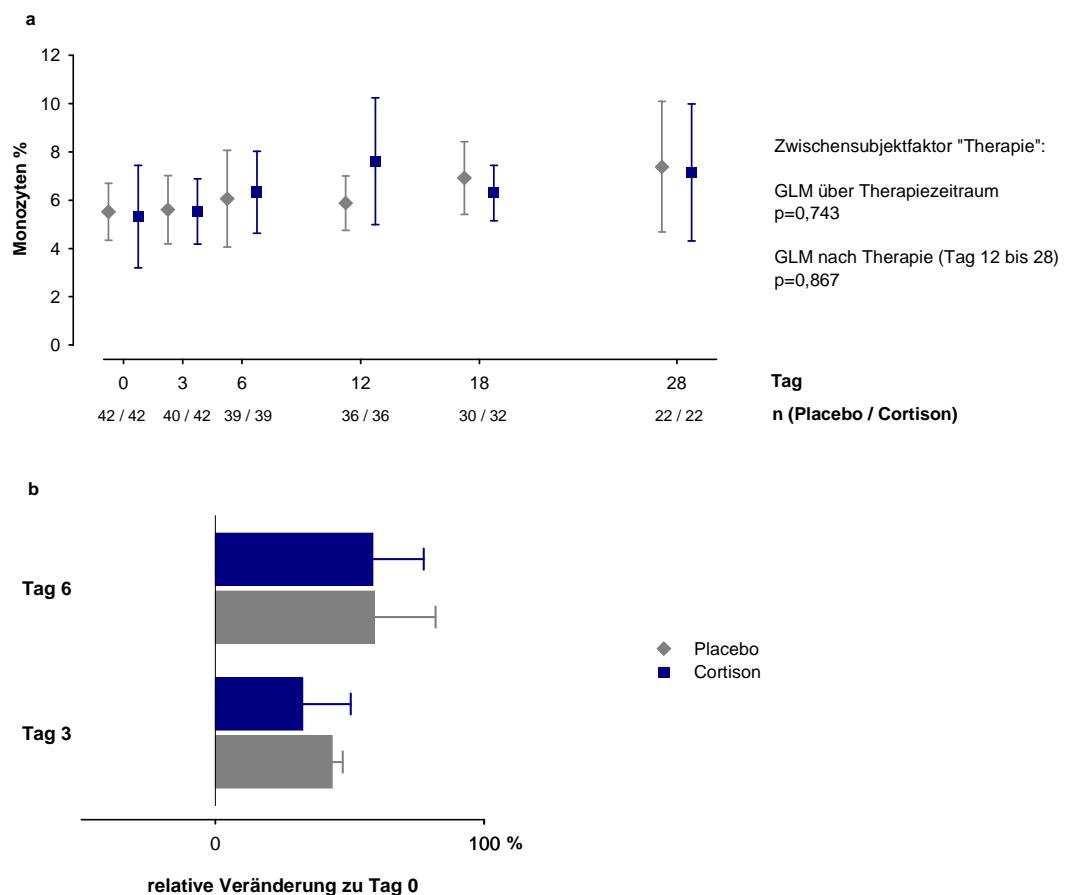
n = Patientenzahl, \* signifikanter Unterschied zwischen den Patientgruppen

## 4.1 Effekt von Hydrocortison auf die Monozytenpopulation

Hinsichtlich der Monozytenzahl, relativ (prozentualer Anteil der Leukozytenpopulation) oder absolut (Monozytenzahl pro Nanoliter), zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Therapiegruppen oder zwischen Respondern und Non-Respondern innerhalb einer Therapiegruppe (graphisch dargestellt sind im Folgenden nur Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe). Auch vor Therapiebeginn gab es zwischen Respondern und Non-Respondern keinen signifikanten Unterschied im Bezug auf die Monozytenpopulation zu verzeichnen.

Bei den relativen Veränderungen an Tag 3 und 6 im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 lässt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied feststellen. Bei der Betrachtung der absoluten Monozytenzahl pro Nanoliter lässt sich jedoch eine Tendenz hinsichtlich einer höheren Monozytenzahl unter der Hydrocortisontherapie feststellen (s. Abb. 3). Innerhalb der Hydrocortisongruppe lässt sich ebenfalls eine Tendenz hinsichtlich höherer relativer und absoluter Monozytenanteile bei Respondern gegenüber Non-Respondern ablesen (s. Abb. 2 und 4).

### 4.1.1 Monozytenanteil (%) nach Therapiegruppen

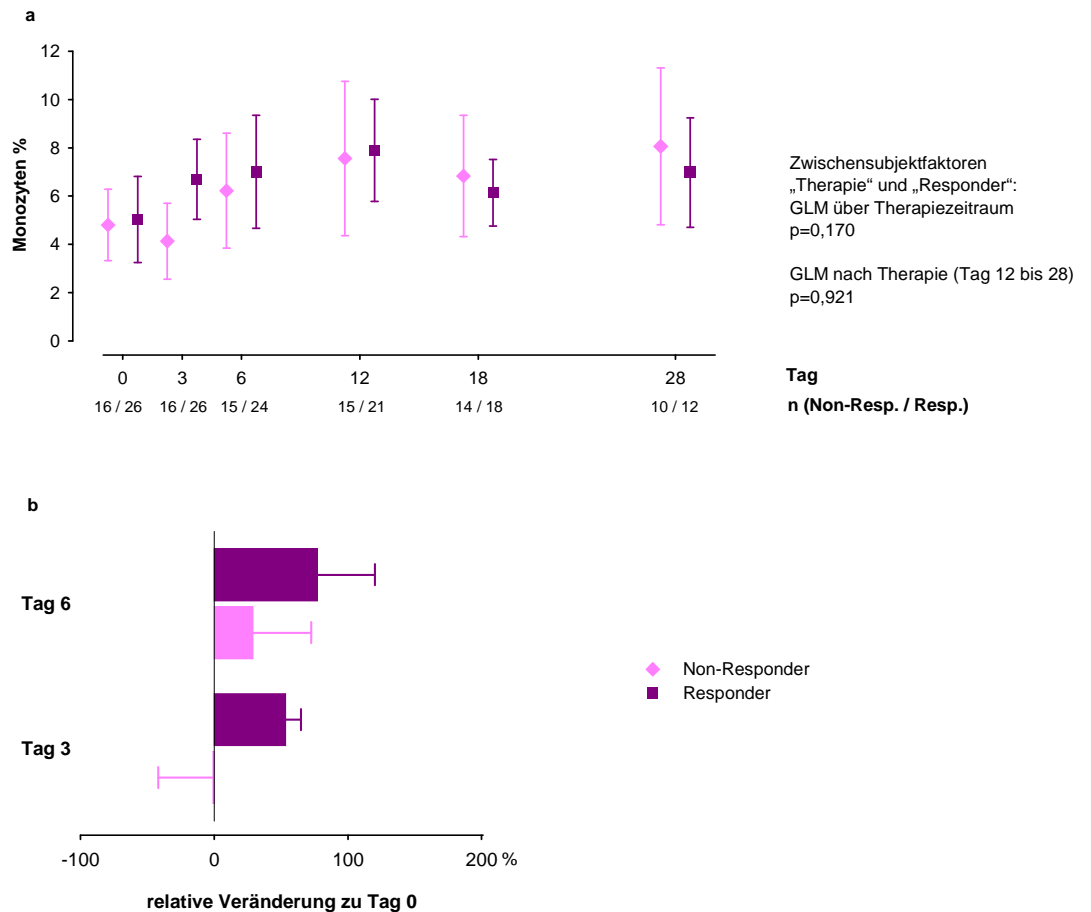




**Abb. 1: Monozyten (%) nach Therapiegruppen**

- a. Verlaufsdarstellung der durch Hydrocortison oder Placebo induzierten Effekte auf den prozentualen Anteil der Monozyten in der Leukozytenpopulation (Mittelwert  $\pm$  95% KI). Im Verlauf zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.
- b. Relative Veränderung an Tag 3 und 6 des prozentualen Anteils der Monozyten in der Leukozytenpopulation im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline). Auch hier lässt sich kein signifikanter Effekt nachweisen.

**4.1.2 Monozytenanteil (%) nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe**



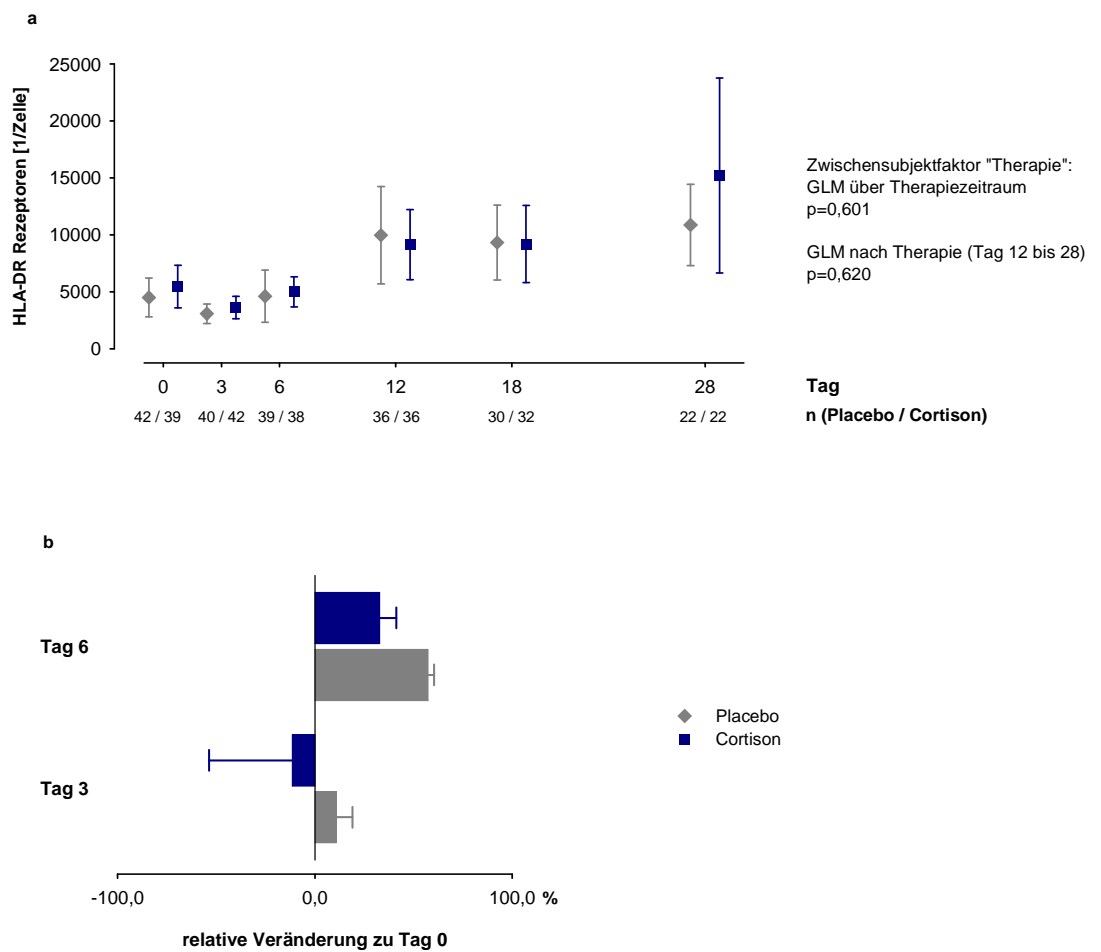
**Abb. 2: Monozyten (%) nach Respondern / Non-Respondern innerhalb der Hydrocortisongruppe**

- a. Verlaufsdarstellung des prozentualen Anteils der Monozyten in der Leukozytenpopulation zwischen Respondern und Non-Respondern unter einer Hydrocortisontherapie (Mittelwert

± 95% KI). Im Verlauf zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

- b. Relative Veränderung an Tag 3 und 6 des prozentualen Anteils der Monozyten in der Leukozytenpopulation im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline). Auch hier lässt sich kein signifikanter Effekt nachweisen. Es zeigt sich jedoch eine Tendenz zu einem höheren Monozytenanteil innerhalb der Respondergruppe.

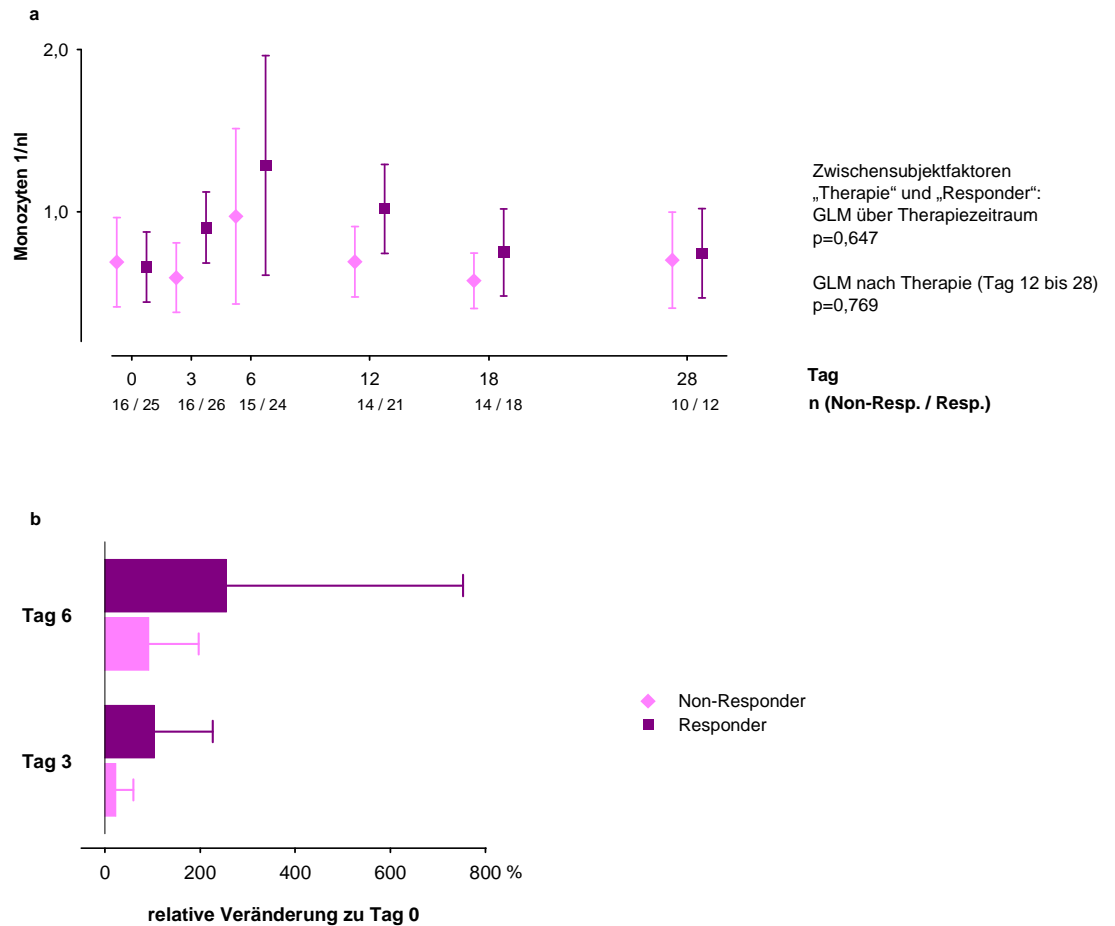
### 4.1.3 Monozytenzahl (1/nl) nach Therapiegruppen



**Abb. 3: Monozyten (1/nl) nach Therapiegruppen**

- a. Verlaufsdarstellung der Monozytenzahl pro Nanoliter unter einer Hydrocortisontherapie oder Placebothherapie (Mittelwert ± 95% KI). Im Verlauf zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.
- b. Relative Veränderung an Tag 3 und 6 des absoluten Monozytenanteils (1/nl) im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline).

#### 4.1.4 Monozytenzahl (1/nl) nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe



**Abb. 4: Monozytenzahl (1/nl) nach Responder und Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe**

- Verlaufsdarstellung der Monozytenzahl pro Nanoliter zwischen Responder und Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe (Mittelwert  $\pm$  95% KI). Im Verlauf zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.
- Relative Veränderung an Tag 3 und 6 des absoluten Monozytenanteils (1/nl) im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline). Es ist keine Signifikanz nachzuweisen. Es lässt sich allerdings eine Tendenz zu einer höheren Monozytenzahl der Respondergruppe gegenüber den Non-Respondern ablesen.

## 4.2 Effekt von Hydrocortison auf die HLA-DR Expression auf Monozyten

Weder bei der HLA-DR Rezeptorzahl pro Zelle noch bei der mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) konnte ein signifikanter Effekt von Hydrocortison gegenüber Placebo festgestellt werden. Auch zwischen Respondern und Non-Respondern blieb ein signifikanter Unterschied aus. Abgebildet wurden erneut lediglich die Werte der Responder und Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe. Bei Betrachtung der Tendenzen kann man einen Trend hinsichtlich einer geringen HLA-DR Rezeptorexpression unter einer Hydrocortisontherapie (gesamt) sowie unter Respondern innerhalb der Hydrocortisongruppe ablesen. Sowohl bei der Rezeptorzahl pro Zelle als auch bei der MFI kommt es unter eine Hydrocortisontherapie zunächst zu einem geringen Abfall an Tag 3 gegenüber Tag 1, an Tag 6 hat jedoch bereits eine Erholung stattgefunden (s. Abb 5b und 7b).

### 4.2.1 HLA-DR Rezeptoren pro Zelle nach Therapiegruppen

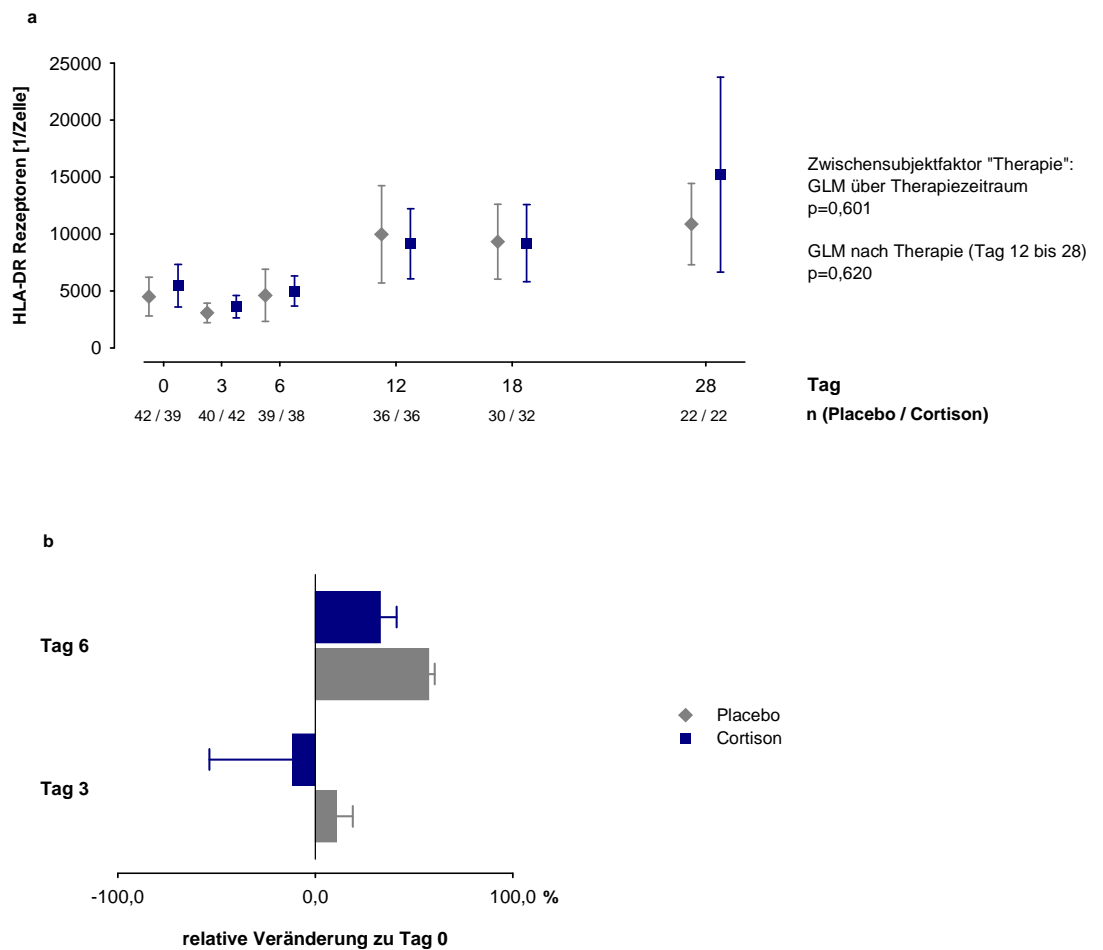


Abb. 5: HLA-DR Rezeptoren pro Zelle nach Therapiegruppen

- a. Verlaufsdarstellung des durch Hydrocortison oder Placebo induzierten Effektes auf die HLA-DR Rezeptorexpression pro Monozyt (Mittelwert  $\pm$  95% KI). Im Verlauf zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.
- b. Relative Veränderung an Tag 3 und 6 der HLA-DR Rezeptoren pro Zelle im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline). Auch hier lässt sich kein signifikanter Effekt nachweisen. Allerdings kommt es zu einer Erholung an Tag 6 des zwischenzeitigen Abfalls der HLA-DR-Expression an Tag 3 in der Hydrocortisongruppe im Verlauf des Therapiezeitraumes (dargestellt an Tag 6).

#### 4.2.2 HLA-DR Rezeptoren pro Zelle nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe

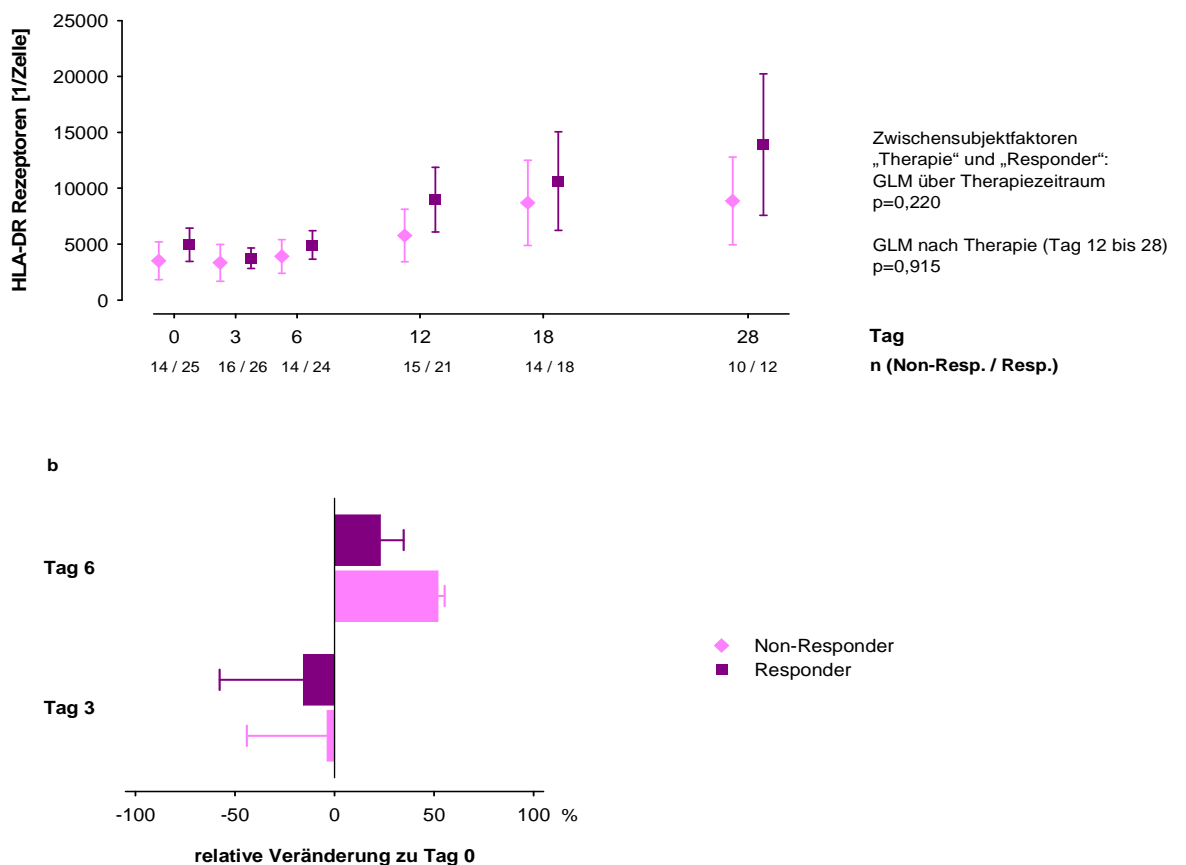
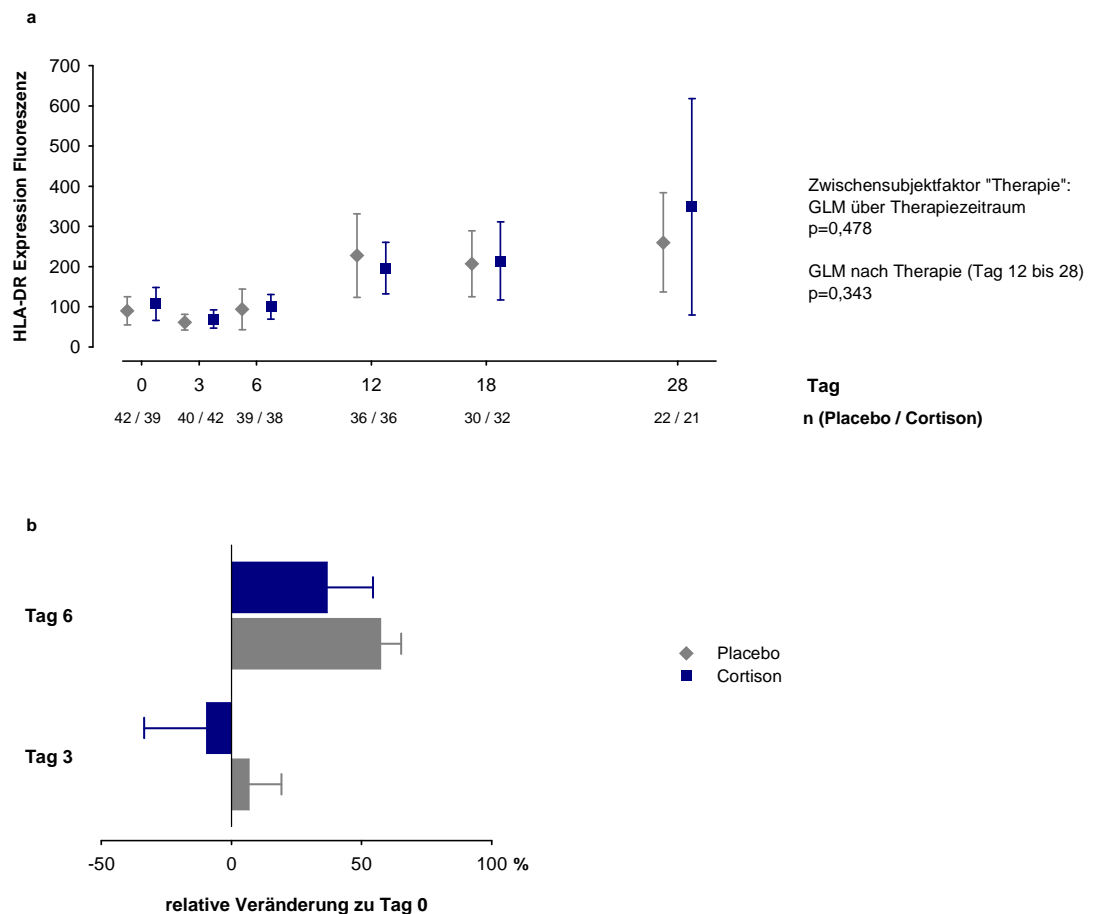


Abb. 6: HLA-DR Rezeptorzahl pro Zelle nach Responder und Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe

- a. Verlaufsdarstellung der HLA-DR-Expression zwischen Respondern und Non-Respondern innerhalb der Hydrocortisongruppe (Mittelwert  $\pm$  95% KI). Es ist kein signifikanter Unterschied nachweisbar.
- b. Relative Veränderung zwischen Respondern und Non-Respondern an Tag 3 und 6 der HLA-DR Rezeptoren pro Zelle im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline). Auch hier lässt sich kein signifikanter Effekt nachweisen. In beiden Gruppen kommt es zu einem zwischenzeitigen, geringen Abfalls der HLA-DR-Expression an Tag 3.

#### 4.2.3 HLA-DR-Expression auf Monozyten (MFI) nach Therapiegruppen



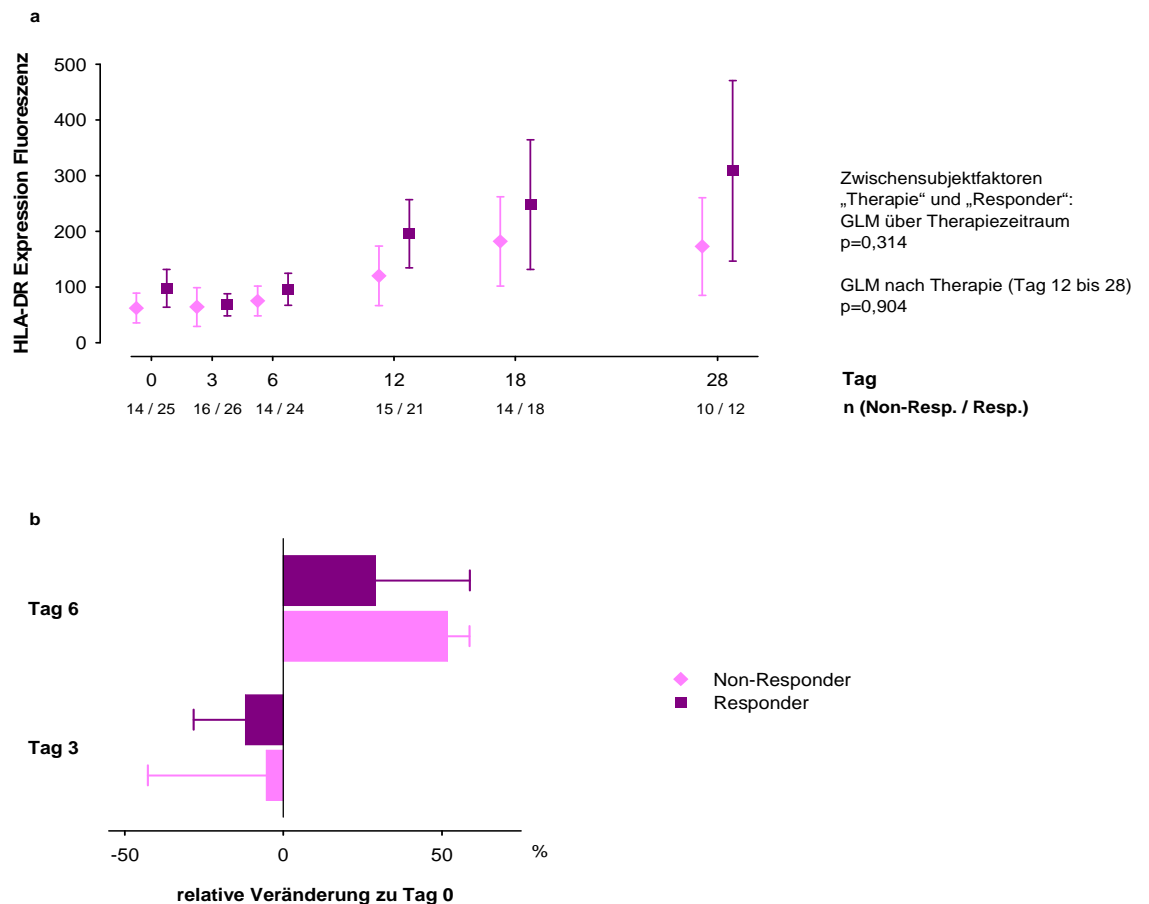
**Abb. 7: MFI der HLA-DR Rezeptoren nach Therapiegruppen**

- a. Verlaufsdarstellung der MFI der HLA-DR Rezeptoren unter einer Hydrocortisontherapie oder Placebothherapie (Mittelwert  $\pm$  95% KI). Im Verlauf zeigt sich kein signifikanter

Unterschied zwischen beiden Gruppen.

- b. Relative Veränderung an Tag 3 und 6 der MFI im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline). Auch hier lässt sich kein signifikanter Effekt nachweisen. Parallel zu der Darstellung der HLA-DR-Expression pro Zelle (s. Abb. 5) kommt es jedoch während der Hydrocortisontherapie zu einem Anstieg der MFI (Tag 6) trotz anfänglichem Abfall (Tag 3).

#### 4.2.4 HLA-DR Expression auf Monozyten (MFI) nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe



**Abb. 8: MFI der HLA-DR Rezeptoren nach Respondern und Non-Respondern innerhalb der Hydrocortisongruppe**

- a. Verlaufsdarstellung MFI zwischen Responder und Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe (Mittelwert  $\pm$  95% KI). Es ist kein signifikanter Unterschied nachweisbar.
- b. Relative Veränderung zwischen Respondern und Non-Respondern an Tag 3 und 6 der

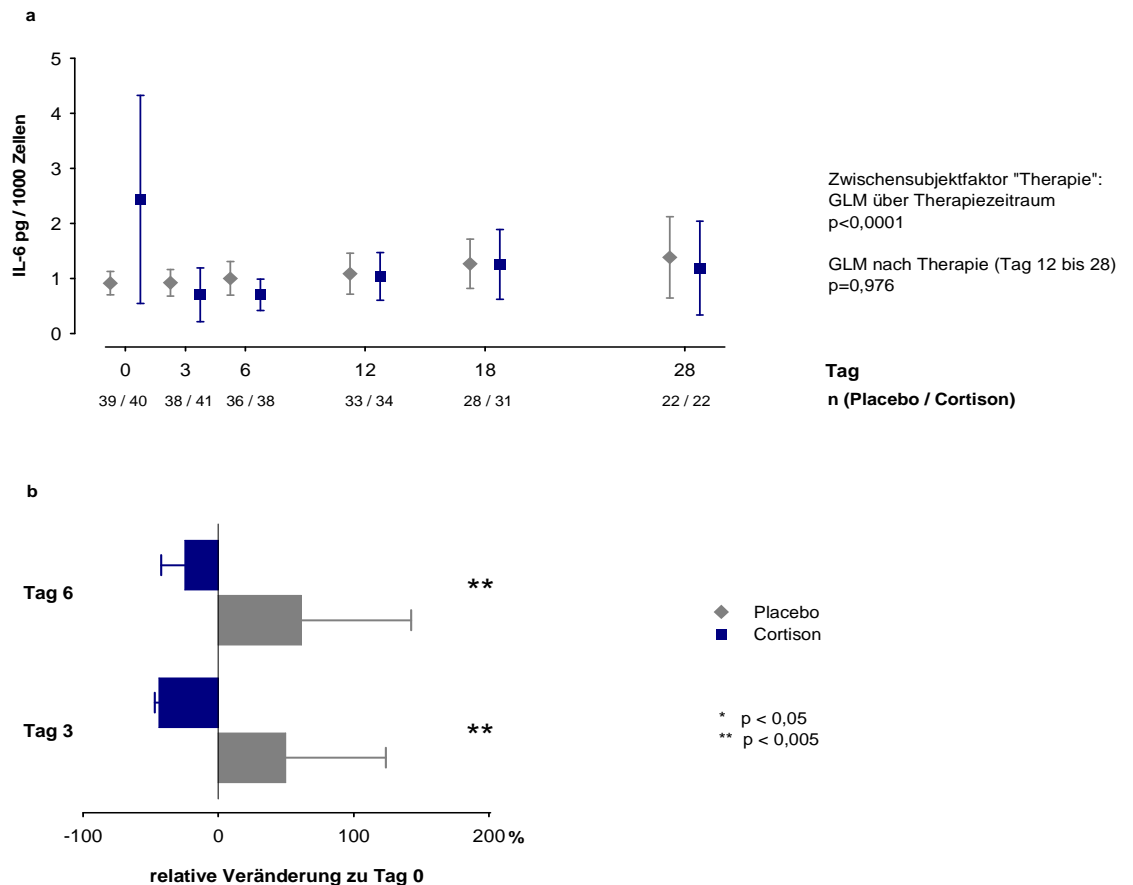
HLA-DR-Expression (MFI) im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline). Auch hier lässt sich kein signifikanter Effekt nachweisen. In beiden Gruppen kommt es zu einem Anstieg der MFI (Tag 6) trotz anfänglichem Abfall (Tag 3).



### 4.3 Effekt von Hydrocortison auf die Monozytenfunktion

Hydrocortison hat einen signifikanten Effekt auf die Monozytenfunktion. Sowohl bei der Synthese von IL-6 als auch TNF- $\alpha$  kommt es im Vergleich zur Placebogruppe zu einem signifikanten Abfall der Plasmakonzentration nach LPS-Stimulation der Monozyten (s. Abb. 9 und 15). Auch der IL-6/IL-10 Quotient zeigt bei der relativen Veränderung zu Tag 3 einen signifikanten Effekt (s. Abb. 13). Lediglich bei der IL-10 Produktion bleibt ein signifikanter Unterschied zwischen einer Hydrocortisontherapie und Placebothherapie aus. Bei Betrachtung der Responder und Non-Responder lässt sich kein signifikanter Unterschied weder innerhalb der Hydrocortisongruppe noch bei der Placebogruppe feststellen (graphisch dargestellt sind erneut lediglich die Responder / Non-Responder der Hydrocortisongruppe).

#### 4.3.1 IL-6 Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Therapiegruppen (pg/ml)



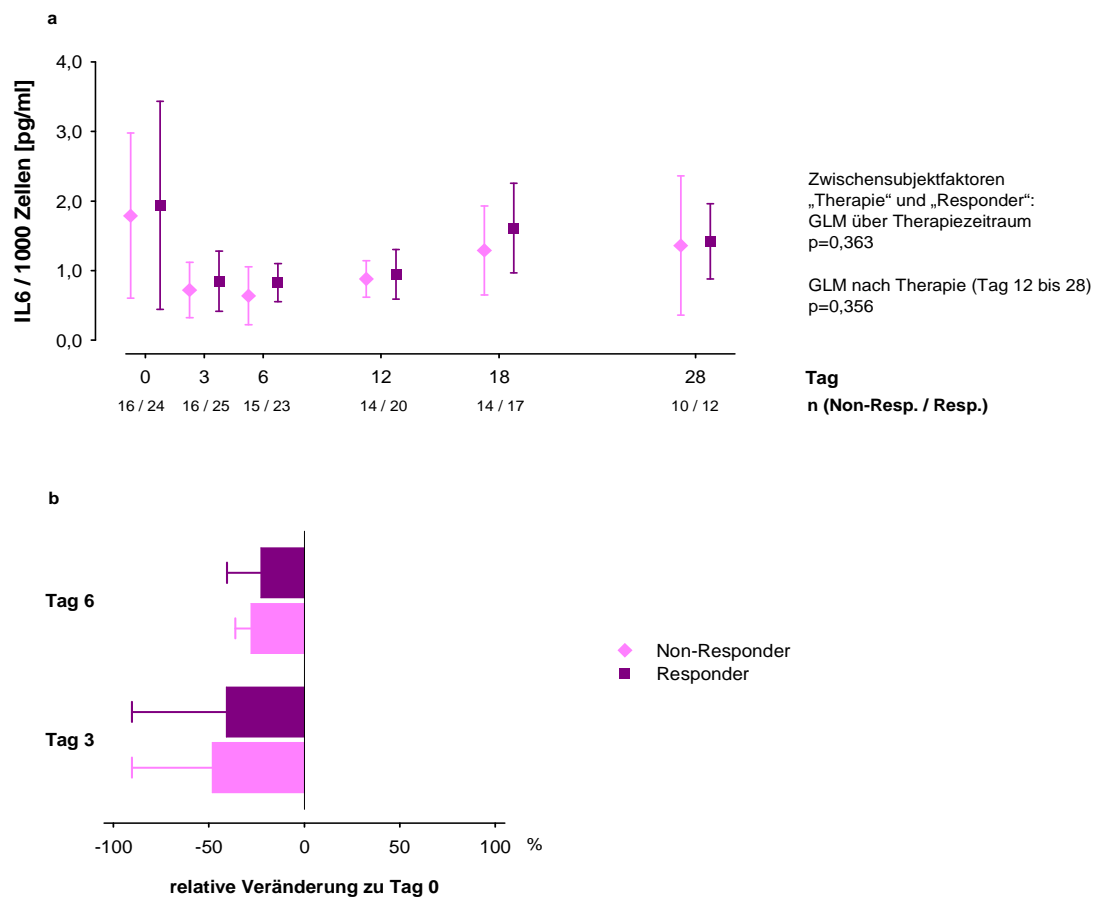
**Abb. 9: IL-6 Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS Stimulation nach Therapiegruppen (pg/ml)**

a. Verlaufsdarstellung der IL-6 Plasmakonzentration pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation

unter einer Hydrocortisontherapie oder Placebothherapie (Mittelwert  $\pm$  95% KI). Im Verlauf zeigt sich ein signifikanter Unterschied während des Therapiezeitraums ( $p < 0,0001$ ). Für die Zeit nach der Therapie bleibt ein signifikanter Effekt aus.

- b. Relative Veränderung an Tag 3 und 6 der IL-6 Plasmakonzentration pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation der Monozyten im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline). Hier ist sowohl bei der relativen Veränderung an Tag 3 als auch an Tag 6 ein hoch signifikanter Unterschied feststellbar (Tag 3:  $p = 0,001$ ; Tag 6:  $p = 0,003$ ).

#### 4.3.2 IL-6 Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe (pg/ml)



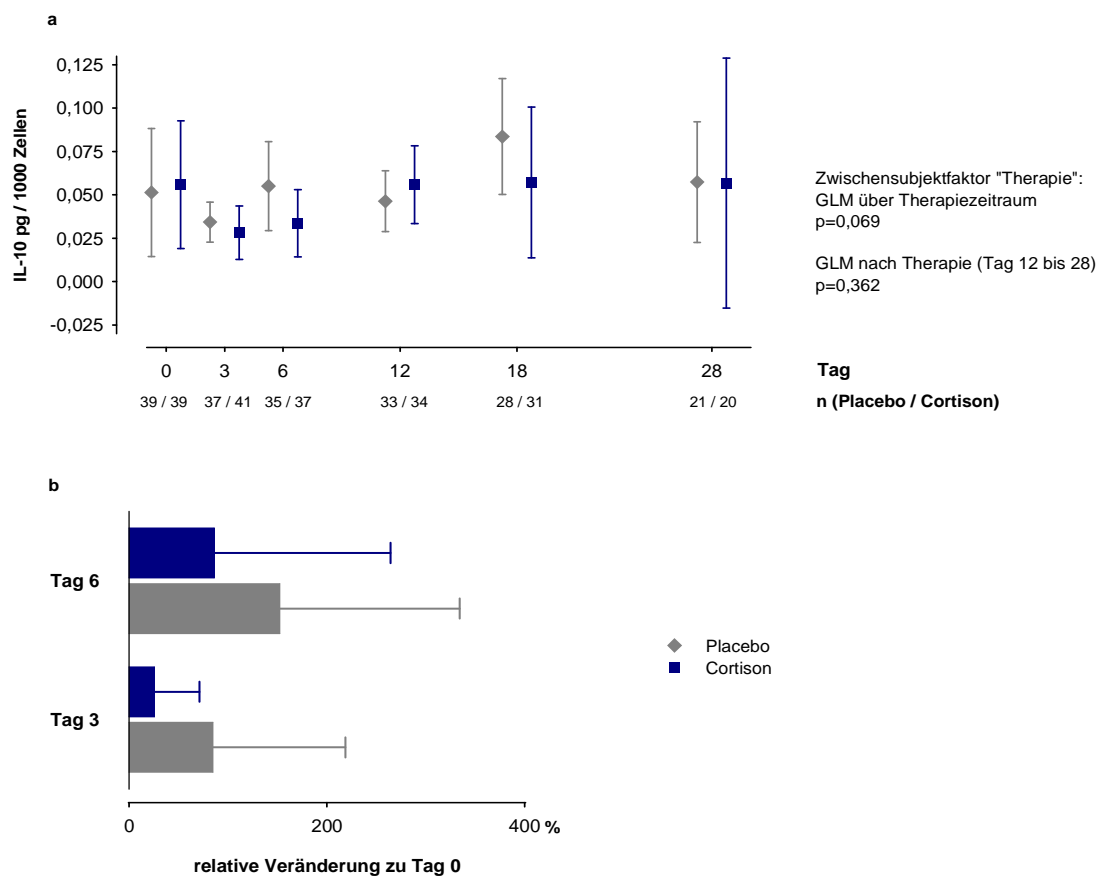
**Abb. 10: IL-6 Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe (pg/ml)**

- a. Verlaufsdarstellung der IL-6 Plasmakonzentration pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation zwischen Responder und Non-Responder (Mittelwert  $\pm$  95% KI). Im Verlauf zeigt sich kein

signifikanter Unterschied.

- b. Relative Veränderung an Tag 3 und 6 der IL-6 Plasmakonzentration pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation der Monozyten im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline). Hier lässt sich kein signifikanter Unterschied nachweisen

### 4.3.3 IL-10 Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Therapiegruppen (pg/ml)

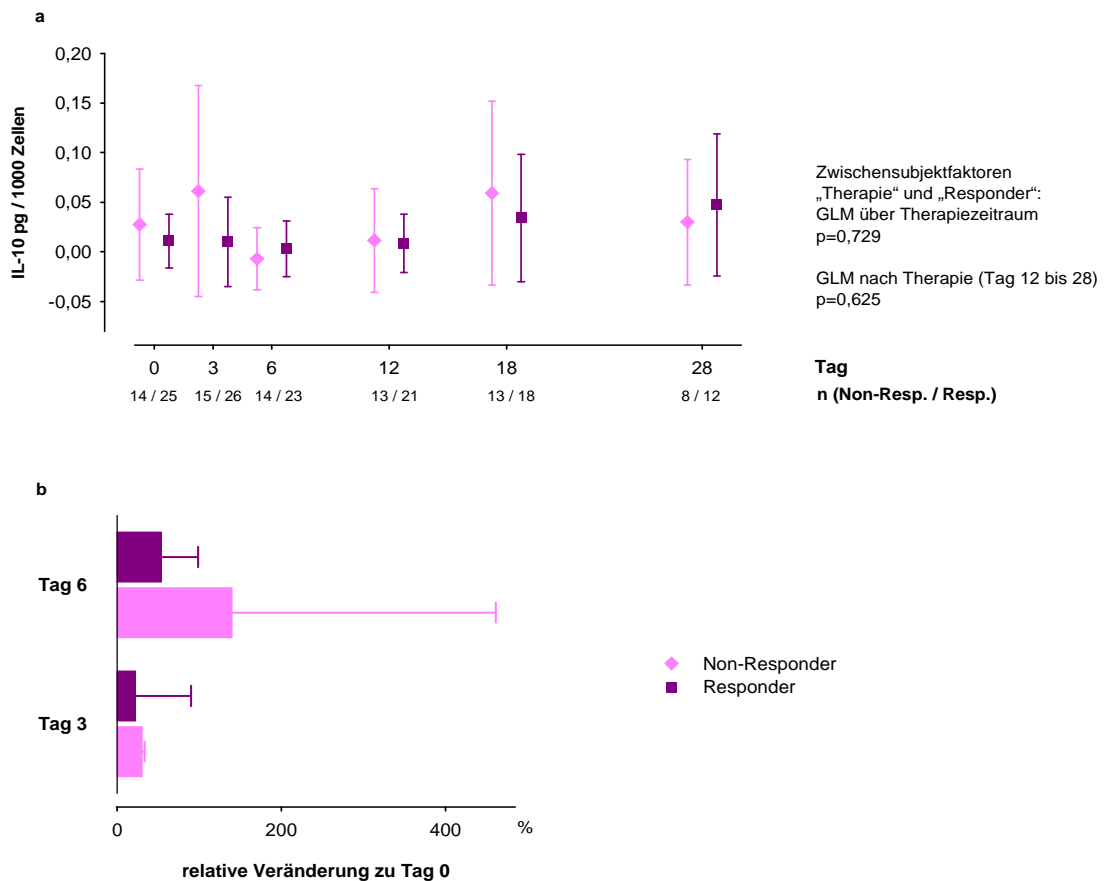


**Abb. 11: IL-10 Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Therapiegruppen (pg/ml)**

- a. Verlaufsdarstellung der IL-10 Plasmakonzentration pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation unter einer Hydrocortisontherapie oder Placebothherapie (Mittelwert  $\pm$  95% KI). Im Verlauf zeigt sich kein signifikanter Unterschied.
- b. Relative Veränderung an Tag 3 und 6 der IL-10 Plasmakonzentration pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation der Monozyten im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline).

Hier lässt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachweisen.

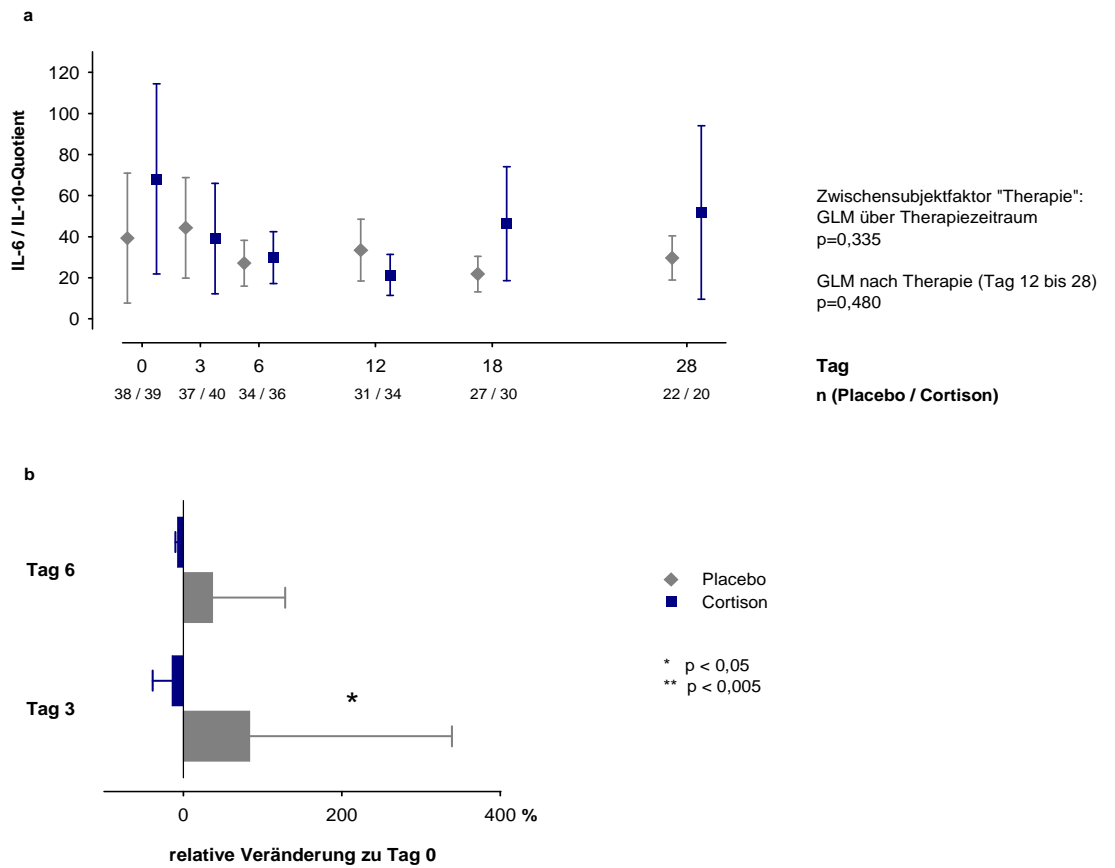
#### 4.3.4 IL-10 Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe (pg/ml)



**Abb. 12: IL-10 Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe (pg/ml)**

- Verlaufsdarstellung der IL-10 Plasmakonzentration pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation zwischen Responder und Non-Responder (Mittelwert  $\pm$  95% KI). Im Verlauf zeigt sich kein signifikanter Unterschied.
- Relative Veränderung an Tag 3 und 6 der IL-10 Plasmakonzentration pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation der Monozyten im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline). Hier lässt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachweisen

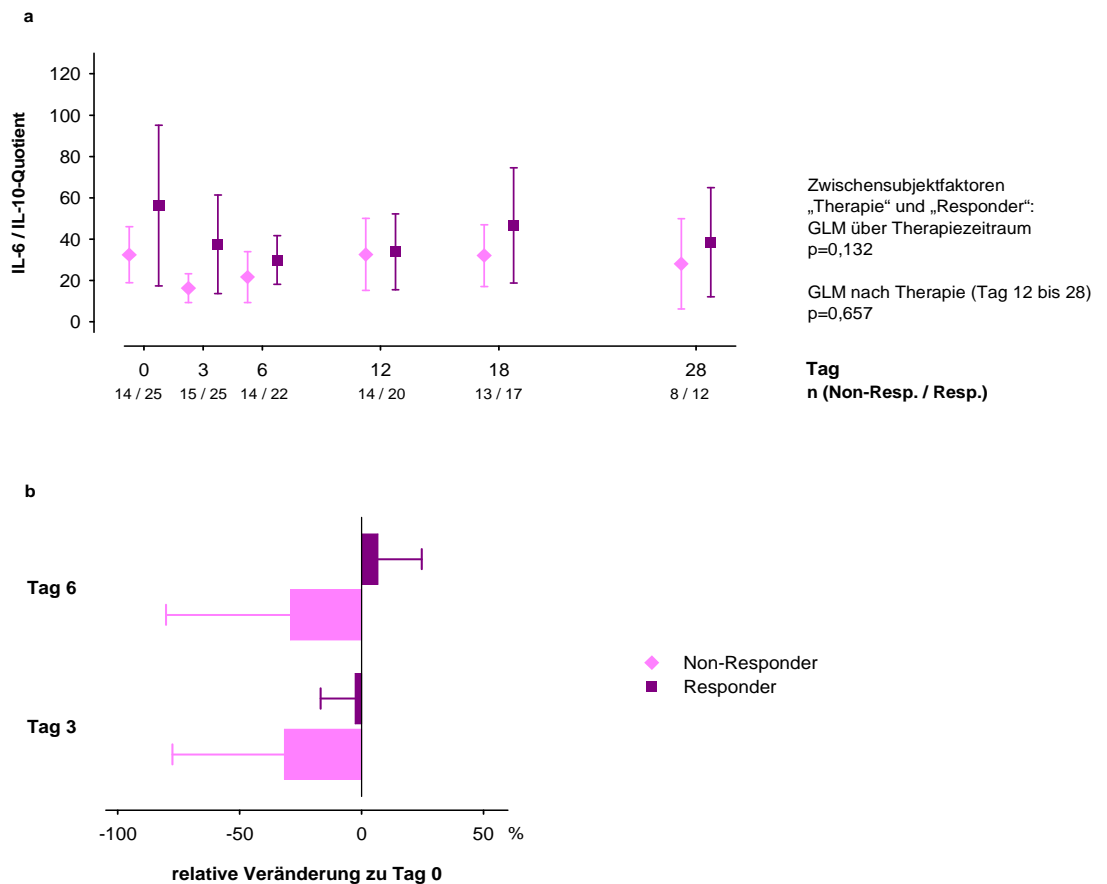
### 4.3.5 IL-6/IL-10 Quotient nach LPS-Stimulation nach Therapiegruppen



**Abb. 13: IL-6/IL-10 Quotient nach LPS-Stimulation nach Therapiegruppen**

- Verlaufsdiagramm des IL-6/IL-10 Quotienten nach LPS-Stimulation unter einer Hydrocortisontherapie oder Placebothherapie (Mittelwert  $\pm$  95% KI). Im Verlauf zeigt sich kein signifikanter Unterschied.
- Relative Veränderung an Tag 3 und 6 des IL-6/IL-10 Quotienten im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline). Hier lässt sich ein signifikanter Unterschied an Tag 3 nachweisen ( $p = 0,043$ )

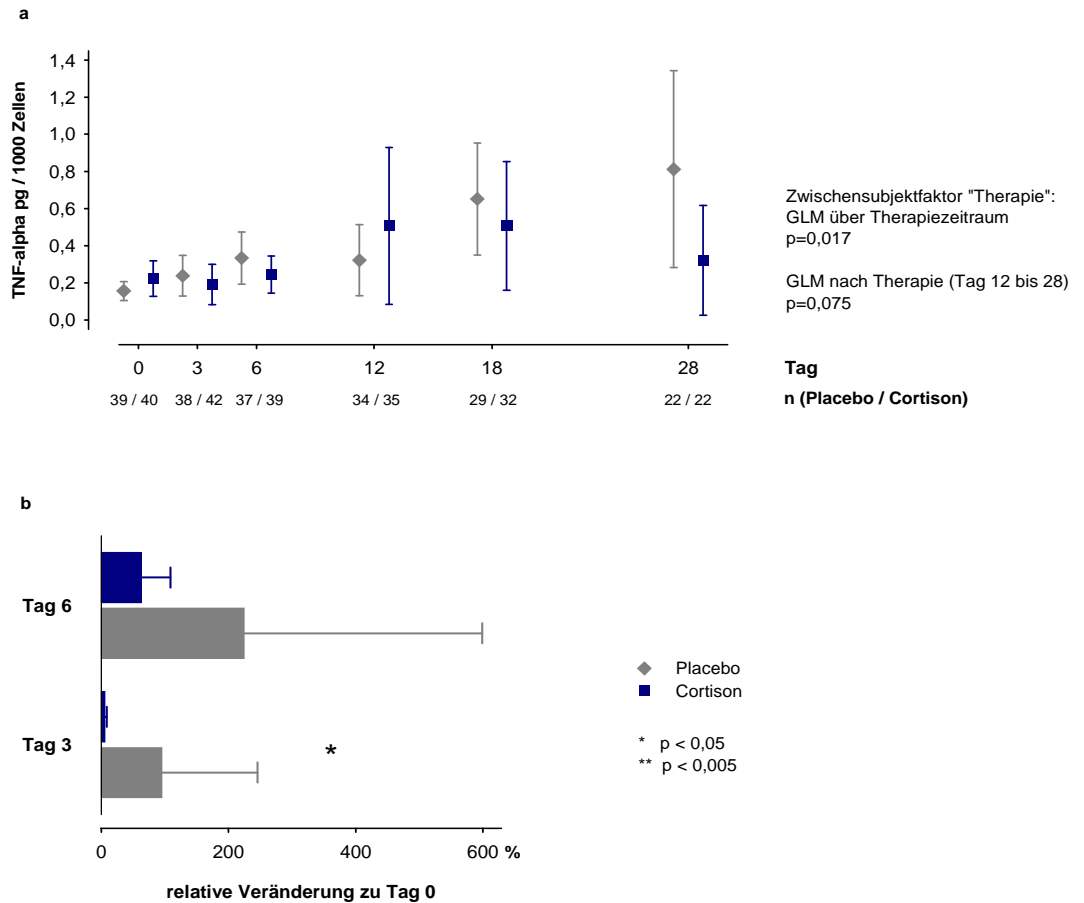
#### 4.3.6 IL-6/IL-10 Quotient nach LPS-Stimulation nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe



**Abb. 14: IL-6/IL-10 Quotient nach LPS-Stimulation nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe**

- Verlaufsdarstellung des IL-6/IL-10 Quotienten zwischen Responder und Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe (Mittelwert ± 95% KI). Im Verlauf zeigt sich kein signifikanter Unterschied.
- Relative Veränderung an Tag 3 und 6 des IL-6/IL-10 Quotienten im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline). Hier lässt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachweisen

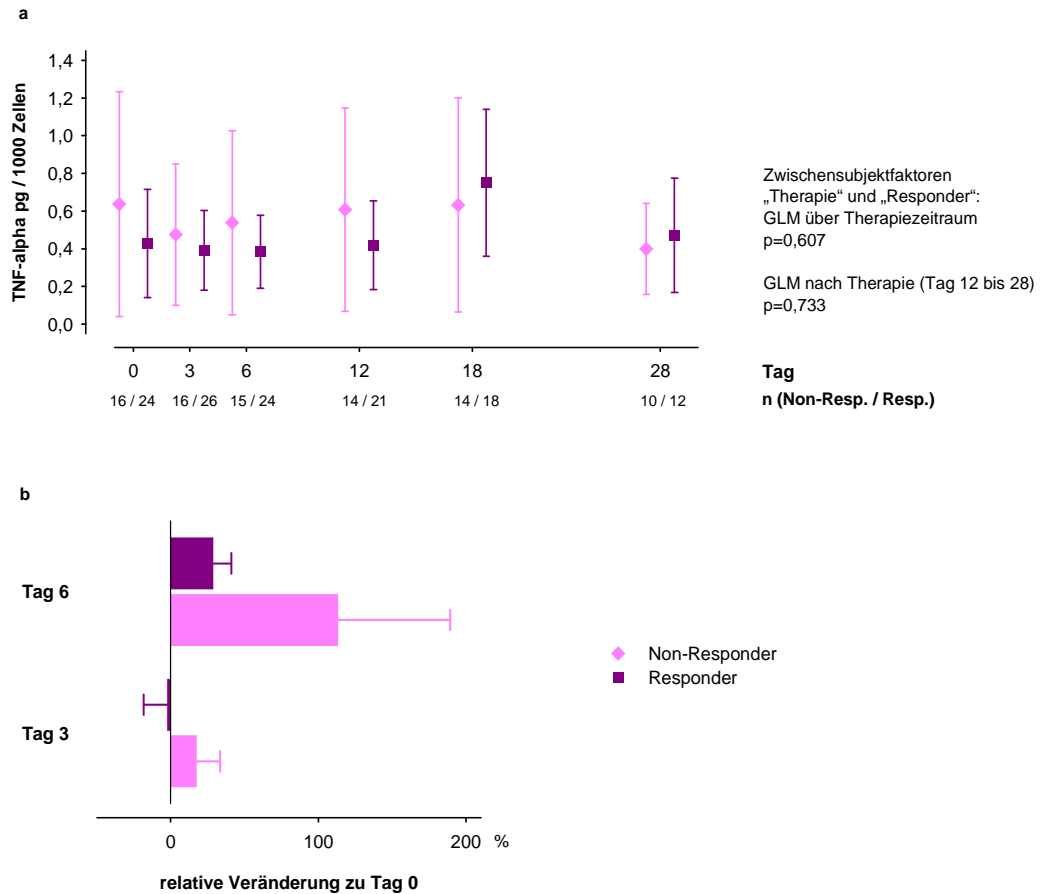
### 4.3.7 TNF- $\alpha$ Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Therapiegruppen (pg/ml)



**Abb. 15: TNF- $\alpha$  Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Therapiegruppen (pg)**

- Verlaufsdarstellung der TNF- $\alpha$  Plasmakonzentration pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation unter einer Hydrocortisontherapie oder Placebothherapie (Mittelwert  $\pm$  95% KI). Im Verlauf ist ein signifikanter Effekt von Hydrocortison während des Therapiezeitraums nachweisbar ( $p < 0,017$ ). Nach Beendigung der Therapie ist kein signifikanter Unterschied festzustellen.
- Relative Veränderung an Tag 3 und 6 der TNF- $\alpha$  Plasmakonzentration pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation der Monozyten im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline). Hier lässt sich ein signifikanter Unterschied an Tag 3 nachweisen ( $p = 0,011$ )

#### 4.3.8 TNF- $\alpha$ Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe (pg/ml)



**Abb. 16:** TNF- $\alpha$  Plasmaspiegel pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation nach Responder / Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe

- Verlaufsdarstellung der TNF- $\alpha$  Plasmakonzentration pro 1000 Zellen zwischen Responder und Non-Responder innerhalb der Hydrocortisongruppe (Mittelwert  $\pm$  95% KI). Im Verlauf zeigt sich kein signifikanter Unterschied.
- Relative Veränderung an Tag 3 und 6 der TNF- $\alpha$  Plasmakonzentration pro 1000 Zellen im Vergleich zu den Ausgangswerten an Tag 1 (Baseline). Hier lässt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachweisen.



## 5 Diskussion

### 5.1 Patientenkollektiv

Bei den Patientencharakteristika war in der Substudie im Gegensatz zum Gesamtkollektiv der CORTICUS-Studie ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Alters zu vermerken. Dies wurde bei der Analyse der Daten berücksichtigt. Das Patientenkollektiv unserer Substudie spiegelt das Patientenkollektiv der CORTICUS-Studie durchaus wieder. Im Vergleich zu dem europaweiten Kollektiv der CORTICUS-Studie ist zwar der SAPS II Score mit einem Mittelwert von 47,7 geringfügig niedriger als bei CORTICUS (49,1 Punkte), andere Studien über niedrig dosiertes Hydrocortison im septischen Schock wiesen jedoch wesentlich höhere Wert auf: 55 Punkte bei Briegel (1999) und 58 Punkte bei Annane (2002) (Briegel 1999; Annane 2002). Ebenso war der SOFA-Score bei Studienbeginn in unserem Patientenkollektiv mit 10,1 Punkten vergleichbar mit dem der CORTICUS-Studie mit 10,6 Punkten. Bollaerts Kollektiv lag mit 12 Punkten über den Werten unserer Substudie und der CORTICUS-Studie (Bollaert 1998). Die 28-Tage Letalitätsrate war mit 28,6% ebenfalls etwas niedriger als in der CORTICUS-Studie (32,9%). Briegel et al. wiesen eine ähnliche Letalitätsrate auf (30%); im Gegensatz zu Annane 2002 oder Bollaert 1998, die mit 61% bzw. 63% deutlich über unseren, der CORTICUS-Studie und Briegels Werten lagen. Unterschiedliche Einschlusskriterien sind eventuell der Grund für die höhere Letalitätsrate sowie für den höheren SAPS-Score II und dem SOFA-Score bei Annane und Bollaert. In unserer Studie galt als Einschlusskriterium eine sepsisinduzierte Hypotension mit einem systolischem Blutdruck < 90 mmHg trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution oder einer Katecholaminpflichtigkeit von mindestens einer Stunde. Voraussetzung zum Einschluss bei der Studie von Bollaert war eine mindestens 48 Stunden bestehende Katecholaminpflichtigkeit (> 10 µg/kg/min Dopamin oder eine Dosis Noradrenalin); in der Studie von Annane mussten die Patienten trotz Katecholamintherapie (> 5 g/kg/min Dopamin oder eine beliebige Dosis Noradrenalin) für mindestens eine Stunde einen systolischen Blutdruck von < 90 mmHg aufweisen (catecholaminrefraktärer Schock). Zum anderen war das Zeitfenster zum Studieneinschluss bei Annane et al 2002 wesentlich kürzer (lediglich innerhalb von 8 Stunde nach Erfüllung der Einschlusskriterien). In unserer Studie bestand ein Zeitfenster von 72 Stunden seit Schockbeginn. Es ist davon auszugehen, dass sich die Patienten von Annane und Bollaert in einem schwereren septischen Schock befunden haben als die Patienten in den anderen Studien.

Insgesamt ist aber das Patientenkollektiv unserer Substudie mit dem der CORTICUS-Studie vergleichbar.

## 5.2 Monozytenpopulation

Glucocorticoide bewirkt einen Abfall der zirkulierenden Monozyten (Sapolsky 2000). Zum einen kommt es zu einer relativen Verschiebung der Leukozytenpopulation, da es unter Glucocorticoiden zu einer Erhöhung der neutrophilen Granulozyten kommt (Hatz 1998; Sapolsky 2000), zum anderen induzieren Glucocorticoide eine Apoptose von Monozyten (Schmidt 1999). Außerdem wird eine Veränderung der Zelladhäsionsmoleküle (Krahn 1986; Garvey 1989) sowie eine verminderte Chemotaxis der Monozyten (Sapolsky 2000) unter Glucocorticoiden für den Abfall der zirkulierenden Monozytenzahl verantwortlich gemacht.

Im Gegensatz zu der häufig bei anderen Krankheitsbildern bestehenden und/oder durch höhere Glucocorticoiddosierung induzierten Monozytopenie kam es unter der Applikation von niedrig dosiertem Hydrocortison weder zu einem signifikanten Abfall der absoluten Monozytenzahl noch zu einer Reduktion des relativen Monozytenanteils in der Leukozytenpopulation. Vielmehr lässt sich eine Tendenz hinsichtlich einer Zunahme der absoluten Monozytenzahl während des Therapiezeitraums mit Hydrocortison ablesen. Auch zwischen Respondern und Non-Respondern war kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich bereits bei Keh et al. in einer Cross-over Studie zu Hydrocortison im septischen Schock: hierbei kam es sogar unter einer Hydrocortisontherapie zu einem signifikanten Anstieg der Monozytenzahl (Keh 2003).

Eine Ursache könnte in dem kurzen Applikationszeitraum von Hydrocortison liegen, so dass es noch nicht zu einer relativen Verschiebung der Monozytenzahl aufgrund eines Anstiegs der neutrophilen Granulozyten gekommen war.

Während des septischen Schocks wurde eine erhöhte Apoptoserate von Lymphozyten und gastrointestinalem Epithel beschrieben, die unter anderem für eine Anergie verantwortlich sein könnten (Hotchkiss 1999; Hotchkiss 2001). Anders als bei der immunstimulierenden Wirkung der nekrotischen Zellen, induzieren apoptotische Zellen die Synthese antiinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-10) sowie eine gesteigerte TH-2-Proliferation (Voll 1997; Green and Beere 2000). Als mögliche Ursache wurden stressinduzierte, erhöhte Cortisolwerte diskutiert (Ayala 1995; Fukuzuka 2000). Nach unseren Daten ist jedoch eine Hydrocortison-induzierte Apoptose von Monozyten eher unwahrscheinlich, da es zu keinem Zeitpunkt zu einem Abfall der Monozytenzahl kam. Vielmehr war eine Tendenz hinsichtlich einer Zunahme der absoluten Monozytenzahl nachweisbar. Tierexperimentelle Studien beschrieben zwar eine Induktion der Apoptose von Thymuszellen durch endogenes Cortisol, doch die Stressreaktion führte nicht zu einer gesteigerten Apoptoserate von Knochenmarkszellen (Ayala 1995; Ayala 1996).

Neben der bekannten immunsupprimierenden Wirkung von Hydrocortison, ist jedoch auch eine permissive, zum Teil sogar immunstimulierende Wirkung bekannt. So konnte eine gesteigerte GM-CSF-Rezeptorzahl unter Dexamethason nachgewiesen werden (Munck and Naray-Fejes-Toth 1992; Almawi 1996). Ob dies auch für eine Erhöhung der Monozytenzahl verantwortlich ist, bleibt

zu beantworten.

### 5.3 HLA-DR

Die HLA-DR Expression auf Monozyten gilt als wichtiger Marker zur Beschreibung des Immunstatus eines Patienten. Die Antigenpräsentation über MHC II Rezeptoren spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des adaptiven Immunsystems. Bei Patienten im septischen Schock findet man einen Abfall der HLA-DR Expression auf peripheren Monozyten, der mit der Schwere des Verlaufs korreliert (de Waal Malefyt 1991; Schinkel 1998; Muller Kobold 2000; Tschakowsky 2002; Le Tulzo 2004). Hierbei ist insbesondere eine langdauernde Deaktivierung der Monozyten gefürchtet, die bei einem Abfall von <30% der HLA-DR Rezeptoren auf Monozyten als Immunparalyse bezeichnet wird (Docke 1997; Monneret 2002).

Die Regulation der HLA-DR Expression ist sehr komplex: einerseits beeinflussen mehrere Zytokine sowohl stimulierend (z.B. IL-12, IFN- $\gamma$  und GM-CSF) als auch inhibierend (z.B. IL-10, TGF- $\beta$  und Prostaglandin E<sub>2</sub>, IL-6) (Volk 1996; Kox 2000; Le Tulzo 2004; Schefold 2007) die Rezeptorzahl, andererseits wirken eine Vielzahl anderer Mediatoren wie beispielsweise C5a, Adrenalin, LPS und Glucocorticoide auf die HLA-DR Rezeptorzahl (Ito 1999; Galon 2002; Le Tulzo 2004; Schefold 2007).

Glucocorticoide inhibieren in der Regel die Antigenpräsentation über MHC II Rezeptoren (Watanabe 1990; Schwiebert 1995; Sapolsky 2000; Galon 2002), welches man sich unter anderem bei der Immunsuppression in der Transplantationsmedizin oder der Behandlung von Autoimmunerkrankungen zu nutzen macht (Cupps and Fauci 1982; Mason 1991). Einerseits geschieht dies indirekt über eine vermehrte Synthese antiinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise TGF-beta, IL-10 und lösliche IFN- $\gamma$ -Rezeptoren (Galon 2002), andererseits direkt über eine Hemmung der Transkription (Galon 2002; Le Tulzo 2004). Zudem können Glucocorticoide posttranskriptorisch auf die HLA-DR Expression Einfluss nehmen, indem sie den komplexen Transport der HLA-DR Moleküle vom endoplasmatischen Retikulum an die Zelloberfläche regulieren (Koppelman 1997; Fumeaux and Pugin 2002; Morel 2002). Allerdings kristallisiert sich in den letzten Jahren zunehmend ein differenzierter Effekt von Glucocorticoiden auf die Antigenpräsentation heraus.

Bei Patienten im septische Schock findet man häufig erhöhte basale Cortisolwerte (>25  $\mu\text{g/dl}$ ) (Melby and Spink 1958; Bouachour 1995; Briegel 1996; Zaloga and Marik 2001), die teils mit einer erhöhten Sterblichkeit einhergehen (Braams 1998). Andere Autoren beschrieben jedoch auch niedrige Cortisolwerte (<20) bei bis zu 50% der Patienten im septischen Schock (Sibbald 1977; Finlay and McKee 1982; Moran 1994). Le Tulzo et al. beschrieben 2004 eine Korrelation zwischen erhöhten Cortisolwerten im Blut und der erniedrigten HLA-DR Rezeptorzahl auf zirkulierenden Monozyten (Le Tulzo 2004).

In unserem Patientenkollektiv kam es zu einem deutlichen Abfall der HLA-DR Expression auf peripheren Monozyten zum Beginn des septischen Schocks. Dies korreliert mit den Ergebnissen anderer Studien (Schinkel 1998; Muller Kobold 2000; Tschakowsky 2002; Le Tulzo 2004).

Einen Einfluss von Hydrocortison auf die HLA-DR Expression konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Sowohl während des Therapiezeitraums (Tag 1 bis 6) als auch nach Beendigung der Therapie (Tag 12 bis 28) war kein signifikanter Unterschied im Verlauf zwischen der Hydrocortisongruppe und der Placebogruppe festzustellen. Weder kommt es unter Hydrocortison zu einem signifikanten Abfall noch zu einem Anstieg der HLA-DR Rezeptorzahl. In unserer Untersuchung haben wir sowohl eine quantitative Bestimmung der HLA-DR Rezeptorzahl (n/Zelle) durchgeführt als auch die Fluoreszenzintensität der HLA-DR Expression (MFI). In beiden Untersuchungen blieb eine signifikante Veränderung aus. An Tag 3 kommt es zwar bei der relativen Veränderung zu Tag 1 zu einer geringen, nicht signifikanten Abnahme der HLA-DR Rezeptorzahl auf den Monozyten, an Tag 6 ist diese jedoch nicht mehr festzustellen und es kommt sogar trotz einer Hydrocortisontherapie zu einem Anstieg der HLA-DR Rezeptorzahl im Vergleich zu den Ausgangswerten.

Vergleicht man Responder mit Non-Respondern innerhalb einer Therapiegruppe, so kann man auch hier keinen signifikanten Unterschied feststellen – weder im Verlauf während des Therapiezeitraums (Tag 1 bis 6) noch nach Beendigung der Therapie (Tag 12 bis 28) oder bei den Relativveränderungen an Tag 3 und 6 zu Tag 1.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass unsere Studie keinen Effekt einer niedrig dosierten Hydrocortisonapplikation auf die HLA-DR Rezeptorexpression auf peripheren Blutmonozyten nachweisen konnte.

Der ausgebliebene Effekt von Hydrocortison auf die HLA-DR Expression peripherer Monozyten kann unterschiedliche Ursachen haben:

1. Die Hydrocortison-Dosierung war zu niedrig, um eine Suppression zu induzieren
2. Das Zeitintervall der Hydrocortisontherapie war zu kurz
3. Der initiale Abfall der HLA-DR Expression war bereits so ausgeprägt, dass eine zusätzliche Hydrocortison-Applikation keinen weiteren Effekt hatte
4. Der immunmodulatorische Effekt von niedrigdosiertem Hydrocortison überwiegt im septischen Schock anstelle der bekannten immunsuppressiven Eigenschaften

Ad 1

Bei Patienten im septischen Schock konnte man eine reduzierte Ansprechbarkeit der Zellen auf Cortisol feststellen. Insbesondere in den letzten Jahren ist dieser Aspekt immer mehr in der Fokus

der Wissenschaft gelangt. Das Phänomen einer peripheren Cortisolresistenz und einer relativen NNR-Insuffizienz wurde 2008 als „critical illness-related corticosteroid insufficiency“ (CIRCI) bezeichnet und Empfehlungen zur Diagnose und Therapie erarbeitet (Marik 2008). Die Ursache dieser peripheren Cortisolresistenz ist weiterhin nicht geklärt und könnte zum einen auf einem modulierten Cortisolabbau oder auf einer Veränderung der Rezeptoraffinität beruhen (Molijn 1995; Beishuizen 2001; Meduri 2002). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass ein hydrocortisonabhängiger Effekt auf die HLA-DR Expression ausgeblieben ist.

Ad 2

Unsere Datenlage kann sicherlich nicht klären, ob das Zeitintervall der Hydrocortison-Applikation zu kurz war, um einen signifikanten Effekt auf die HLA-DR Rezeptorexpression zu haben. Allerdings ist der Therapiezeitraum von 5 Tagen mit einem Ausschleichen der Medikation für weitere 6 Tage relativ lang, sodass das kurze Zeitintervall als mögliche Ursache des ausgebliebenen Effektes unwahrscheinlich ist.

Ad 3

Die Fähigkeit der HLA-DR Rezeptorexpression auf peripheren Blutmonozyten ist bereits zu Beginn des septischen Schocks stark eingeschränkt. Die HLA-DR Rezeptorzahl auf Monozyten ist ein prädiktiver Faktor der mit der Schwere des Verlaufes korreliert. In unserem Patientenkollektiv ist ebenso die HLA-DR Expression stark vermindert. Zu Beginn des Therapiezeitraums (Tag 1 bis 6) kommt es an Tag 3 zu einem leichten Abfall der HLA-DR Expression im Vergleich zu Tag 1 (Baseline). Gleiches wurde in der Cross-over-Studie von Keh et al. 2003 festgestellt (Keh 2003). Auch hier kam es zu Beginn der Therapie (Therapiezeitraum 3 Tage) bei Patienten im septischen Schock zu einem leichten, nicht signifikanten Abfall der HLA-DR Expression. Nach Absetzen von Hydrocortison kam es allerdings zu einem signifikanten Anstieg der HLA-DR Expression. Möglicherweise hat die Hydrocortison-Applikation eine Erholung der HLA-DR Rezeptorexpression supprimiert. Hier ist jedoch zu bemerken, dass es in der umgekehrten Gruppe (ersten drei Tage Placebo und im zweiten Studienabschnitt Hydrocortison) nicht zu einem signifikanten Abfall der HLA-DR Expression gekommen ist. Zudem ist in unserer Studie kein signifikanter Unterschied zwischen der Hydrocortisongruppe und der Placebogruppe im Verlauf festzustellen (sowohl während des Therapiezeitraums als auch nach Therapie).

Ad 4

Insbesondere auf diesen letzten Punkt möchte ich im Folgenden weiter eingehen: Mehrfach konnten Studien eine immunsuppressive Eigenschaft von Glucocorticoiden nachweisen. In letzter Zeit konnte jedoch zunehmend eine immunstimulierende Wirkung gezeigt werden. Häufig wurde eine dosisabhängige Wirkung nachgewiesen, die je nach Immunparameter eine Stimulation oder

Suppression zur Folge hatte. In unserem Patientenkollektiv blieb ein signifikanter Abfall oder eine langsamere Erholung der HLA-DR Expression aus. Genexpressionsanalysen zeigten, dass eine niedrige Konzentrationen von Glucocorticoiden (10-11 M) zu einem Anstieg der HLA-DR Expression führt, höhere Konzentrationen dagegen eine suppressive Wirkung haben (Galon 2002). Hawrylowicz et al. wiesen außerdem einen synergistischen Effekt von Dexamethason und GM-CSF nach, der zu einem Anstieg der HLA-DR Expression auf Monozyten führte (Hawrylowicz, 1994). Pangault et al. hingegen zeigten 2006, dass es bei Patienten im septischen Schock zu einer erniedrigten GM-CSF Rezeptorzahl auf Monozyten kommt und dass diese posttranskriptionale Downregulation glucocorticoidabhängig sei (Pangault 2006).

Die Therapie mit IFN- $\gamma$  während einer Immunparalyse führt zu einem Anstieg der HLA-DR Expression (Docke 1997; Kox 2000). Glucocorticoide hemmen die Synthese von IFN- $\gamma$  (Franchimont 1998; Galon 2002). Allerdings konnte unter einer Hydrocortisontherapie im septischen Schock eine Reduktion des IFN- $\gamma$  Plasmaspiegels nicht sicher nachgewiesen werden (Keh 2003). IFN- $\gamma$  ist ein wichtiger Induktor zur Wiederherstellung einer monozytären Immunität und erhöht maßgeblich die HLA-DR Rezeptorzahl auf Monozyten (Young and Hardy 1995; Docke, 1997). Zudem zeigten Galon et al. eine Expressionssteigerung von IFN- $\gamma$ RI und IFN- $\gamma$ RII durch Dexamethason (Galon 2002).

Glucocorticoide bewirken einen Shift von Th-1 zu Th-2 Zellen, welches zu einem Übergewicht der antiinflammatorischen Zytokinproduktion (IL-4 und IL-10) führt (Brinkmann and Kristofic 1995; Ramirez 1996). IL-10 ist ein starker Inhibitor der HLA-DR Expression. Keh et al. arbeiteten jedoch in einer Cross-over-Studie zu Hydrocortison im septischen Schock eine Downregulation einer systemischen inflammatorischen Immunantwort heraus ohne jedoch die Th-1 abhängige Antwort zu inhibieren. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Konzentration von IL-12 p70 und IFN- $\gamma$ , welche beide einen positiven Einfluss auf die HLA-DR Rezeptorzahl haben. Die IL-4-Konzentration hingegen blieb unverändert, die IL-10 Plasmakonzentration war unter einer Hydrocortisontherapie sogar geringer als in der Kontrollgruppe. Nach Absetzen von Hydrocortison kam es zu einem Anstieg der IL-10 Konzentration. Hieraus schlussfolgerten die Autoren, dass ein glucocorticoidinduzierter Shift von Th-1 zu Th-2 möglicherweise nicht erfolgt sei (Keh 2003). Ein ausgebliebener Anstieg der IL-10 Plasmakonzentration könnte eine Ursache sein für die fehlende HLA-DR Expressionsreduktion. Als Ursache einer schnellen HLA-DR Downregulation durch IL-10 wird eine Internalisierung der HLA-DR Moleküle in den Membranen der intrazellulären Kompartimente verantwortlich gemacht (Koppelman 1997; Morel 2002). Auf der anderen Seite würde ein genomischer Effekt auf die Expressionrate, wie bei Hydrocortison beschrieben, zwar verzögert, möglicherweise jedoch längerfristiger wirken (Le Tulzo 2004).

So wird die Rolle von IL-10 bei einer länger dauernden Monozytendeaktivierung in letzter Zeit zunehmend in Frage gestellt. Bei Psoriasispatienten konnten ähnlich hohe Werte von IL-10 im Plasma gefunden werden wie bei Patienten im septischen Schock ohne dass dies zu einer Immunsuppression geführt hat (Asadullah 1998). Diskutiert wird, dass LPS über eine zunehmende Produktion von IL-6 und C5a zu einer Suppression der HLA-DR Expression führt (Scheffold 2007): eine Immunoabsorption von Endotoxin, IL-6 und C5a mittels Dialyse führte zu einer signifikanten

Verbesserung der HLA-DR Expression auf Monozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Gabe von Hydrocortison im septischen Schock führt zu einer Reduktion des IL-6 Plasmalevels (Briegel 2001; Keh 2003). Möglich ist, dass eine Reduktion der IL-6 Plasmakonzentration durch Hydrocortison einer zusätzlichen Reduktion der HLA-DR Expression entgegenwirkt.

Abschließend stellt sich die Frage, warum ein Unterschied zwischen Respondern und Non-Respondern innerhalb der Therapiegruppen ausgeblieben ist. In unserem Patientenkollektiv haben wir den Einfluss von Hydrocortison auf den Verlauf der HLA-DR Expression untersucht. Unsere Daten können die Ursache dieses ausgebliebenen Effekts nicht klären. Zur Einteilung einer relativen NNR-Insuffizienz war die Differenz der Konzentrationen zwischen T0 und T60 ( $\delta$ -max) ausschlaggebend. Stieg der Serumcortisolwert um  $\leq 9 \mu\text{g/dl}$  ( $248 \mu\text{mol/l}$ ) vom Basalcortisolwert an, wurde eine relative NNR-Insuffizienz diagnostiziert. Die Ausprägung der relativen NNR-Insuffizienz bleibt ungeklärt. Unser Patientenkollektiv hatte voraussichtlich einen weniger schweren septischen Schockverlauf als das Patientenkollektiv anderer Studien (vgl. Diskussion Patientenkollektiv) (Bollaert 1998; Briegel 1999; Annane 2002). Auch im Vergleich mit dem europaweiten Studienkollektiv von CORTICUS war der SAPS II Score (47,7 gegenüber 49,1), SOFA-Score (10,1 gegenüber 10,6) und die 28-Tage Letalität (28,6 % gegenüber 32,9 %) in unserer Substudie niedriger. Möglicherweise ist der Unterschied zwischen Respondern und Non-Respondern in unserem Patientenkollektiv zu gering als dass sich ein signifikanter Unterschied der Daten ergeben kann. Außerdem wird in den letzten Jahren das Konzept der relativen NNR-Insuffizienz zunehmend neu bewertet. Wie bereits in dieser Arbeit angesprochen, geht man neben einer relativen NNR-Insuffizienz zusätzlich von einem schlechteren Ansprechen des Gewebes auf Cortisol aus, das als „Critical illness-related corticosteroid insufficiency (CIRCI)“ bezeichnet wird.

Letztendlich können unsere Daten selbstverständlich nicht den komplexen Zusammenhang zwischen Hydrocortison und der HLA-DR Expression auf peripheren Monozyten bei Patienten im septischen Schock klären, allerdings war eine wichtige Erkenntnis, dass ein weiterer Abfall oder eine langsamere Erholung der HLA-DR Rezeptorzahl ausblieb. Dies stärkt die Hypothese, dass Hydrocortison im septischen Schock immunmodulatorisch und nicht immunsuppressiv wirkt. Um weitere Aufschlüsse über den Regulationsmechanismus von Hydrocortison und der HLA-DR Expression zu gewinnen bedarf es weiterer Studien.

## 5.4 Monozytenfunktion

Eine verminderte Expression von HLA-DR auf Monozyten bedeutet eine Einschränkung der Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen und somit einen erheblichen Einschnitt in die Infektabwehr des adaptiven Immunsystems. Eine Expression von HLA-DR ist jedoch nicht nur Ausdruck einer intakten Infektabwehr mittels Antigenpräsentation, sondern ebenfalls Indikator für eine uneingeschränkte Monozytenfunktion. Niedrige HLA-DR Rezeptorzahlen gehen mit einer verminderten monozytären Syntheseleistung proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-6 und TNF- $\alpha$  einher und sind somit Ausdruck einer Deaktivierung der Monozyten (Docke 1997). Wichtig ist bei der Betrachtung einer Monozytenfunktion der Effekt der Endotoxintoleranz: Bei gesunden Patienten führt eine *in vitro* Stimulationen von Monozyten mit LPS in den ersten 4 – 8 Stunden zu einer vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF und G-CSF. Im Gegensatz hierzu kommt es 24 – 48 Stunden nach Stimulation zu einer vermehrten Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (de Waal Malefyt 1991). Eine erneute Exposition gegenüber LPS führte zu einer verminderten Synthese proinflammatorischer Zytokine und einer vermehrten Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (Randow 1995).

Während des septischen Schocks findet man häufig erhöhte Plasmaspiegel von TNF- $\alpha$  und IL-6, die mit der Schwere der Erkrankung und der Prognose korrelieren (Munoz 1991). Allerdings scheint diese proinflammatorische Entzündungsreaktion (SIRS) hauptsächlich zu Beginn des septischen Schocks vorzuliegen, da andere Studien eine geringere Fähigkeit der Produktion proinflammatorischer Zytokine bei Patienten mit Sepsis feststellen konnten als bei Kontrollgruppen (s. Kapitel Einleitung). Im Verlauf des septischen Schocks kommt es zu einer Aktivierung des antiinflammatorischen Immunsystems (CARS), welches sich in einem Anstieg antiinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-10 zeigt. Bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock korreliert der erhöhte IL-10 Plasmaspiegel mit dem Schweregrad der Erkrankung und einer schlechteren Prognose (Friedman 1997; Gogos 2000). Dieser klassische, phasenhafte Verlauf des septischen Schocks wird jedoch mittlerweile immer mehr in Frage gestellt und zusätzlich erweitert durch den Begriff des „mixed anti-inflammatory response syndrome (MARS)“. Heutige Erkenntnisse zeigen, dass es bereits in der Frühphase des septischen Schocks zu einer pro- als auch antiinflammatorischen Immunreaktion kommen kann (Tschaiakowsky 2002; Osuchowski 2006).

Munoz et al. zeigten, dass eine Erholung der monozytären proinflammatorischen Zytokinproduktion (IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ ) mit einer höheren Überlebendenswahrscheinlichkeit während des septischen Schocks einherging. Die Ursache einer Monozytendeaktivierung im septischen Schock wird bis heute ausgiebig diskutiert: als mögliche Mediatoren werden u.a. Cortisol, Katecholamine, PGE<sub>2</sub>, IL-10 und TGF- $\beta$  genannt (Randow 1995; Haveman 1999; Le Tulzo 2004).

Glucocorticoide bewirken eine Deaktivierung der Monozyten. Dies geschieht zum einen über eine Induktion der IL-10- und TGF- $\beta$ -Synthese und zum anderen durch einen T-Zell-Shift von Th-1 zu



Th-2 (Oursler 1993; Galon 2002). Zudem hemmen Glucocorticoide die Synthese des monozytenaktivierenden Zytokins IFN- $\gamma$ .

Im Folgenden soll nun die Monozytenfunktion unseres Studienkollektivs anhand einer ex-vivo 4 bzw. 24 Stunden Stimulation mit LPS und anschließender Messung der IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  Plasmaspiegel analysiert werden.

In unserer Studie kam es unter der Hydrocortisontherapie zu einem signifikanten Abfall der IL-6-Produktion nach LPS-Stimulation der Monozyten. Die Produktivität pro 1000 Zellen war signifikant geringer in der Hydrocortison-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe. Dies war sowohl bei Betrachtung des Verlaufs während der Therapie als auch bei der Relativveränderung an Tag 3 und 6 zu Tag 1 festzustellen. Betrachtet man Responder und Non-Responder innerhalb der Hydrocortison-Gruppe konnte hinsichtlich der IL-6-Produktion kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Bei der Untersuchung der IL-10 Produktion pro 1000 Zellen nach LPS-Stimulation fand sich kein signifikanter Unterschied. Es kam weder zu einem Abfall noch zu einem Anstieg des IL-10 Plasmaspiegels. Auch zwischen Respondern und Non-Respondern war kein signifikanter Effekt nachweisbar.

Der IL-6/IL-10 Quotient ergab im Verlauf keinen signifikanten Unterschied. An Tag 3 kam es jedoch in der Hydrocortisongruppe bei der Relativveränderung zu einem signifikanten Abfall des IL-6/IL-10 Quotienten im Vergleich zu Tag 1 gegenüber der Placebogruppe. Dies erklärt sich aus dem signifikanten Abfall von IL-6 und den nahezu gleich bleibenden Werten von IL-10 nach LPS-Stimulation. Zwischen Respondern und Non-Respondern war erneut kein signifikanter Effekt festzustellen. Die TNF- $\alpha$  Produktion war unter Hydrocortison signifikant verringert: sowohl im Verlauf des Therapiezeitraums als auch bei der Relativveränderung an Tag 3 gegenüber Tag 1. Einen signifikanten Unterschied zwischen Responder und Non-Respondern innerhalb der Therapiegruppen konnte man nicht nachweisen.

Zusammenfassend ist in unserem Studienkollektiv ein signifikanter Effekt von Hydrocortison auf die Monozytenfunktion festzustellen. Interessanterweise scheint Hydrocortison eine Endotoxintoleranz zu verstärken: es kommt zu einem selektiven Abfall der Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IL-6 und TNF- $\alpha$ ) an Tag 3 gegenüber Tag 1. Allerdings bleibt ein Sekretionsabfall des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 aus.

Ein Abfall der Produktivität proinflammatorischer Zytokine korreliert mit den Erkenntnissen früherer Studien. Die Synthese von IL-6 und TNF- $\alpha$  ist unter Glucocorticoiden vermindert (Franchimont 1998; Galon 2002). Umgekehrt sollte die Plasmakonzentration von IL-10 unter Glucocorticoiden stark ansteigen (Galon 2002). Dieser Effekt blieb jedoch aus. Diesen Effekt des Abfalls der IL-6 Konzentration ohne Anstieg des IL-10 Plasmaspiegels unter einer Hydrocortisontherapie im septischen Schock korreliert mit den Ergebnissen anderer Studien (Keh 2003; Oppert 2005).

Eine Hydrocortisongabe scheint demzufolge nicht eine antiinflammatorische Reaktion bei Monozyten im septischen Schock zu unterstützen. Möglicherweise ist dies ein dosisabhängiger

Effekt von Hydrocortison. Mehrere Studien konnten eine Dosisabhängigkeit bei der Glucocorticoidwirkung nachweisen: niedrige Dosen stimulieren beispielsweise die Produktion von IL-10 (van der Poll 1996; Verhoef 1999; Richards 2000), hohe Dosen hemmen die Zytokinsynthese (Brattsand and Linden 1996; van der Poll 1996; Franchimont 1998; Larsson 1999). Sicher ist jedoch, dass eine rein antiinflammatorische Wirkung von Hydrocortison im septischen Schock auf die Monozytenfunktion ausgeblieben ist. Zudem sollte neben einem dosisabhängigen Effekt von Hydrocortison der Einfluss des Zeitpunktes der Hydrocortisonapplikation diskutiert werden. Barber et al. zeigten beispielsweise, dass bei Menschen eine bis zu einwöchige Vorbehandlung mit Cortisol den TNF- $\alpha$  und IL-6 Plasmaspiegel nach Endotoxinexposition ansteigen ließ, eine Cortisolbehandlung nach Exposition jedoch suppressierend auf den Zytokinspiegel wirkte (Barber 1993).

Zusätzlich werden Cofaktoren eine Rolle spielen bei der Beeinflussung der Monozytenfunktion: so konnte beispielsweise eine stimulierende Wirkung von GM-CSF und Glucocorticoiden nachgewiesen werden (Hawrylowicz 1994) oder der positive Einfluss von IFN- $\gamma$ . Wie bereits beschrieben kommt es unter Dexamethason zu einer Expressionssteigerung der IFN- $\gamma$  Rezeptoren (Galon 2002).

Möglich ist auch, dass ein ausgebliebener Shift von Th-1 zu Th-2 Zellen trotz Glucocorticoidgabe im septischen Schock oder das monozytenstimulierende Zytokin IL-12 p70 einen positiven Einfluss auf die Monozytenaktivität genommen hat (Keh 2003).

Wie bei der Analyse der HLA-DR Rezeptorexpression konnte zwischen Respondern und Non-Respondern innerhalb der Therapiegruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Hier gelten gleiche Überlegungen wie bei der Diskussion um den ausgebliebenen Effekt bei der HLA-DR Expression:

1. der ACTH-Test zur Beurteilung der relativen NNR-Insuffizienz gibt unzureichend die Schwere der relativen NNR-Insuffizienz wieder
2. unser Patientenkollektiv befand sich im Vergleich zu andere Studien in einem nicht so schweren septischen Schockzustand

Für die Analyse der Monozytenfunktion unter einer Hydrocortisonapplikation im septischen Schock lässt sich jedoch zusammenfassen, dass auch hier eine rein immunsuppressive Wirkung von Hydrocortison ausgeblieben ist. Die Daten stärken zusätzlich die Hypothese, dass Hydrocortison im septischen Schock immunmodulatorisch wirkt.

Die CORTICUS-Studie konnte im Gegensatz zu früheren Arbeiten und aktuellen Metaanalysen zur Hydrocortisontherapie im septischen Schock keine Reduktion der Mortalität nachweisen (34,3% in der Hydrocortisongruppe, 31,5% in der Placebogruppe). Es kam zwar zu einer schnelleren Schockresolution allerdings war die Zahl der Patienten, die einen erneuten septischen Schock erlitten, erhöht in der Hydrocortisongruppe (6% in der Hydrocortison-Gruppe, 2% in der Placebogruppe). Diskutiert wird, ob eine wenn auch nicht signifikante, jedoch höhere Komplikationsrate wie die Superinfektionen in der Hydrocortisongruppe (Hydrocortison-Gruppe 33%, Placebogruppe 26%) den positiven Effekt von Hydrocortison auf die Schockresolution zu nichte gemacht hat.

Als mögliche Ursache des erhöhten Infektionsrisikos werden die antiinflammatorischen Eigenschaften von Glucocorticoiden genannt. Unsere Studie konnte dies jedoch nicht nachweisen. Weder bei der HLA-DR Expression auf Monozyten, der als sensitiver Marker der Immunsuppression im septischen Schock gilt, noch bei der Monozytenfunktion konnte in der Hydrocortisongruppe eine immunsupprimierende Wirkung nachgewiesen werden. Es kam zwar zu einer signifikanten Reduktion der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  (erhöhte Endotoxintoleranz), ein Anstieg der IL-10 Produktion als Ausdruck einer Verstärkung der antiinflammatorischen Reaktion blieb hingegen aus. Ploder wies 2006 eine Korrelation zwischen einer verminderten TNF- $\alpha$  Produktion von LPS-stimulierten Monozyten und dem Outcome von Traumapatienten nach (Ploder 2006). Es wurde interpretiert, dass dies Ausdruck einer Endotoxintoleranz sei, welches eine schlechtere Prognose für die Patienten bedeutet. So muss in Betracht gezogen werden, dass möglicherweise eine erhöhte Endotoxintoleranz unter Hydrocortison während des septischen Schocks – wie auch an Hand unserer Ergebnisse zu vermuten – Ursache der erhöhten Komplikationsrate wie der Infektionsrate und des erneuten septischen Schocks ist. Für eine Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den einzelnen Immunparametern und den Komplikationsraten war unser Patientkollektiv allerdings zu klein.

Die CORTICUS-Studie ist die einzige Studie, die eine erhöhte Infektionsrate unter einer Hydrocortisongabe während des septischen Schocks nachweisen konnte. Neuere Metaanalysen konnten keinen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Komplikationsrate wie Infektionen oder gastrointestinale Blutungen und einer Hydrocortisonapplikation nachweisen (Minneci 2009; Annane 2010; Moran 2010). Gegen ein erhöhtes Infektionsrisiko unter einer Hydrocortisontherapie spricht auch eine placebokontrollierte Studie zu Hydrocortison bei schwer traumatisierten Patienten (HYPOLYTE) von Roquilly et al. 2011, welche eine signifikant niedrigere Pneumonierate in der Hydrocortisongruppe zeigen konnte. Ob eine Hydrocortisonapplikation im septischen Schock zu einer Immunsuppression führt, bleibt fraglich: nicht nur, dass frühere Studien dies nicht nachweisen konnten, auch in anderen Anwendungsbereichen wie bei der Glucocorticoidgabe bei Patienten mit ARDS (acute respiratory distress syndrome) blieb eine erhöhte Infektionsrate aus (Steinberg 2006).

Dennoch führten die Ergebnisse von CORTICUS zu einer deutlichen Wendung bei den S2k-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI): „Niedrig dosiertes intravenös verabreichtes

Hydrocortison in einer Dosierung von 200–300 mg/Tag kann nach der gegenwärtigen Datenlage in der Behandlung von Patienten mit septischem Schock nicht mehr empfohlen werden.“ (Reinhart 2010). Lediglich bei therapieresistentem Schock wird eine Hydrocortisongabe erwogen. Zusätzlich publizierte Beale 2010 aus dem PROGlucocorticoidrezeptorenESS Register Daten zu niedrig dosierten Cortisongaben bei Patienten mit Sepsis oder einem septischen Schock (Beale 2010). Hier wurde eine übermäßige Cortisontherapie angeprangert. Dies führte zusätzlich zu einer Diskussion über Effektivität und Nutzen von Hydrocortison im septischen Schock. In Zusammenhang mit der Veröffentlichung von Beale ist jedoch zu beachten, dass – wie von den Autoren angemerkt – es sich um eine retrospektive Analyse von Daten handelt, die nicht speziell den Nutzen von niedrig dosiertem Hydrocortison untersuchen wollten. Es gibt keine Angaben zu Therapiebeginn, exakte Dosierung und Behandlungsdauer von Hydrocortison.

Betrachtet man unsere Daten zum immunologischen Effekt von Hydrocortison im septischen Schock, so spiegeln diese nicht so deutlich eine Immunsuppression wider, wie es nach der Veröffentlichung der CORTICUS-Daten in der Fachwelt aktuell diskutiert wird.

Was kann nun die Ursache sein, dass in der CORTICUS-Studie ein positiver Effekt auf die Mortalität ausgeblieben ist und im Gegensatz hierzu häufiger Komplikationen wie erneuter Schock, erneute Sepsis oder Superinfektionen aufgetreten sind? Zum einen sollte beachtet werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Hydrocortison- und der Placebogruppe hinsichtlich dieser Parameter festgestellt werden konnte. Nichts desto trotz ist der Trend gegenläufig zu anderen Studien. Möglicherweise liegt dies begründet in den bereits diskutierten unterschiedlichen Patientenkollektiven im Vergleich zu anderen Studien (größere Heterogenität, geringere Ausprägung des septischen Schocks in der CORTICUS-Studie) (Bollaert 1998; Briegel 1999; Annane 2002). Zudem war die Zeit bis zum Einschluss relativ lang (bis 72 Stunden nach Schockbeginn). Diskutiert werden sollte auch, ob nicht nur ein früherer Therapiebeginn mit Hydrocortison Ursache sein könnte, sondern ob ggf. auch eine längere Therapie einen positiven Einfluss auf das Outcome der Patienten sowie auf mögliche Komplikationen wie erneuter Schock haben könnte.

Aktuelle Studien – die HYPRESS-Studie (Hydrocortisontherapie bei schwerer Sepsis ohne Schock) und die APROCCHS-Studie (Effizienz und Nutzen von aktiviertem Protein C und Hydrocortison im septischen Schock) – werden weiteren Aufschluss zur Pathophysiologie und den Behandlungskonzepten der schweren Sepsis und des septischen Schocks bringen.

Ein limitierender Faktor unserer Studie ist – wie bei allen klinischen Studien zum Immunsystem –, dass die Ergebnisse lediglich eine Momentaufnahme zum Abnahmezeitpunkt widerspiegeln können. Zusätzlich umfasst eine immunologische Antwort eine solche Vielzahl von unterschiedlichen Faktoren und Mediatoren, die jeweils einem komplexen Wirkmechanismus unterliegen, dass zur Untersuchung der Vorgänge lediglich ausgewählte Parameter verwendet werden können. Dies bedeutet jedoch, dass eine allumfassende Klärung der immunologischen Vorgänge schwer möglich ist. Außerdem ist aufgrund der Komplexität des Krankheitsbildes ein

Ausschluss interner sowie externer Cofaktoren nicht durchführbar. Ein anderer limitierender Faktor ist unsere Patientenzahl, die einen Zusammenhang zwischen den immunologischen und klinischen Parametern wie Mortalität oder Komplikationen nicht zulässt.

## 6 Zusammenfassung

Die Behandlung des septischen Schocks ist eine große Herausforderung für jeden Intensivmediziner. Trotz vieler Studien bleibt bis heute die genaue Pathophysiologie des Krankheitsbildes und somit eine adäquate adjunktive Therapie ungeklärt. Anstatt eines definitiven Aufschlusses über den Nutzen und das Risiko einer Hydrocortisontherapie in physiologischer Dosis im septischen Schock hat die CORTICUS-Studie (eine multinationale, randomisierte Placebo-kontrollierte doppel-blind Studie zur Erfassung der Wirksamkeit und Sicherheit einer niedrig dosierten Hydrocortisontherapie im septischen Schock (Sprung 2008)) statt eindeutiger Therapieempfehlung eine kontroverse Diskussion in der Fachwelt losgetreten.

Im Rahmen der CORTICUS Studie wurde in Berlin eine Substudie durchgeführt, die sich mit der Untersuchung des immunologischen Effektes einer niedrig dosierten Hydrocortisontherapie bei Patienten im septischen Schock beschäftigte. Hierbei wurden immunologische Parameter bei 84 Patienten aus 13 Intensivstationen von 10 Krankenhäusern von März 2002 bis November 2005 untersucht. Die Hydrocortisongruppe bestand ebenso wie die Placebogruppe aus 42 Patienten. Zusätzlich wurde der immunologische Effekt in Abhängigkeit einer Nebennierenrindeninsuffizienz in den jeweiligen Therapiegruppen untersucht (Responder und Non-Responder nach einem ACTH Test zu Beginn der Studie). Der Studienzeitraum betrug 28 Tage mit insgesamt sechs Blutentnahmen zur Messung der immunologischen Parameter. Randomisierte Patienten erhielten entsprechend dem CORTICUS Protokoll an den Tagen 1 – 5 4x50 mg Hydrocortison, an den Tagen 6 – 8 2x50 mg Hydrocortison und an den Tagen 9 – 11 1x50 mg Hydrocortison oder ein Placebopräparat. Die Blutentnahmen fanden zu Studienbeginn (Tag 1) sowie an den Tagen 3, 6, 12, 18 und 28 statt.

Diese Arbeit betrachtete den immunologischen Effekt von Hydrocortison auf die Monozyten im septischen Schock: die Auswirkung auf die Monozytenpopulation, der HLA-DR Rezeptorexpression auf Monozyten und der Monozytenfunktion anhand der IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  Produktion nach ex vivo LPS-Stimulation.

Hierbei konnten wir weder einen signifikanten Effekt von Hydrocortison auf die relative und absolute Monozytenpopulation feststellen noch auf die HLA-DR Expression auf Monozyten. Trotz einer Hydrocortisongabe blieb ein weiterer Abfall der HLA-DR Expression aus. Bei Betrachtung der Monozytenfunktion konnten wir allerdings eine signifikante Reduktion der Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  nachweisen, eine vermehrte Synthese des antiinflammatorischen Zytokines IL-10 blieb hingegen aus. Bei Betrachtung der Responder und Non-Responder in den Therapiegruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

Unsere Daten weisen daraufhin, dass ein einseitiger hydrocortisonassoziierter antiinflammatorischer Effekt bei Patienten im septischen Schock ausgeblieben ist. Zwar lassen unsere Ergebnisse eine erhöhte Endotoxintoleranz vermuten (verminderte Synthese proinflammatorischer Zytokine nach erneuter Endotoxinexposition), eine antiinflammatorische

Wirkung im Sinne eines HLA-DR Expressionsabfalls bis hin zu einer Immunparalyse sowie eine vermehrte Synthese von IL-10 konnten wir allerdings nicht nachweisen. Vielmehr lassen unsere Ergebnisse einen immunmodulatorischen Effekt von Hydrocortison in physiologischer Dosis im septischen Schock erkennen.

## 7 Literaturverzeichnis

- (1992). "American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis." Crit Care Med **20**(6): 864-74.
- Abbas, A. K. (2007). cellular and molecular immunology, Saunders Elsevier.
- Abbas, A. K., K. M. Murphy, et al. (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature **383**(6603): 787-93.
- Abraham, E., R. Wunderink, et al. (1995). "Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group." Jama **273**(12): 934-41.
- Adcock, I. M. (2000). "Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions." Pulm Pharmacol Ther **13**(3): 115-26.
- Adcock, I. M., C. R. Brown, et al. (1995). "Effects of glucocorticoids on transcription factor activation in human peripheral blood mononuclear cells." Am J Physiol **268**(2 Pt 1): C331-8.
- Adcock, I. M. and G. Caramori (2001). "Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids." Immunol Cell Biol **79**(4): 376-84.
- Akahoshi, T., J. J. Oppenheim, et al. (1988). "Induction of high-affinity interleukin 1 receptor on human peripheral blood lymphocytes by glucocorticoid hormones." J Exp Med **167**(3): 924-36.
- Alberti, C., C. Brun-Buisson, et al. (2002). "Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study." Intensive Care Med **28**(2): 108-21.
- Almawi, W. Y., H. N. Beyhum, et al. (1996). "Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids." J Leukoc Biol **60**(5): 563-72.
- Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, et al. (2001). "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care." Crit Care Med **29**(7): 1303-10.
- Annane, D. (2010). "Corticosteroids for sepsis: registry versus Cochrane systematic review!" Crit Care **14**(4): 185.
- Annane, D., P. Aegerter, et al. (2003). "Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network." Am J Respir Crit Care Med **168**(2): 165-72.
- Annane, D., E. Bellissant, et al. (2004). "Corticosteroids for severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis." Bmj **329**(7464): 480.
- Annane, D. and J. M. Cavillon (2003). "Corticosteroids in sepsis: from bench to bedside?" Shock **20**(3): 197-207.
- Annane, D., V. Sebille, et al. (2002). "Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock." Jama **288**(7): 862-71.
- Annane, D., V. Sebille, et al. (2002). "Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock." Jama **288**(7): 862-71.
- Annane, D., V. Sebille, et al. (2000). "A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin." Jama **283**(8): 1038-45.
- Asadullah, K., W. Sterry, et al. (1998). "IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach." J Clin Invest **101**(4): 783-94.
- Auphan, N., J. A. DiDonato, et al. (1995). "Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis." Science **270**(5234): 286-90.
- Ayala, A., C. D. Herdon, et al. (1996). "Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators." Blood **87**(10): 4261-75.
- Ayala, A., C. D. Herdon, et al. (1995). "The induction of accelerated thymic programmed cell death during polymicrobial sepsis: control by corticosteroids but not tumor necrosis factor." Shock **3**(4): 259-67.
- Bamberger, C. M., H. M. Schulte, et al. (1996). "Molecular determinants of glucocorticoid receptor



- function and tissue sensitivity to glucocorticoids." Endocr Rev **17**(3): 245-61.
- Barber, A. E., S. M. Coyle, et al. (1993). "Glucocorticoid therapy alters hormonal and cytokine responses to endotoxin in man." J Immunol **150**(5): 1999-2006.
- Barnes, P. J. (1995). "Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids." Biochem Soc Trans **23**(4): 940-5.
- Barnes, P. J. (1998). "Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms." Clin Sci (Lond) **94**(6): 557-72.
- Barquist, E. and O. Kirton (1997). "Adrenal insufficiency in the surgical intensive care unit patient." J Trauma **42**(1): 27-31.
- Bartholome, B., C. M. Spies, et al. (2004). "Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis." Faseb J **18**(1): 70-80.
- Bates, D. W., E. F. Cook, et al. (1990). "Predicting bacteremia in hospitalized patients. A prospectively validated model." Ann Intern Med **113**(7): 495-500.
- Bates, D. W., K. Sands, et al. (1997). "Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group." J Infect Dis **176**(6): 1538-51.
- Beale, R., J. M. Janes, et al. (2010). "Global utilization of low-dose corticosteroids in severe sepsis and septic shock: a report from the PROGRESS registry." Crit Care **14**(3): R102.
- Beishuizen, A., L. G. Thijs, et al. (2001). "Patterns of corticosteroid-binding globulin and the free cortisol index during septic shock and multitrauma." Intensive Care Med **27**(10): 1584-91.
- Bennett, N., A. Gabrielli, et al. (1999). "Hypotension and adrenal insufficiency." J Clin Anesth **11**(5): 425-30.
- Bernard, G. R., A. P. Wheeler, et al. (1997). "The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group." N Engl J Med **336**(13): 912-8.
- Bodmer, J. G., S. G. Marsh, et al. (1999). "Nomenclature for factors of the HLA system, 1998." Vox Sang **77**(3): 164-91.
- Bollaert, P. E., C. Charpentier, et al. (1998). "Reversal of late septic shock with supraphysiologic doses of hydrocortisone." Crit Care Med **26**(4): 645-50.
- Bone, R. C. (1996). "Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS." Crit Care Med **24**(7): 1125-8.
- Bone, R. C., R. A. Balk, et al. (1992). "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 **101**(6): 1644-55.
- Bone, R. C., C. J. Fisher, Jr., et al. (1987). "A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock." N Engl J Med **317**(11): 653-8.
- Borski, R. J., G. N. Hyde, et al. (2002). "Signal transduction mechanisms mediating rapid, nongenomic effects of cortisol on prolactin release." Steroids **67**(6): 539-48.
- Bouachour, G., P. Tirot, et al. (1995). "Adrenocortical function during septic shock." Intensive Care Med **21**(1): 57-62.
- Bouachour, G., P. Tirot, et al. (1994). "Hemodynamic changes in acute adrenal insufficiency." Intensive Care Med **20**(2): 138-41.
- Braams, R., H. P. Koppeschaar, et al. (1998). "Adrenocortical function in patients with ruptured aneurysm of the abdominal aorta." Intensive Care Med **24**(2): 124-7.
- Brattsand, R. and M. Linden (1996). "Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies." Aliment Pharmacol Ther **10 Suppl 2**: 81-90; discussion 91-2.
- Briegel, J., H. Forst, et al. (1999). "Stress doses of hydrocortisone reverse hyperdynamic septic shock: a prospective, randomized, double-blind, single-center study." Crit Care Med **27**(4): 723-32.
- Briegel, J., H. Forst, et al. (1991). "Contribution of cortisol deficiency to septic shock." Lancet **338**(8765): 507-8.
- Briegel, J., M. Jochum, et al. (2001). "Immunomodulation in septic shock: hydrocortisone differentially regulates cytokine responses." J Am Soc Nephrol **12 Suppl 17**: S70-4.

- Briegel, J., G. Schelling, et al. (1996). "A comparison of the adrenocortical response during septic shock and after complete recovery." *Intensive Care Med* **22**(9): 894-9.
- Briegel, J., C. L. Sprung, et al. (2009). "Multicenter comparison of cortisol as measured by different methods in samples of patients with septic shock." *Intensive Care Med* **35**(12): 2151-6.
- Brigham, K. L., R. E. Bowers, et al. (1981). "Methylprednisolone prevention of increased lung vascular permeability following endotoxemia in sheep." *J Clin Invest* **67**(4): 1103-10.
- Brinkmann, V. and C. Kristofic (1995). "Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4+ effector T cells generated from CD45RO- and CD45RO+ subsets." *J Immunol* **155**(7): 3322-8.
- Bronicki, R. A., C. L. Backer, et al. (2000). "Dexamethasone reduces the inflammatory response to cardiopulmonary bypass in children." *Ann Thorac Surg* **69**(5): 1490-5.
- Brown, M. R., L. A. Fisher, et al. (1982). "Corticotropin-releasing factor: effects on the sympathetic nervous system and oxygen consumption." *Life Sci* **30**(2): 207-10.
- Buttgereit, F., S. Krauss, et al. (1997). "Methylprednisolone inhibits uptake of Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> ions into concanavalin A-stimulated thymocytes." *Biochem J* **326** ( Pt 2): 329-32.
- Buttgereit, F. and A. Scheffold (2002). "Rapid glucocorticoid effects on immune cells." *Steroids* **67**(6): 529-34.
- Buttgereit, F., M. Wehling, et al. (1998). "A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited." *Arthritis Rheum* **41**(5): 761-7.
- Calogero, A. E., J. A. Norton, et al. (1992). "Pulsatile activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during major surgery." *Metabolism* **41**(8): 839-45.
- Catalano, R. D., V. Parameswaran, et al. (1984). "Mechanisms of adrenocortical depression during Escherichia coli shock." *Arch Surg* **119**(2): 145-50.
- Cavaillon, J. M. (1994). "Cytokines and macrophages." *Biomed Pharmacother* **48**(10): 445-53.
- Chawla, K., Y. Kupfer, et al. (1999). "Hydrocortisone reverses refractory septic shock (abstract)." *Crit Care Med* **27**: A33.
- Chrousos, G. P. (1992). "Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The corticotropin-releasing hormone perspective." *Endocrinol Metab Clin North Am* **21**(4): 833-58.
- Chrousos, G. P. (1995). "The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation." *N Engl J Med* **332**(20): 1351-62.
- Chrousos, G. P. and P. W. Gold (1992). "The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis." *Jama* **267**(9): 1244-52.
- Chrousos, G. P. and T. Kino (2005). "Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic." *Sci STKE* **2005**(304): pe48.
- Cippitelli, M., A. Sica, et al. (1995). "Negative transcriptional regulation of the interferon-gamma promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-Jun." *J Biol Chem* **270**(21): 12548-56.
- Cooper, M. S. and P. M. Stewart (2003). "Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients." *N Engl J Med* **348**(8): 727-34.
- Cronin, L., D. J. Cook, et al. (1995). "Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature." *Crit Care Med* **23**(8): 1430-9.
- Cronstein, B. N., S. C. Kimmel, et al. (1992). "A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21): 9991-5.
- Crowe, M., P. Ispahani, et al. (1998). "Bacteraemia in the adult intensive care unit of a teaching hospital in Nottingham, UK, 1985-1996." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**(6): 377-84.
- Cupps, T. R. and A. S. Fauci (1982). "Corticosteroid-mediated immunoregulation in man." *Immunol Rev* **65**: 133-55.
- Cupps, T. R., T. L. Gerrard, et al. (1985). "Effects of in vitro corticosteroids on B cell activation, proliferation, and differentiation." *J Clin Invest* **75**(2): 754-61.
- De Bosscher, K., M. L. Schmitz, et al. (1997). "Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13504-9.

- De Vera, M. E., B. S. Taylor, et al. (1997). "Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I-kappa B alpha and inhibiting NF-kappa B." Am J Physiol **273**(6 Pt 1): G1290-6.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, et al. (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." J Exp Med **174**(5): 1209-20.
- de Waal Malefyt, R., C. G. Figdor, et al. (1993). "Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10." J Immunol **151**(11): 6370-81.
- de Waal Malefyt, R., J. Haanen, et al. (1991). "Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression." J Exp Med **174**(4): 915-24.
- Debets, J. M., R. Kampmeijer, et al. (1989). "Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients." Crit Care Med **17**(6): 489-94.
- Dinarello, C. A., J. A. Gelfand, et al. (1993). "Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome." Jama **269**(14): 1829-35.
- Docke, W. D., F. Randow, et al. (1997). "Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment." Nat Med **3**(6): 678-81.
- Dokmetas, H. S., R. Colak, et al. (2000). "A comparison between the 1-microg adrenocorticotropin (ACTH) test, the short ACTH (250 microg) test, and the insulin tolerance test in the assessment of hypothalamo-pituitary-adrenal axis immediately after pituitary surgery." J Clin Endocrinol Metab **85**(10): 3713-9.
- Endo, S., K. Inada, et al. (1996). "Plasma levels of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) and severity of illness in patients with burns." J Med **27**(1-2): 57-71.
- Engel, C., F. M. Brunkhorst, et al. (2007). "Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study." Intensive Care Med **33**(4): 606-18.
- Ertel, W., J. P. Kremer, et al. (1995). "Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients." Blood **85**(5): 1341-7.
- Finlay, W. E. and J. I. McKee (1982). "Serum cortisol levels in severely stressed patients." Lancet **1**(8286): 1414-5.
- Fisher, C. J., Jr., J. M. Agosti, et al. (1996). "Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group." N Engl J Med **334**(26): 1697-702.
- Fisher, C. J., Jr., J. F. Dhainaut, et al. (1994). "Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group." Jama **271**(23): 1836-43.
- Fisher, C. J., Jr., G. J. Slotman, et al. (1994). "Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial." Crit Care Med **22**(1): 12-21.
- Franchimont, D., E. Louis, et al. (1998). "Effects of dexamethasone on the profile of cytokine secretion in human whole blood cell cultures." Regul Pept **73**(1): 59-65.
- Franchimont, D., H. Martens, et al. (1999). "Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor." J Clin Endocrinol Metab **84**(8): 2834-9.
- Friedman, G., S. Jankowski, et al. (1997). "Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock." J Crit Care **12**(4): 183-7.
- Fukuzuka, K., C. K. Edwards, 3rd, et al. (2000). "Glucocorticoid-induced, caspase-dependent organ apoptosis early after burn injury." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **278**(4): R1005-18.
- Fumeaux, T. and J. Pugin (2002). "Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock." Am J Respir Crit Care Med **166**(11): 1475-82.
- Gaillard, R. C., D. Turnill, et al. (1990). "Tumor necrosis factor alpha inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors." Endocrinology **127**(1): 101-6.

- Galon, J., D. Franchimont, et al. (2002). "Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells." Faseb J **16**(1): 61-71.
- Gametchu, B., F. Chen, et al. (1999). "Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models." Steroids **64**(1-2): 107-19.
- Gametchu, B., C. S. Watson, et al. (1993). "Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients." Faseb J **7**(13): 1283-92.
- Garvey, W. T., T. P. Huecksteadt, et al. (1989). "Expression of a glucose transporter gene cloned from brain in cellular models of insulin resistance: dexamethasone decreases transporter mRNA in primary cultured adipocytes." Mol Endocrinol **3**(7): 1132-41.
- Girardin, E., G. E. Grau, et al. (1988). "Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura." N Engl J Med **319**(7): 397-400.
- Gogos, C. A., E. Drosou, et al. (2000). "Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options." J Infect Dis **181**(1): 176-80.
- Green, D. R. and H. M. Beere (2000). "Apoptosis. Gone but not forgotten." Nature **405**(6782): 28-9.
- Hammond, G. L., C. L. Smith, et al. (1990). "A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils." J Clin Endocrinol Metab **71**(1): 34-9.
- Hasko, G. and C. Szabo (1999). "IL-12 as a therapeutic target for pharmacological modulation in immune-mediated and inflammatory diseases: regulation of T helper 1/T helper 2 responses." Br J Pharmacol **127**(6): 1295-304.
- Hatz, H. J. (1998). Glucocorticoide. Immunologische Grundlagen, Pharmakologie und Therapierichtlinien.
- Haveman, J. W., A. C. Muller Kobold, et al. (1999). "The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment." Neth J Med **55**(3): 132-41.
- Hawrylowicz, C. M., L. Guida, et al. (1994). "Dexamethasone up-regulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression on human monocytes." Immunology **83**(2): 274-80.
- Heidecke, C. D., T. Hensler, et al. (1999). "Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection." Am J Surg **178**(4): 288-92.
- Hinshaw, L. B. (1989). "Development of animal models for application to clinical trials in septic shock." Prog Clin Biol Res **308**: 835-46.
- Hinshaw, L. B., B. K. Beller, et al. (1979). "Recovery from lethal Escherichia coli shock in dogs." Surg Gynecol Obstet **149**(4): 545-53.
- Hinshaw, L. B., B. K. Beller-Todd, et al. (1981). "Effectiveness of steroid/antibiotic treatment in primates administered LD100 Escherichia coli." Ann Surg **194**(1): 51-6.
- Hinson, J. P. (1990). "Paracrine control of adrenocortical function: a new role for the medulla?" J Endocrinol **124**(1): 7-9.
- Hollenberg, S. M., C. Weinberger, et al. (1985). "Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA." Nature **318**(6047): 635-41.
- Hotchkiss, R. S., P. E. Swanson, et al. (1999). "Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction." Crit Care Med **27**(7): 1230-51.
- Hotchkiss, R. S., K. W. Tinsley, et al. (2001). "Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans." J Immunol **166**(11): 6952-63.
- Hubacek, J. A., F. Stuber, et al. (2001). "Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis." Crit Care Med **29**(3): 557-61.
- Ito, S., P. Ansari, et al. (1999). "Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1." Blood **93**(5): 1456-63.
- Jaattela, M., V. Ilvesmaki, et al. (1991). "Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin-induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells." Endocrinology **128**(1): 623-9.
- Janeway, C. A., Jr., S. Carding, et al. (1988). "CD4+ T cells: specificity and function." Immunol Rev

101: 39-80.

- Jarek, M. J., E. J. Legare, et al. (1993). "Endocrine profiles for outcome prediction from the intensive care unit." Crit Care Med **21**(4): 543-50.
- Jefferies, W. M. (1991). "Cortisol and immunity." Med Hypotheses **34**(3): 198-208.
- Jefferies, W. M. (1994). "Mild adrenocortical deficiency, chronic allergies, autoimmune disorders and the chronic fatigue syndrome: a continuation of the cortisone story." Med Hypotheses **42**(3): 183-9.
- Jensen, L. E. and A. S. Whitehead (1998). "Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response." Biochem J **334** ( Pt 3): 489-503.
- Jurney, T. H., J. L. Cockrell, Jr., et al. (1987). "Spectrum of serum cortisol response to ACTH in ICU patients. Correlation with degree of illness and mortality." Chest **92**(2): 292-5.
- Kam, J. C., S. J. Szeffler, et al. (1993). "Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids." J Immunol **151**(7): 3460-6.
- Karin, M. (1998). "New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable?" Cell **93**(4): 487-90.
- Kass, E. H. and M. Finland (1957). "Adrenocortical hormones and the management of infection." Annu Rev Med **8**: 1-18.
- Keh, D., T. Boehnke, et al. (2003). "Immunologic and hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study." Am J Respir Crit Care Med **167**(4): 512-20.
- Keri, G., V. Parameswaran, et al. (1981). "Effects of septic shock plasma on adrenocortical cell function." Life Sci **28**(17): 1917-23.
- King, K. L. and J. A. Cidlowski (1998). "Cell cycle regulation and apoptosis." Annu Rev Physiol **60**: 601-17.
- Klava, A., A. Windsor, et al. (1997). "Monocyte activation after open and laparoscopic surgery." Br J Surg **84**(8): 1152-6.
- Knox, J. B. (1993). "Oxygen consumption-oxygen delivery dependency in adult respiratory distress syndrome." New Horiz **1**(3): 381-7.
- Koppelman, B., J. J. Neefjes, et al. (1997). "Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling." Immunity **7**(6): 861-71.
- Kox, W. J., T. Volk, et al. (2000). "Immunomodulatory therapies in sepsis." Intensive Care Med **26** **Suppl 1**: S124-8.
- Krahn, D. D., B. A. Gosnell, et al. (1986). "CRF antagonist partially reverses CRF- and stress-induced effects on feeding." Brain Res Bull **17**(3): 285-9.
- la Sala, A., M. Gadina, et al. (2005). "G(i)-protein-dependent inhibition of IL-12 production is mediated by activation of the phosphatidylinositol 3-kinase-protein 3 kinase B/Akt pathway and JNK." J Immunol **175**(5): 2994-9.
- Lamberts, S. W., H. A. Bruining, et al. (1997). "Corticosteroid therapy in severe illness." N Engl J Med **337**(18): 1285-92.
- Larsson, S., C. G. Lofdahl, et al. (1999). "IL-2 and IL-4 counteract budesonide inhibition of GM-CSF and IL-10, but not of IL-8, IL-12 or TNF-alpha production by human mononuclear blood cells." Br J Pharmacol **127**(4): 980-6.
- Le Tulzo, Y., C. Pangault, et al. (2004). "Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock." Am J Respir Crit Care Med **169**(10): 1144-51.
- Le Tulzo, Y., R. Shenkar, et al. (1997). "Hemorrhage increases cytokine expression in lung mononuclear cells in mice: involvement of catecholamines in nuclear factor-kappaB regulation and cytokine expression." J Clin Invest **99**(7): 1516-24.
- Lederer, J. A., M. L. Rodrick, et al. (1999). "The effects of injury on the adaptive immune response." Shock **11**(3): 153-9.
- Lefering, R. and E. A. Neugebauer (1995). "Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis." Crit Care Med **23**(7): 1294-303.
- Lenczowski, M. J., R. M. Bluthé, et al. (1999). "Central administration of rat IL-6 induces HPA activation and fever but not sickness behavior in rats." Am J Physiol **276**(3 Pt 2): R652-8.

- Levy, M. M., M. P. Fink, et al. (2003). "2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference." Crit Care Med **31**(4): 1250-6.
- Lin, M. T. and T. E. Albertson (2004). "Genomic polymorphisms in sepsis." Crit Care Med **32**(2): 569-79.
- Liu, L. Y., B. Sun, et al. (1993). "Changes of pulmonary glucocorticoid receptor and phospholipase A2 in sheep with acute lung injury after high dose endotoxin infusion." Am Rev Respir Dis **148**(4 Pt 1): 878-81.
- Losel, R. and M. Wehling (2003). "Nongenomic actions of steroid hormones." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(1): 46-56.
- Lucas, C. E. and A. M. Ledgerwood (1984). "The cardiopulmonary response to massive doses of steroids in patients with septic shock." Arch Surg **119**(5): 537-41.
- Luce, J. M., A. B. Montgomery, et al. (1988). "Ineffectiveness of high-dose methylprednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock." Am Rev Respir Dis **138**(1): 62-8.
- Marik, P. and G. Zaloga (2000). "Prognostic value of cortisol response in septic shock." Jama **284**(3): 308-9; author reply 309.
- Marik, P. E. (2009). "Critical illness-related corticosteroid insufficiency." Chest **135**(1): 181-93.
- Marik, P. E., S. M. Pastores, et al. (2008). "Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine." Crit Care Med **36**(6): 1937-49.
- Marik, P. E. and G. P. Zaloga (2002). "Adrenal insufficiency in the critically ill: a new look at an old problem." Chest **122**(5): 1784-96.
- Marik, P. E. and G. P. Zaloga (2003). "Adrenal insufficiency during septic shock." Crit Care Med **31**(1): 141-5.
- Marsh, S. G. (1998). "HLA class II region sequences, 1998." Tissue Antigens **51**(4 Pt 2): 467-507.
- Martin, G. S., D. M. Mannino, et al. (2003). "The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000." N Engl J Med **348**(16): 1546-54.
- Mason, D. (1991). "Genetic variation in the stress response: susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and implications for human inflammatory disease." Immunol Today **12**(2): 57-60.
- Matot, I. and C. L. Sprung (1998). "Corticosteroids in septic shock: resurrection of the last rites?" Crit Care Med **26**(4): 627-30.
- Mayenknecht, J., S. Diederich, et al. (1998). "Comparison of low and high dose corticotropin stimulation tests in patients with pituitary disease." J Clin Endocrinol Metab **83**(5): 1558-62.
- McKee, J. I. and W. E. Finlay (1983). "Cortisol replacement in severely stressed patients." Lancet **1**(8322): 484.
- Meagher, L. C., J. M. Cousin, et al. (1996). "Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes." J Immunol **156**(11): 4422-8.
- Meduri, G. U. (1999). "An historical review of glucocorticoid treatment in sepsis: disease pathophysiology and the design of treatment investigation." Sepsis **3**: 21-38.
- Meduri, G. U., A. S. Headley, et al. (1998). "Effect of prolonged methylprednisolone therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial." Jama **280**(2): 159-65.
- Meduri, G. U. and S. Kanangat (1998). "Glucocorticoid treatment of sepsis and acute respiratory distress syndrome: time for a critical reappraisal." Crit Care Med **26**(4): 630-3.
- Meduri, G. U., E. A. Tolley, et al. (2002). "Prolonged methylprednisolone treatment suppresses systemic inflammation in patients with unresolving acute respiratory distress syndrome: evidence for inadequate endogenous glucocorticoid secretion and inflammation-induced immune cell resistance to glucocorticoids." Am J Respir Crit Care Med **165**(7): 983-91.
- Melby, J. C. and W. W. Spink (1958). "Comparative studies on adrenal cortical function and cortisol metabolism in healthy adults and in patients with shock due to infection." J Clin Invest **37**(12): 1791-8.
- Minneci, P. C., K. J. Deans, et al. (2009). "Corticosteroid therapy for severe sepsis and septic shock." Jama **302**(15): 1643; author reply 1644-5.

- Moerer, O., A. Schmid, et al. (2002). "Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use." Intensive Care Med **28**(10): 1440-6.
- Molijn, G. J., J. W. Koper, et al. (1995). "Temperature-induced down-regulation of the glucocorticoid receptor in peripheral blood mononuclear leucocyte in patients with sepsis or septic shock." Clin Endocrinol (Oxf) **43**(2): 197-203.
- Molijn, G. J., J. J. Spek, et al. (1995). "Differential adaptation of glucocorticoid sensitivity of peripheral blood mononuclear leukocytes in patients with sepsis or septic shock." J Clin Endocrinol Metab **80**(6): 1799-803.
- Monneret, G., N. Elmenkouri, et al. (2002). "Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock." Clin Chem **48**(9): 1589-92.
- Moran, J. L., M. J. Chapman, et al. (1994). "Hypocortisolaemia and adrenocortical responsiveness at onset of septic shock." Intensive Care Med **20**(7): 489-95.
- Moran, J. L., P. L. Graham, et al. (2010). "Updating the evidence for the role of corticosteroids in severe sepsis and septic shock: a Bayesian meta-analytic perspective." Crit Care **14**(4): R134.
- Morel, A. S., G. Coulton, et al. (2002). "Regulation of major histocompatibility complex class II synthesis by interleukin-10." Immunology **106**(2): 229-36.
- Muller Kobold, A. C., J. E. Tulleken, et al. (2000). "Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality." Intensive Care Med **26**(7): 883-92.
- Munck, A., P. M. Guyre, et al. (1984). "Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions." Endocr Rev **5**(1): 25-44.
- Munck, A. and A. Naray-Fejes-Toth (1992). "The ups and downs of glucocorticoid physiology. Permissive and suppressive effects revisited." Mol Cell Endocrinol **90**(1): C1-4.
- Munford, R. S. and J. Pugin (2001). "Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive." Am J Respir Crit Care Med **163**(2): 316-21.
- Munoz, C., J. Carlet, et al. (1991). "Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis." J Clin Invest **88**(5): 1747-54.
- Nathan, C. F. (1987). "Secretory products of macrophages." J Clin Invest **79**(2): 319-26.
- Nicola, N. A. and L. Peterson (1986). "Identification of distinct receptors for two hemopoietic growth factors (granulocyte colony-stimulating factor and multipotential colony-stimulating factor) by chemical cross-linking." J Biol Chem **261**(26): 12384-9.
- Oberholzer, A., C. Oberholzer, et al. (2000). "Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states." Crit Care Med **28**(4 Suppl): N3-12.
- Oberholzer, A., C. Oberholzer, et al. (2001). "Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity." Shock **16**(2): 83-96.
- Oelkers, W. (1996). "Adrenal insufficiency." N Engl J Med **335**(16): 1206-12.
- Okusawa, S., J. A. Gelfand, et al. (1988). "Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition." J Clin Invest **81**(4): 1162-72.
- Opal, S. M. and V. A. DePalo (2000). "Anti-inflammatory cytokines." Chest **117**(4): 1162-72.
- Oppert, M., A. Reinicke, et al. (2000). "Plasma cortisol levels before and during "low-dose" hydrocortisone therapy and their relationship to hemodynamic improvement in patients with septic shock." Intensive Care Med **26**(12): 1747-55.
- Oppert, M., R. Schindler, et al. (2005). "Low-dose hydrocortisone improves shock reversal and reduces cytokine levels in early hyperdynamic septic shock." Crit Care Med **33**(11): 2457-64.
- Osuchowski, M. F., K. Welch, et al. (2006). "Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality." J Immunol **177**(3): 1967-74.
- O'Sullivan, S. T., J. A. Lederer, et al. (1995). "Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection." Ann Surg **222**(4): 482-90; discussion 490-2.
- Ottenweller, J. E. and A. H. Meier (1982). "Adrenal innervation may be an extrapituitary mechanism

- able to regulate adrenocortical rhythmicity in rats." Endocrinology **111**(4): 1334-8.
- Oursler, M. J., B. L. Riggs, et al. (1993). "Glucocorticoid-induced activation of latent transforming growth factor-beta by normal human osteoblast-like cells." Endocrinology **133**(5): 2187-96.
- Paliogianni, F., A. Raptis, et al. (1993). "Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT." J Clin Invest **91**(4): 1481-9.
- Pangault, C., Y. Le Tulzo, et al. (2006). "Down-modulation of granulocyte macrophage-colony stimulating factor receptor on monocytes during human septic shock." Crit Care Med **34**(4): 1193-201.
- Pariante, C. M., B. D. Pearce, et al. (1999). "The proinflammatory cytokine, interleukin-1alpha, reduces glucocorticoid receptor translocation and function." Endocrinology **140**(9): 4359-66.
- Perrot, D., A. Bonneton, et al. (1993). "Hypercortisolism in septic shock is not suppressible by dexamethasone infusion." Crit Care Med **21**(3): 396-401.
- Planey, S. L. and G. Litwack (2000). "Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphocytes." Biochem Biophys Res Commun **279**(2): 307-12.
- Platzer, C., C. Meisel, et al. (1995). "Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs." Int Immunol **7**(4): 517-23.
- Ploder, M., L. Pelinka, et al. (2006). "Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production and not monocyte human leukocyte antigen-DR expression is correlated with survival in septic trauma patients." Shock **25**(2): 129-34.
- Poeze, M., G. Ramsay, et al. (2004). "An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis." Crit Care **8**(6): R409-13.
- Pruitt, J. H., M. B. Welborn, et al. (1996). "Increased soluble interleukin-1 type II receptor concentrations in postoperative patients and in patients with sepsis syndrome." Blood **87**(8): 3282-8.
- Ramirez, F. (1998). "Glucocorticoids induce a Th2 response in vitro." Dev Immunol **6**(3-4): 233-43.
- Ramirez, F., D. J. Fowell, et al. (1996). "Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro." J Immunol **156**(7): 2406-12.
- Randow, F., U. Syrbe, et al. (1995). "Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta." J Exp Med **181**(5): 1887-92.
- Rangel-Frausto, M. S., D. Pittet, et al. (1998). "The dynamics of disease progression in sepsis: Markov modeling describing the natural history and the likely impact of effective antisepsis agents." Clin Infect Dis **27**(1): 185-90.
- Reinhart, K., F. M. Brunkhorst, et al. (2010). "[Prevention, diagnosis, treatment, and follow-up care of sepsis. First revision of the S2k Guidelines of the German Sepsis Society (DSG) and the German Interdisciplinary Association for Intensive and Emergency Care Medicine (DIVI)]." Anaesthetist **59**(4): 347-70.
- Rhen, T. and J. A. Cidlowski (2005). "Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs." N Engl J Med **353**(16): 1711-23.
- Richards, D. F., M. Fernandez, et al. (2000). "Glucocorticoids drive human CD8(+) T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production." Eur J Immunol **30**(8): 2344-54.
- Rogy, M. A., S. M. Coyle, et al. (1994). "Persistently elevated soluble tumor necrosis factor receptor and interleukin-1 receptor antagonist levels in critically ill patients." J Am Coll Surg **178**(2): 132-8.
- Rothwell, P. M., Z. F. Udawadia, et al. (1991). "Cortisol response to corticotropin and survival in septic shock." Lancet **337**(8741): 582-3.
- Ruggiero, V., J. Tavernier, et al. (1986). "Induction of the synthesis of tumor necrosis factor receptors by interferon-gamma." J Immunol **136**(7): 2445-50.
- Sachse, C., M. Prigge, et al. (1999). "Association between reduced human leukocyte antigen (HLA)-DR expression on blood monocytes and increased plasma level of interleukin-10 in patients with severe burns." Clin Chem Lab Med **37**(3): 193-8.
- Sapolsky, R. M., L. M. Romero, et al. (2000). "How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions." Endocr Rev



21(1): 55-89.

- Schefold, J. C., S. von Haehling, et al. (2007). "A novel selective extracorporeal intervention in sepsis: immunoadsorption of endotoxin, interleukin 6, and complement-activating product 5a." Shock **28**(4): 418-25.
- Schein, R. M., C. L. Sprung, et al. (1990). "Plasma cortisol levels in patients with septic shock." Crit Care Med **18**(3): 259-63.
- Schinkel, C., R. Sendtner, et al. (1998). "Functional analysis of monocyte subsets in surgical sepsis." J Trauma **44**(5): 743-8; discussion 748-9.
- Schmid, D., G. R. Burmester, et al. (2000). "Bioenergetics of human peripheral blood mononuclear cell metabolism in quiescent, activated, and glucocorticoid-treated states." Biosci Rep **20**(4): 289-302.
- Schmidt, M., H. G. Pauels, et al. (1999). "Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 beta." J Immunol **163**(6): 3484-90.
- Schneider, A. J. and H. J. Voerman (1991). "Abrupt hemodynamic improvement in late septic shock with physiological doses of glucocorticoids." Intensive Care Med **17**(7): 436-7.
- Schulz, M., R. Zhang, et al. (2000). "Distinct proteins interacting with the glucocorticoid receptor." Z Rheumatol **59 Suppl 2**: II/6-11.
- Schumer, W. (1976). "Steroids in the treatment of clinical septic shock." Ann Surg **184**(3): 333-41.
- Schwiebert, L. M., R. P. Schleimer, et al. (1995). "Modulation of MHC class II expression in human cells by dexamethasone." Cell Immunol **165**(1): 12-9.
- Sibbald, W. J., A. Short, et al. (1977). "Variations in adrenocortical responsiveness during severe bacterial infections. Unrecognized adrenocortical insufficiency in severe bacterial infections." Ann Surg **186**(1): 29-33.
- Slotman, G. J., C. J. Fisher, Jr., et al. (1993). "Detrimental effects of high-dose methylprednisolone sodium succinate on serum concentrations of hepatic and renal function indicators in severe sepsis and septic shock. The Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group." Crit Care Med **21**(2): 191-5.
- Smith, P. D., C. L. Lamerson, et al. (1990). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates human monocyte accessory cell function." J Immunol **144**(10): 3829-34.
- Smith, R. S., N. A. Sherman, et al. (1972). "Effect of hydrocortisone on immunoglobulin synthesis and secretion by human peripheral lymphocytes in vitro." Int Arch Allergy Appl Immunol **43**(6): 859-70.
- Soni, A., G. M. Pepper, et al. (1995). "Adrenal insufficiency occurring during septic shock: incidence, outcome, and relationship to peripheral cytokine levels." Am J Med **98**(3): 266-71.
- Sorensen, T. I., G. G. Nielsen, et al. (1988). "Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees." N Engl J Med **318**(12): 727-32.
- Spahn, J. D., S. J. Szefler, et al. (1996). "A novel action of IL-13: induction of diminished monocyte glucocorticoid receptor-binding affinity." J Immunol **157**(6): 2654-9.
- Span, L. F., A. R. Hermus, et al. (1992). "Adrenocortical function: an indicator of severity of disease and survival in chronic critically ill patients." Intensive Care Med **18**(2): 93-6.
- Spittler, A., S. Winkler, et al. (1995). "Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes." Blood **86**(4): 1564-9.
- Sprung, C. L., D. Annane, et al. (2008). "Hydrocortisone therapy for patients with septic shock." N Engl J Med **358**(2): 111-24.
- Sprung, C. L., P. V. Caralis, et al. (1984). "The effects of high-dose corticosteroids in patients with septic shock. A prospective, controlled study." N Engl J Med **311**(18): 1137-43.
- Steinberg, K. P., L. D. Hudson, et al. (2006). "Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome." N Engl J Med **354**(16): 1671-84.
- Stellato, C., L. A. Beck, et al. (1995). "Expression of the chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line. Modulation by cytokines and glucocorticoids." J Immunol **155**(1): 410-8.
- Stone, R. (1994). "Search for sepsis drugs goes on despite past failures." Science **264**(5157): 365-7.
- Streeten, D. H. (1999). "What test for hypothalamic-pituitary-adrenocortical insufficiency?" Lancet **354**(9174): 179-80.

- Thomas, L. (1972). "Germs." N Engl J Med **287**(11): 553-5.
- Tonegawa, S. (1988). "Antibody and T-cell receptors." Jama **259**(12): 1845-7.
- Tschaikowsky, K., M. Hedwig-Geissing, et al. (2002). "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 **30**(5): 1015-23.
- van de Stolpe, A., E. Caldenhoven, et al. (1993). "Glucocorticoid-mediated repression of intercellular adhesion molecule-1 expression in human monocytic and bronchial epithelial cell lines." Am J Respir Cell Mol Biol **8**(3): 340-7.
- van der Poll, T., A. E. Barber, et al. (1996). "Hypercortisolemia increases plasma interleukin-10 concentrations during human endotoxemia--a clinical research center study." J Clin Endocrinol Metab **81**(10): 3604-6.
- van Furth, R. (1998). "Human monocytes and cytokines." Res Immunol **149**(7-8): 719-20.
- Vanden Berghe, W., E. Francesconi, et al. (1999). "Dissociated glucocorticoids with anti-inflammatory potential repress interleukin-6 gene expression by a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism." Mol Pharmacol **56**(4): 797-806.
- VanOtteren, G. M., T. J. Standiford, et al. (1994). "Expression and regulation of macrophage inflammatory protein-1 alpha by murine alveolar and peritoneal macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol **10**(1): 8-15.
- Verhoef, C. M., J. A. van Roon, et al. (1999). "The immune suppressive effect of dexamethasone in rheumatoid arthritis is accompanied by upregulation of interleukin 10 and by differential changes in interferon gamma and interleukin 4 production." Ann Rheum Dis **58**(1): 49-54.
- Vincent, J. L., D. J. Bihari, et al. (1995). "The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee." Jama **274**(8): 639-44.
- Visser, J., A. van Boxel-Dezaire, et al. (1998). "Differential regulation of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by glucocorticoids in vitro." Blood **91**(11): 4255-64.
- Volk, H. D., P. Reinke, et al. (1996). "Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis." Intensive Care Med **22 Suppl 4**: S474-81.
- Volk, H. D., M. Thieme, et al. (1991). "Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies." Behring Inst Mitt(88): 208-15.
- Voll, R. E., M. Herrmann, et al. (1997). "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." Nature **390**(6658): 350-1.
- Warren, H. S. (1997). "Strategies for the treatment of sepsis." N Engl J Med **336**(13): 952-3.
- Warren, H. S., S. F. Amato, et al. (1993). "Assessment of ability of murine and human anti-lipid A monoclonal antibodies to bind and neutralize lipopolysaccharide." J Exp Med **177**(1): 89-97.
- Watanabe, Y., S. Lee, et al. (1990). "Control of the expression of a class II major histocompatibility gene (HLA-DR) in various human cell types: down-regulation by IL-1 but not by IL-6, prostaglandin E2, or glucocorticoids." Scand J Immunol **32**(6): 601-9.
- Weighardt, H., C. D. Heidecke, et al. (2000). "Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production." Surgery **127**(3): 309-15.
- Whitelaw, D. M. (1972). "Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling." Cell Tissue Kinet **5**(4): 311-7.
- Wiegers, G. J., M. S. Labeur, et al. (1995). "Glucocorticoids accelerate anti-T cell receptor-induced T cell growth." J Immunol **155**(4): 1893-902.
- Wiegers, G. J. and J. M. Reul (1998). "Induction of cytokine receptors by glucocorticoids: functional and pathological significance." Trends Pharmacol Sci **19**(8): 317-21.
- Wiegers, G. J., J. M. Reul, et al. (1994). "Enhancement of rat splenic lymphocyte mitogenesis after short term preexposure to corticosteroids in vitro." Endocrinology **135**(6): 2351-7.
- Wilckens, T. (1995). "Glucocorticoids and immune function: physiological relevance and pathogenic potential of hormonal dysfunction." Trends Pharmacol Sci **16**(6): 193-7.

- Wolk, K., S. Kunz, et al. (2003). "Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance." J Biol Chem **278**(20): 18030-6.
- Wu, C. Y., C. Fargeas, et al. (1991). "Glucocorticoids suppress the production of interleukin 4 by human lymphocytes." Eur J Immunol **21**(10): 2645-7.
- Yamamoto, K. R. (1985). "Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks." Annu Rev Genet **19**: 209-52.
- Young, H. A. and K. J. Hardy (1995). "Role of interferon-gamma in immune cell regulation." J Leukoc Biol **58**(4): 373-81.
- Zaloga, G. P. and P. Marik (2001). "Hypothalamic-pituitary-adrenal insufficiency." Crit Care Clin **17**(1): 25-41.
- Zarkovic, M., J. Ciric, et al. (1999). "Optimizing the diagnostic criteria for standard (250-microg) and low dose (1-microg) adrenocorticotropin tests in the assessment of adrenal function." J Clin Endocrinol Metab **84**(9): 3170-3.
- Zeni, F., B. Freeman, et al. (1997). "Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment." Crit Care Med **25**(7): 1095-100.
- Ziegler, E. J., C. J. Fisher, Jr., et al. (1991). "Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group." N Engl J Med **324**(7): 429-36.

## **Danksagung**

Mein großer Dank gilt vor allem meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Didier Keh, der durch seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung und sein jahrelanges Engagement in der Sepsisforschung aber auch durch seine Geduld diese Dissertation überhaupt erst möglich gemacht hat.

Frau Anne Gössinger gilt mein herzlicher Dank für die stetige und exzellente Unterstützung bei der Laborarbeit. Mit ihrem äußerst engagierten Einsatz für die CORTICUS-Studie hat sie entscheidend zu den vorliegenden Ergebnissen beigetragen.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Olaf Ahlers bedanken, der mich maßgeblich in der statistischen und inhaltlichen Auswertung der Ergebnisse dieser Dissertation unterstützt hat.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Doktorandenkolleginnen und -kollegen Frau Lydia Krause, Frau Susanne Wolf, Herrn Ronald Rüb, Herrn Robert Wetzstein, Frau Jennifer Loecher und Frau Cornelia Marczewski für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken.

An dieser Stelle möchte ich insbesondere Herrn Ronald Rüb gedenken.

Mein herzlicher Dank gilt zudem allen Patienten sowie allen Mitarbeitern der beteiligten Intensivstationen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie von Herzen danken: meinen Eltern für ihre langjährige, uneingeschränkte Unterstützung und Geduld. Ich danke meinen Töchtern Rosalie und Minna für jede wundervolle Minute, die wir zusammen verbringen können. Aber mein größter Dank gilt meiner Frau, für ihren fachlichen Beitrag, ihr Verständnis und ihren stetigen Beistand sowie für ihre Geduld bei meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung.

## **Erklärung**

„Ich, Tilmann Paul Walter Engelhardt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss von niedrig dosiertem Hydrocortison auf die Monozytenfunktion und HLA-DR Expression im septischen Schock“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 03.05.2012

Tilmann Engelhardt